

Métodos Utilizados no Biocontrole de Fitopatógenos

Métodos usados no ...

2007

LV-2008.00018



CNPMA-7500-2



Embrapa

18.00018



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Uva e Vinho
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Métodos usados no Biocontrole de Fitopatógenos

Editores:

Rosa Maria Valdebenito Sanhueza
Itamar Soares de Melo

Bento Gonçalves, RS
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Uva e Vinho

Rua Livramento, 515

Caixa Postal 130

Fone: (0xx)54 3455 8000

Fax: (0xx)54 3451 2792

<http://www.cnpuv.embrapa.br>

sac@cnpuv.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Lucas da Ressurreição Garrido*

Secretária-Executiva: *Sandra de Souza Sebben*

Membros: *Luiz Antenor Rizzon, Kátia Midori Hiwatashi, Osmar Nickel,*

Viviane Maria Zanella Bello Fialho

Normalização bibliográfica: *Kátia Midori Hiwatashi*

Elaboração da capa: *Luciana Elena Mendonça Prado*

1ª edição

1ª impressão (2007): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Uva e Vinho

Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos/Editado por Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo. – Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007.

141 p.

ISBN 978-85-89921-05-3

1. Doença de planta. 2. Antagonismo. 3. Microrganismo. I. Valdebenito Sanhueza, Rosa Maria, ed. II. Melo, Itamar Soares de, ed.

CDD 579 (21. Ed.)

© Embrapa, 2007

Apresentação

Em consonância com a missão institucional da Embrapa Uva e Vinho, desde longa data vêm sendo desenvolvidas ações de pesquisa e desenvolvimento que têm gerado importantes resultados no tocante ao componente ambiental. E isto ocorre porque é comprovada a necessidade de buscar-se o desenvolvimento sustentado do espaço rural, tendo-se em vista as exigências de mercado, dos produtores e dos órgãos ambientais em reduzir-se o impacto ambiental da atividade produtiva.

É neste contexto que o controle biológico se insere. Ao maximizar o uso de organismos naturais no manejo de pragas e doenças, esta tecnologia contribui decisivamente para que a produção se dê com reduzido impacto, em benefício da almejada sustentabilidade. Esta publicação é resultante de estudos de pesquisadores da Embrapa Uva e Vinho e de outras Unidades da Embrapa, além de essenciais parceiros, os quais, em parceria, têm contribuído para a melhoria do conhecimento sobre esta importante área.

Temos certeza que as informações aqui divulgadas servirão para o maior conhecimento e uso do controle biológico, bem como de estímulo e suporte para novas ações de pesquisa que resultem em tecnologias ambientalmente limpas e tecnicamente viáveis.

Alexandre Hoffmann
Chefe-Geral
Embrapa Uva e Vinho

Sumário

Isolamento de antagonistas a patógenos que colonizam ferimentos de plantas <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	9
Obtenção de epífitas de frutos e seleção de antagonistas no controle de podridões de pós-colheita <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	13
Isolamento de colonizadores de clamidosporos de <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	17
Isolamento de bactérias do rizoplasma e endorizosfera e seu efeito na colonização de raízes e na promoção do crescimento de plantas <i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	21
Isolamento de antagonistas para controle de doenças vasculares <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	27
Avaliação do efeito protetor e curativo de antagonistas a patógenos que colonizam folhas <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, Margareth Zamboni-Pinotti e Ana Elisa Silveira Perez</i>	31
Multiplicação de <i>Clonostachys rosea</i> <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Gilberto Dall'Onder</i>	35
Seleção de fungos endofíticos em fruteiras e flores <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Margareth Zamboni-Pinotti</i> ...	39
Isolamento seletivo de bactérias ativas para nucleação de gelo <i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	43

Isolamento de fungos micorrízicos	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	45
Isolamento seletivo de <i>Bacillus</i>	
<i>Wagner Bettiol</i>	49
Obtenção de mutantes e competitividade de isolados de bactérias resistentes a antibióticos	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	53
Obtenção de mutantes de <i>Trichoderma</i> spp. resistentes a fungicidas	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	55
Identificação de bactérias por análise dos ácidos graxos	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	59
Identificação de bactérias pelo sequenciamento de genes 16S ribossômico (16S rDNA)	
<i>Fernando Dini Andreote</i>	67
Identificação e diferenciação de linhagens de leveduras antagônicas a fitopatógenos utilizando sondas convencionais como indicadores na reação de polimerização em cadeia	
<i>Luis Fernando Revers e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	75
Produção de sideróforos por rizobactérias	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	79
Produção de antibióticos por microrganismos	
<i>Rosa T. S. Frighetto e Itamar Soares de Melo</i>	83

Produção de bactérias para uso no controle biológico	
<i>Deise Maria Fontana Capalbo</i>	97
Encapsulamento de microrganismos	
<i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	103
Roteiro para formulação experimental pó molhável de biopesticida (sigla internacional WP)	
<i>Cláudia Medugno</i>	109
Isolamento de actinomicetos visando ao controle biológico de fitopatógenos	
<i>Joelma Marcon, Jose Antonio da Silva e Maria Carolina Quecine</i> ...	117
Avaliação <i>in vitro</i> da colonização de raízes por rizobactérias	
<i>Brígida P. Vilar Queiroz e Itamar Soares de Melo</i>	121
Seleção de rizobactérias capazes de formarem biofilmes	
<i>Francisco Eduardo de C. Costa e Itamar Soares de Melo</i>	125
Avaliação ecotoxicológica de microrganismos em organismos não-alvo, organismos aquáticos e mamíferos	
<i>Vera Lúcia de Castro e Cláudio Jonsson</i>	129
Apêndice	
Meios de Cultura e Soluções	137

Isolamento de bactérias do rizoplane e endorizosfera e seu efeito na colonização de raízes e na promoção do crescimento de plantas

Itamar Soares de Melo ¹

Rosa Maria Valdebenito Sanhueza ²

Tem-se verificado a presença de *Pseudomonas* sp., tanto na superfície de raízes como na endorizosfera (FOSTER, 1981). Algumas destas bactérias, isoladas da endorizosfera, produzem metabólitos fitotóxicos, deletérios às plantas, prejudicando o crescimento normal. Por outro lado, rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) e bactérias promotoras da emergência são comumente isoladas da rizosfera e rizoplane. Elas têm mostrado ser efetivas em condições de campo, funcionando, provavelmente, por produzirem um efeito antibiótico sobre patógenos principais e secundários e por produzirem sideróforos que formam quelatos com ferro, tornando-o indisponível aos fitopatógenos. Outros mecanismos diretos pelos quais as RPCPs estimulam o crescimento das plantas são: fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, tornando o fósforo disponível às plantas, produção de fitohormônios e redução dos níveis de etileno (GLICK, 1995).

Objetivos

Isolar rizobactérias do rizoplane e endorizosfera, principalmente do grupo *P. fluorescens* - *putida*, observar diferenças na colonização de raízes por estas bactérias, detectar aquelas que estimulam o desenvolvimento das plantas e selecionar *in vitro* rizobactérias produtoras de ácido indol-acético.

¹ Eng. Agrôn., Doutor, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP.

² Eng. Agrôn., Doutor, Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, 95700-000 Bento Gonçalves, RS.

Protocolo

Parte I - Isolamento de rizobactérias

1. Coletar o sistema radicular de plantas. No caso de se querer obter o maior número possível de bactérias diferentes deve-se proceder coleta de solos de diversas regiões agrícolas.
2. Proceder à semeadura da espécie vegetal em estudo nos diferentes tipos de solos. Desinfestar superficialmente as sementes antes do plantio. Deixar os vasos em condições de casa-de-vegetação e proceder a colheita em tempo pré-estabelecido.
3. Coletar as raízes das plântulas; lavar em água corrente e colocar 0,3 g de pedaços de raízes em tubos de ensaio contendo 5 mL de 0,1 M de MgSO_4 . Agitar vigorosamente em vortex, ou deixar agitando em shaker por aproximadamente, 30 minutos.
4. Fazer diluições em série e plaquear em meio King B (KB).
5. Após três dias de incubação, proceder à seleção de bactérias obtidas da superfície de raízes.
6. Para isolamento de bactérias da endorizosfera, desinfestar pedaços de raízes com H_2O_2 (10%; 15 segundos). Enxaguar três vezes com MgSO_4 (0,1 M), triturar com um bastão de vidro.
7. Proceder às devidas diluições e plaquear em meio KB e proceder à purificação de colônias.

Parte II – Avaliação da produção de ácido indol-acético (AIA) por rizobactérias

A produção de fitohormônios tem sido documentada como sendo um dos mecanismos pelos quais as rizobactérias estimulam o crescimento das plantas. Inúmeras rizobactérias, incluindo *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium* estão envolvidas ativamente na síntese de giberelinas, auxinas e citocininas. Nestes microrganismos, a síntese de AIA pode ocorrer por diferentes vias metabólicas. Uma delas é a via IPyA (L- triptofano [Trp] – IPyA – 3 – indol acetaldeído – AIA).

O método descrito a seguir é ideal para a triagem de um grande número de isolados bacterianos, visando à seleção de isolados produtores de AIA.

Protocolo

1. Repicar pontualmente isolados bacterianos em meio NA suplementado com 10 mM de NH_4Cl_2 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de L-triptofano;
2. Cobrir as colônias da placa de Petri com uma membrana de nitrocelulose e incubar por 48 horas;
3. Após incubação, retirar as membranas e imergí-las no reagente de Salkowsky;
4. Colônias produtoras de AIA tornam-se rosadas quando reagem com a solução indicadora (a exemplo do que se vê na Figura 1).

Foto: Itamar Soares de Melo



Fig. 1: Aspecto geral de colônias bacterianas de cor rosa, produtoras de AIA.

É conveniente a inclusão de um controle positivo como, por exemplo, *Gluconacetobacter diazotrophicus* BR 11281 (Embrapa Agrobiologia).

Parte III – Seleção de bactérias promotoras do crescimento de plantas

1. Todas as bactérias isoladas e purificadas devem ser cultivadas em meio KB por 24 horas a 26-28°C.
2. Encher vasos de plástico com vermiculita ou areia lavada com ácido muriático (comercial). Se preferir, o ensaio pode ser feito em tubos de ensaio grandes.
3. Desinfestar sementes da planta, da qual foram isoladas as bactérias, com solução aquosa de hipoclorito de sódio comercial, concentrado (3:1) por 1 minuto.
4. Após serem enxaguadas com água esterilizada, as sementes são postas a germinar sobre papel de filtro em uma placa de Petri.
5. Após germinadas, as plântulas são transplantadas para os vasos e/ou tubos. Regar com solução nutritiva e introduzir um volume de 0,5 mL de suspensão bacteriana de 10^9 ufc/mL.
6. Deixar os vasos sob câmara de crescimento até a avaliação, que deve ser feita tomando-se como parâmetro o efeito observado no crescimento das plantas testemunha.
7. Após este período, fazer medições de planta e peso seco de raiz e parte aérea.
8. Isolados com efeitos estatisticamente significantes sobre o crescimento de plântulas, são avaliados novamente, por duas vezes, sobre o crescimento de plantas, em solo natural e esterilizado.
9. Os isolados selecionados no item 7 podem ser retestados em condições assépticas a fim de comprovar mais adequadamente o efeito sobre o crescimento de plântulas.

Referências Bibliográficas

BAKER, R. Molecular biology in biological control of soilborne pathogens. In: DUPONT-UCLA SYMPOSIUM ON MOLECULAR STRATEGIES FOR CROP PROTECTION, 1986, Steamboats Springs, Colorado. **Proceedings...** New York: Liss, 1987. p.115-124. Editado por Charles J. Arntzen e Clarence Ryan.

FOSTER, R. C. The ultrastructure and histochemistry of the rhizosphere. **New Phytologist**, v. 89, n. 2, p. 263-273, 1981.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p. 109-117, 1995.

LYNCH, J. M.; CLARK, S. J. Effects of microbial colonization of barley roots on seedling growth. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 56, n. 1, p. 47-52, 1984.