

# 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](mailto: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 seletivo de *Bacillus*

Wagner Bettiol<sup>1</sup>

O gênero *Bacillus* é formado por bactérias em forma de bastonete, móveis e com formação de endosporo altamente resistente ao calor. Katz e Demain (1977) estabeleceram que membros do gênero *Bacillus* produzem cerca de 167 antibióticos, principalmente polipeptídeos. Desse total, 66 são elaborados por isolados de *B. subtilis*. Dos metabólitos produzidos verifica-se que podem apresentar ação contra bactérias Gram positivas e negativas e fungos. Esses autores apontam, dentre outros, os seguintes antibióticos produzidos por *B. subtilis*: micobacilina, subtilina, bacilomicina, bacilisina, fungistamina, bulbiformina, bacilina, subsporina, bacilocina, micosubtilina, fungocina, iturina e eumicina.

*Bacillus subtilis* e seus metabólitos vêm sendo estudados como agentes de controle biológico de diversos fitopatógenos da filosfera, rizosfera, espermosfera e em pós-colheita, com relativo sucesso. Esse agente de controle biológico foi relatado controlando *Uromyces phaesoli*, *Puccinia pelargonii-zonalis*, *Hemilieia vastatrix*, *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris sorokiniana*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum*, *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, *Macrophomina phaseolina*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme*, *Cylindrocladium*, *Erwinia amylovora*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum*, entre outros.

Além de *B. subtilis*, outras espécies, como *B. cereus* e *B. pumilus* têm ação sobre fitopatógenos.

A capacidade de produzir antibióticos, junto a substâncias que atuam como surfactantes, pode ser uma das maneiras pelas quais *Bacillus subtilis* exerce antagonismo a várias espécies de fitopatógenos. Entretanto, além da antibiose essa bactéria pode agir por indução de resistência do hospedeiro.

Diversos produtos comerciais à base de *Bacillus subtilis* estão no mercado, como por exemplo: RhizoPlus (FZB Biotechnik GmbH), Serenade 1,34 SC (AgraQuest, Inc.), Kodiak (Gustafson, Inc.), System 3 (Helena Chemical Co.)

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

## Objetivo

Isolamento seletivo de *Bacillus* spp.

## Protocolo

1. Coletar material vegetal (raiz, caule, fruto e folha) e lavar com jato de água destilada esterilizada.
2. Recolher o lavado em béquer esterilizado e filtrar em carrada de gaze, distribuindo o filtrado em tubos de ensaio esterilizados.
3. Colocar os tubos em banho maria a 80°C por 20 minutos.
4. Retirar alíquotas para obter diluição em série na razão 1:10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ).
5. Transferir 0,2 mL da suspensão das diluições para placa com BDA ou ágar nutritivo (AN) e espalhar com auxílio de alça de Drigalski.
6. Após 24 horas de incubação a  $\pm 29^{\circ}\text{C}$  no escuro, repicar as colônias de *Bacillus* spp. que crescerem para tubos com BDA ou AN.

Atenção: Substituição das passagens 1 e 2.

Retirar discos ou fragmentos das folhas, frutos, caules ou raízes e colocar num tubo com 20 mL de água destilada esterilizada e deixar por 10 minutos em banho ultra-som ou sob agitação.

O isolamento também pode ser realizado a partir de solo ou substrato, para tanto, substituir as passagens 1 e 2, colocando 10 g de solo em 90 mL de água destilada esterilizada.

Para identificação das bactérias ao nível de espécies, realizar os testes bioquímicos (BUCHANAN; GIBBONS, 1975) ou utilizar a técnica baseada na análise de ácidos graxos da membrana celular em cromatografia gasosa, utilizando software de identificação de microrganismos (MIDI, Sherlock<sup>®</sup> TSBA Library version 5.0, Microbial ID, Newark, DE, USA), similar ou versões mais recentes.

## Referências Bibliográficas

BUCHANAN, R. I.; GIBBONS, N. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8. ed. Baltimore: The Williams & Wilkens, 1975. 1268 p.

KATZ, E.; DEMAIN, A. L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. **Bacteriological Review**, v. 41, n. 2, p. 449-464, 1977.

NORRIS, J. R.; BERKELEY, R. C. W.; LOGAN, N. A.; O'DOONELL, A. G. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: STARR, M. P.; STOLP, H.; TRUPER, H. G. (Ed.). **The prokaryotes**. New York: Springer-Verlag, 1981. p. 1711-1742.