

Métodos Utilizados no Biocontrole de Fitopatógenos

Metodos usados no ...

2007

LV-2008.00018



CNPMA-7500-2



Embrapa



*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 antagonistas para controle de doenças vasculares

*Rosa Maria Valdebenito Sanhuesa*¹

*Itamar Soares de Melo*²

As doenças causadas por organismos do solo que penetram pelas raízes e colonizam o sistema vascular das plantas são as que apresentam maior dificuldade de controle. Este problema relaciona-se principalmente à impossibilidade técnica e econômica de suprimir o patógeno no solo e/ou de atingi-lo no local protegido onde se localiza: no sistema vascular das plantas.

As práticas de controle recomendadas para este tipo de doença são variadas e visam reduzir a população do patógeno no solo, com práticas culturais e fungicidas, proteger as raízes das plantas e utilizar cultivares resistentes.

Em muitos casos, porém, essas medidas não têm sido suficientes para o controle econômico dessas enfermidades. O uso do controle biológico destas doenças tem sido proposto para complementar os tratamentos de desinfestação do solo em condições de campo ou de substratos artificiais em culturas protegidas. O biocontrole consta do tratamento das raízes, evitando ou diminuindo a infecção e/ou a colonização pelo patógeno. Os organismos antagonistas devem ser adaptados às características do local, com alta taxa de crescimento e multiplicação, e com eficiente efeito antagonístico ao patógeno. Provavelmente estes organismos serão encontrados em solos onde a doença ocorra com menor frequência ou em solos supressivos. Na seleção de colonizadores de raízes, os organismos mais competitivos provavelmente serão obtidos do rizoplane. Na sua maioria serão constituídas por rizobactérias de plantas sadias desenvolvidas em locais onde a doença ocorre ou em solos supressivos. Colonizadores radiculares e do sistema vascular serão também de interesse para seleção. A competição desses organismos ocorrerá nos vasos das plantas, exercendo proteção pela ocupação e competitivas pelo sítio e, provavelmente, também pela indução de resistência.

¹ Eng. Agrôn., Doutor, Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, 95700-000 Bento Gonçalves, RS.

² Eng. Agrôn., Doutor, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP.

Objetivos

Seleção de organismos para competir com patógenos vasculares a partir do solo, raiz e sistema vascular das plantas.

Protocolo

Isolamento, seleção de isolados e bioensaios

1. Obtenção de isolados a partir do solo: quatro subamostras constituídas de 1 g de solo rizosférico ou de solos provavelmente supressivos serão suspensas separadamente em 100 mL de ágar-água 0,1% e homogeneizadas durante 10 minutos. Cada amostra será submetida à diluição seriada até a concentração 10^6 . Para obtenção de actinomicetos 0,2 mL da diluição 10^3 será distribuída em meio de cultura ágar-glicerina asparaginato. Para bactérias pode ser utilizada a diluição 10^3 no meio King B, e para fungos as diluições 10^4 e 10^6 se meio de Martin com 0,1 g de Agrimicina.
2. Obtenção de isolados do rizoplane: raízes finas de plantas sadias serão lavadas com detergente e enxaguadas com água destilada. A seguir, cada amostra será colocada em erlenmeyer ou tubos de vidro com água destilada necessária para cobri-la e submeter a agitação durante 1 hora ou a ultra-som por 30 segundos. Amostras de 0,2 mL da suspensão obtida das diluições 10^1 e 10^2 serão distribuídas nos meios citados, para obtenção de organismos do solo (item 1).
3. Obtenção dos organismos endófitos: amostras de raízes e do caule de plantas sadias serão desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio 0,1% e enxaguadas com água destilada. A seguir, serão retiradas as epidermes de cada segmento amostrado e, separadamente, agitadas em solução salina 0,85% durante 5 minutos. A suspensão será filtrada em gase e preparadas diluições aquosas 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . A suspensão original e as diluições podem ser distribuídas nos meios de cultura King B e meio de Martin. As colônias morfológicamente diferentes obtidas no meio de cultura deverão ser purificadas e codificadas.
4. Seleção de antagonistas para evitar a recontaminação do solo: a avaliação da colonização do substrato esterilizado pelos organismos isolados será feita preparando suspensões com concentrações de 10^8 e 10^{11} propágulos por mL. As triagens serão iniciadas colocando volumes de 20 a 40 mL de cada suspensão em vasos com 200 cc de solo úmido. Quatro a seis dias após a incorporação de cada microrganismo, será introduzido no solo o patógeno, na

quantidade adequada para produzir 80 a 90% de infecção das plantas. Uma semana após a colonização do solo pelo patógeno, serão transferidas mudinhas da planta susceptível, aparando-se as raízes para assegurar o estabelecimento da doença. Na avaliação podem ser considerados os sintomas reflexos, índices de necrose vascular, peso seco da parte aérea e raízes e/ou a população do patógeno no solo e no sistema vascular das plantas. Os organismos que suprimem a doença, total ou parcialmente nos vasos, serão selecionados para um segundo processo de seleção. Na primeira triagem podem ser utilizados dois vasos enquanto que nos trabalhos posteriores é recomendável utilizar quatro a oito vasos contendo uma a quatro plantas em cada um.

5. Seleção de organismos para controle do patógeno no solo contaminado: para verificar o efeito dos organismos em avaliação sobre o patógeno previamente estabelecido recomenda-se incorporar o organismo em estudo conforme o método descrito no item 4, e após cinco a sete dias transferir as plântulas. A avaliação e o processo de seleção podem ser semelhantes aos apresentados no item 4. Para estudos em solo sem esterilização, recomenda-se que a concentração do organismo estudado seja aumentada em duas a cinco vezes.
6. Seleção de organismos protetores da infecção ou colonização pelo patógeno: as raízes das mudas devem ser levemente aparadas logo antes da sua imersão na suspensão do provável antagonista. A inoculação com o patógeno pode ser feita incorporando-o no solo ou pela imersão das raízes na suspensão de propágulos do agente causal da doença após o tratamento com o provável antagonista. Neste tipo de trabalho as concentrações dos organismos avaliados é de 70% de transmitância para bactérias e 10^6 a 10^8 propágulos/mL nos fungos. As suspensões devem ser preparadas sem resíduo dos meios de cultura, ou seja, com células lavadas por centrifugação e ressuspensas em água destilada ou solução tampão. O período de imersão deve ser estudado, podendo ser utilizado 30 minutos; e 1, 4, 12 ou 24 horas antes da inoculação com o patógeno.

Para avaliação do biocontrole serão comparados os níveis de infecção das testemunhas inoculadas com os das plantas tratadas com os organismos em avaliação. Efeitos promotores de resistência poderão ser detectados nesta seleção de antagonistas.

Literatura Consultada

BAKER, R.; HANCHEY, P.; DOTTORAR, S. D. Protection of carnation against *Fusarium* stem rot by fungi. **Phytopathology**, v. 68, n. 10, p. 1045-1051, 1978.

LANGERAK, C. J. The role of antagonistic in the chemical control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *narcissi*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 83, p. 365-381, 1977. Suplemento 1.

LOCKE, J. C.; MAROIS, J. J.; PAPAIVIZAS, G. C. Biological control of *Fusarium* wilt of greenhouse-grown *Chrysanthemum*. **Plant Disease**, v. 69, n. 2, p. 167-169, 1985.

MICHAEL, A. H.; NELSON, P. E. Antagonistic effect of soil bacteria on *Fusarium roseum* "Culmorum" from carnation. **Phytopathology**, v. 62, n. 5, p. 1052-1056, 1972.

MOOR, K. J.; WONG, P. T. W. (eds.) INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 4., 1983, Melbourne. **Ecology and management of soilborne plant pathogens**. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, 1985. 358 p.

OGAWA, K.; KOMADA, H. Biological control of *Fusarium wilt* of sweet potato with cross protection by nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. In: PARKER, C. A.; ROVIRA, A. D.; MOORE, K. J.; WONG, P. T. W.; KOLLMORGEN, J. F. **Ecology and management of soilborne plant pathogens**. Minnesota: American Phytopathological Society, 1985. 358 p.