

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

Obtenção de mutantes de *Trichoderma* spp. resistentes a fungicidas

*Itamar Soares de Melo*¹

*Rosa Maria Valdebenito Sanhueza*²

Uma das estratégias que tem resultado num controle efetivo de patógenos é a associação dos métodos de controle químico e biológico. Neste caso, a população de antagonistas não deve ser afetada pelo pesticida, o que deve ser usado em doses reduzidas.

Para estabelecimento de linhagens antagonistas efetivas e seu uso associado com fungicidas deve-se proceder, ou à seleção de produtos químicos que não interfiram com a sobrevivência do antagonista ou à obtenção de linhagens de antagonistas resistentes geneticamente. Tais linhagens podem ser obtidas via mutação-seleção, através de irradiação com luz ultravioleta; com raios gama, mutagênicos químicos ou via ciclo parassexual caso seja conhecido. A técnica de fusão de protoplastos abre a possibilidade de obtenção de linhagens melhoradas em fungos com ausência de ciclo sexual e parassexual ou onde os cruzamentos não são possíveis por incompatibilidade devido à parede celular.

O método clássico de melhoramento através da mutação-seleção é simples e vem propiciando, até hoje, resultados satisfatórios. As mutações ocorrem espontaneamente, embora com frequências pequenas e, quando a variabilidade natural é explorada, pode-se recorrer aos agentes mutagênicos para aumentar a taxa de mutação. No entanto, como as mutações são aleatórias, pode ocorrer o aparecimento de muitos mutantes com características indesejáveis juntamente com aquelas de interesse. Assim, os diferentes mutantes obtidos devem ser ensaiados para verificação do seu potencial antagonístico e manutenção de resistência ao fungicida desejado.

Geralmente, recorre-se à irradiação ultravioleta (UV-A) para induzir mutação em microrganismos. A luz ultravioleta produz uma excitação de elétrons, porém não ionização. A maior parte dos seus efeitos são mutações gênicas ou de "ponto".

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.

Objetivo

Induzir resistência a fungicidas em *Trichoderma* spp., através de irradiação com luz ultravioleta, visando a utilização de mutantes resistentes conjuntamente com subdosagens de produtos químicos para controlar um determinado patógeno, ou vários patógenos simultaneamente.

Protocolo

1. Suspensões de conídios de formação recente (10^7 /mL) de *Trichoderma* spp. são obtidas em solução de Tween 80. O fungo pode ser cultivado em qualquer meio de cultura para produção de conídios.
2. A suspensão de conídios (10 mL) é vertida em uma placa de Petri esterilizada e submetida à irradiação através de uma fonte de luz ultravioleta de ondas curtas (5 Joules/m²/s.). Todo o processo deve ser realizado no escuro. O tempo/dose de irradiação deve ser previamente determinado através da curva de sobrevivência. Assim, a dose recomendada é aquela que causa aproximadamente 2 a 5% de sobrevivência dos conídios.
3. Diluir a suspensão de conídios irradiados em solução salina 0,85% e plaquear alíquotas de 0,1 mL em meio BDA suplementado com a concentração usual do fungicida desejado.
4. Incubar as culturas a 28°C, em ausência de luz, até o aparecimento de colônias.
5. Repicar as colônias supostamente resistentes para meio suplementado com fungicida.
6. Efetuar testes de reversão, subcultivando alternadamente os mutantes em meio com e sem o fungicida.
7. Comprovada a estabilidade dos mutantes, proceder a testes de antagonismo, sempre comparando-os com o isolado selvagem.

Literatura Consultada

MOITY, T.; PAPAIVIZAS, G. C.; SHATLA, M. N. Induction of new isolates of *Trichoderma harzianum* tolerant to fungicides and their experimental use for control of white rot of onion. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 396-400, 1982.

AHMAD, J. S.; BAKER, R. Competitive saprophytic ability and celulolytic activity of rhizosphere-competent mutant of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 77, n. 2, p. 358-362, 1987.

PAPAIVIZAS, G. C.; LEWIS, J. A.; MOITY, T. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. **Phytopathology**, v. 72, n. 1, p.126-132, 1982.