

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 rizoplano 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 fungos micorrízicos

Itamar Soares de Melo ¹

Rosa Maria Valdebenito Sanhueza ²

Os fungos micorrízicos arbusculares (MA) são formados pelos componentes: raízes da planta hospedeira, hifas do fungo micorrízico no interior das raízes e hifas externas que se estendem através da rizosfera. Através de modificações das hifas, originam-se os arbúsculos, vesículas e esporos.

Há fortes evidências na literatura de que os fungos MA afetam significativamente o efeito de alguns patógenos, na planta hospedeira, além de aumentar a capacidade das plantas em absorver fósforo, alguns micronutrientes e água.

Objetivo

Estudar o efeito de fungos MA no controle de alguns patógenos de solo: *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. e *Fusarium solani*.

Protocolo

Parte I – Isolamento de fungos micorrízicos arbusculares

1. Colocar aproximadamente 50 mL de solo em 1 litro de água. Agitar com um bastão.
2. Passar a solução do solo por um conjunto de peneiras cujas malhas devem ser de 250, 105 e 53 μ . Repetir a operação várias vezes.
3. Recolher os esporos em um béquer com água.
4. Centrifugar as frações recolhidas nas peneiras (esporos + grãos de areia e outros sedimentos) com água destilada por um tempo total de 3 minutos a 3.000 rpm.

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.

5. Eliminar cuidadosamente o sobrenadante.
6. Adicionar uma solução de sacarose (30-50% p.v.) ao precipitado dos tubos e mexer suavemente com um bastão.
7. Centrifugar novamente por 2 minutos a 3.000 rpm.
8. Passar com cuidado o sobrenadante por uma peneira de 44 μ e lavar com bastante água destilada até que diminua a concentração de sacarose na parede dos esporos.
9. Coletar os esporos e proceder à contagem dos mesmos com auxílio de placa estriada e dividida em seis partes sob microscópio estereoscópico.

Parte II – Avaliação do estabelecimento dos fungos micorrízicos

1. Raízes micorrizadas são lavadas em água corrente e, caso não sejam imediatamente avaliadas, devem ser acondicionadas em frascos contendo solução AF A (ácido acético glacial, 5 mL; formol, 13 mL e álcool etílico, 200 mL).
2. Clarear uma amostra de raízes fixadas com KOH 10% em banho-maria a 90°C por 40 minutos. Caso o tratamento não surta efeito, pode-se aumentar o tempo de exposição.
3. Lavar as raízes com água corrente.
4. Lavar as raízes com HCl 1% a frio por 3 minutos.
5. Proceder à coloração com solução lactofenol mais “trypan-blue” 1%, em banho-maria a 90°C por 10 minutos.
6. Escorrer o corante e recobrir as raízes com solução de lactofenol incolor, por aproximadamente 12 horas.
7. Escorrer o lactofenol para retirar o excesso de corante e novamente cobrir as raízes com lactofenol incolor.

Parte III – Determinação da porcentagem de colonização de raízes por fungos micorrízicos arbusculares

1. Pesar aproximadamente 500 mg de raízes coradas com "trypan blue", cortá-las em pedaços de 1 cm e espalhá-las em placas de Petri, cujo fundo fora marcado com linhas paralelas transversais, formando um quadrilátero cujos quadrados medem 1,2 cm.
2. Contar sob microscópio estereoscópico o número de intersecções entre os pedados de raiz com as linhas horizontais ou verticais (numa só direção), e observar as raízes que têm ou não, naquele ponto, a presença de estruturas fúngicas características dos fungos MA. O cálculo da porcentagem de colonização de raiz é feito utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de colonização de raiz} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de raízes com presença de MA}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de raízes}} \times 100$$

Literatura Consultada

- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet surviving and decouling. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, p. 235-244, 1963.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.
- PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p. 158-161, 1970.
- SILVEIRA, A. P. D. Ecologia de fungos micorrízicos arbusculares. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 61-86.