

# 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

# Produção de sideróforos por rizobactérias

---

Itamar Soares de Melo <sup>1</sup>

Rosa Maria Valdebenito Sanhueza <sup>2</sup>

Mais de um mecanismo tem sido sugerido pelos quais as bactérias do gênero *Pseudomonas*, têm influenciado o crescimento das plantas, e são eles: competição por sítios, síntese de substâncias promotoras do crescimento de plantas e antagonismo através da produção de antibióticos ou substâncias quelantes chamadas sideróforos. Como o elemento Fe é essencial tanto para plantas como para microrganismos, uma competição contínua por este elemento ocorre na rizosfera. As *Pseudomonas* do grupo *fluorescens-putida* produzem sideróforos com alta atividade quelante, especialmente com relação ao ferro férrico. Estes compostos são predominantemente sintetizados sob condições limitantes de ferro.

Mutantes negativos para produção de sideróforos falham em induzir efeitos benéficos como a eliminação e/ou diminuição da atividade de fitopatógenos na rizosfera.

## Objetivos

Identificar e selecionar rizobactérias antagônicas a fungos fitopatogênicos e produtoras de sideróforos.

## Protocolo

### Parte I – Teste de Antagonismo *in vitro*

1. Suplementar o meio KB com as seguintes concentrações de FeCl<sub>2</sub>: 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol.
2. Cultivar em três pontos equidistantes da placa cada bactéria. Usar três placas para cada tratamento. Proceder à inoculação com palito esterilizado.
3. Incubar as culturas por 24 horas, a 28°C.

---

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

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

4. Após a incubação, pulverizar uma suspensão de conídios de *Fusarium solani* sobre as culturas de bactérias já desenvolvidas.
5. Incubar por mais 2-3 dias, verificar os halos de inibição e mensurá-los. As linhagens produtoras de sideróforos não produzirão halos de inibição nas concentrações crescentes de  $Fe^{+3}$ .

## **Parte II – Produção de sideróforos em meio líquido**

1. Cultivar as bactérias, supostamente produtoras de sideróforos, em meio líquido livre de ferro (SCHER; BAKER, 1982).
2. Adicionar 0,1 grama de  $FeCl_2 \cdot L$  à metade do volume do meio líquido.
3. Usar porções de 50 mL de meio em erlenmeyers, para cultivo das bactérias.
4. Incubar sob agitação, em agitador rotativo, a 26-27°C por 24 horas.
5. Após este período, filtrar as suspensões das bactérias através de membranas de filtro de policarbonato (0,2  $\mu m$ ).
6. Ajustar o pH de cada filtrado a 5.5.
7. Proceder à leitura de cada tratamento/filtrado em espectrofotômetro. Medir os valores de absorbância em 350 a 500 nm. Os tratamentos controle consistem de água destilada e 0,1 gramas de  $FeCl_2/L$ . Observação: para avaliação, Schwyn e Neilands (1987) adotaram a técnica de eletroforese.

A seleção de linhagens bacterianas produtoras de sideróforos pode ser alcançada também por meio da presença do gene que codifica para o sideróforo pioverdina, que pertence à classe dos hidroxamatos. Nesse caso, utiliza-se a amplificação, por PCR, do gene, usando-se o “primer” específico para esse fim (PACHECO et al., 2001).

## Referências Bibliográficas

GEELS, F. P.; SCHIPPERS, B. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 108, n. 3-4, p. 207-214, 1983.

PACHECO, F. T. H.; SILVA, M. E.; TSAI, S. M. Caracterização molecular de genes receptores de Ferro em *Xylella fastidiosa*. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOTECNOLOGIA, 1., 2001, São Paulo. **Resumos**. São Paulo: [s.l.], 2001. 1 CD-ROM.

SCHER, F. M.; BAKER, R. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 12, p. 1567-1573, 1982.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Siderophores from agronomically important species of the Rhizobiaceae. **Comments on Agriculture and Food Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 95-113, 1987.