

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

Encapsulamento de microrganismos

*Rosa Maria Valdebenito Sanhueza*¹

*Itamar Soares de Melo*²

A falta de formulações adequadas para microrganismos no controle de fitopatógenos é um sério entrave no campo dos fungicidas microbianos. Vários fatores têm limitado a efetividade do fungo antagonico. Entre estes estão as dificuldades em preparar e aplicar tais formulados, viabilidade no armazenamento, reduzida sobrevivência na superfície do solo e requerimento de alta umidade relativa por um período prolongado para iniciar a germinação no local tratado.

Formulações do tipo encapsulado granulado ("pellets") podem ser armazenadas e após um certo período, serem reativadas por reidratação. No caso de utilização do alginato como polímero de géis granulados este pode proteger o fungo da radiação ultravioleta, aumentando a vida útil no campo.

Na preparação do granulado algumas variáveis devem ser consideradas, tais como: concentração do princípio ativo, tipo e concentração do polímero, tipo e concentração do inerte, concentração e volume da solução geleificante e tempo de permanência dos "pellets" na solução salina.

Os alginatos são sais monovalentes de ácido alginico extraídos de diferentes tipos de algas marrons. São disponíveis como sais solúveis em água, tais como: alginato de amônia, alginato de potássio e alginato de sódio; ou como sal de cálcio insolúvel em água. Outro produto é o propilenoglicolalginato solúvel em água, sendo um ácido alginico parcialmente neutralizado e esterificado com propilenoxido.

O alginato de sódio tem sido o polímero mais estudado e tem apresentado melhores resultados para encapsulamento de esporos e micélio de fungos (Figura 1).

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

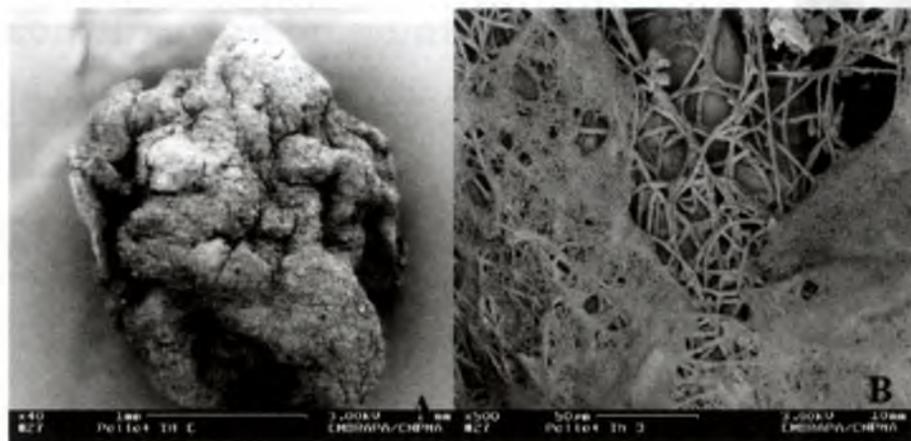


Fig. 1: Morfologia tridimensional de um grânulo visto sob microscopia eletrônica de varredura. (A) Grânulo seco. (B) Germinação miceliana de *T. harzianum* a partir de um grânulo feito com farelo de trigo e alginato (Foto: Itamar S. de Mello).

A propriedade mais explorada do alginato é a de produzir géis termorresistentes com íons divalentes, como o cálcio.

Entre os inertes mais utilizados estão o caulim e a bentonita. Para o preparo dos grânulos, diferentes tipos de estruturas dos patógenos podem ser utilizadas, como por exemplo: esporos, micélio, clamidosporos, células bacterianas, etc. A utilização conjunta de nutrientes na forma de matéria orgânica como farelo de trigo tem sido proposta. Esta alternativa porém somente pode ser utilizada quando o antagonista é um eficiente produtor de antibióticos para não permitir a utilização desses nutrientes por outros organismos.

Objetivo

Obter uma formulação do tipo granulada encapsulada ("pellets") do organismo antagonístico, na qual os propágulos sejam mantidos viáveis durante o armazenamento nas condições do ambiente e que mantenham atividade antagonística a nível de campo contra fitopatógenos.

Protocolo

1. Pesar 5 g de caulim ou bentonita (com ou sem esterilização a 120°C por 1 hora) e adicionar a este inerte 25 mL de uma suspensão de esporos (10^8 /mL) de *Trichoderma* spp., ou suspensão de outro propágulo.
2. Preparar uma solução de alginato de sódio a 1%.
3. Agitar a mistura com um bastão de vidro e adicionar a esta 75 mL de solução aquosa de alginato de sódio.
4. Misturar os ingredientes suavemente numa chapa de aquecimento com agitação. A adição de nutrientes adicionais tais como farelo de trigo pode ser feita utilizando 0,1 a 2,0 g de farelo por litro de mistura.
5. Gotejar a mistura, sob agitação, sobre uma solução de cloreto de cálcio (0,25 M). Para homogeneizar o tamanho das gotas e, portanto, dos grânulos, podem ser usadas pipetas de diâmetro semelhantes, ou uma bomba peristáltica (Figura 2).

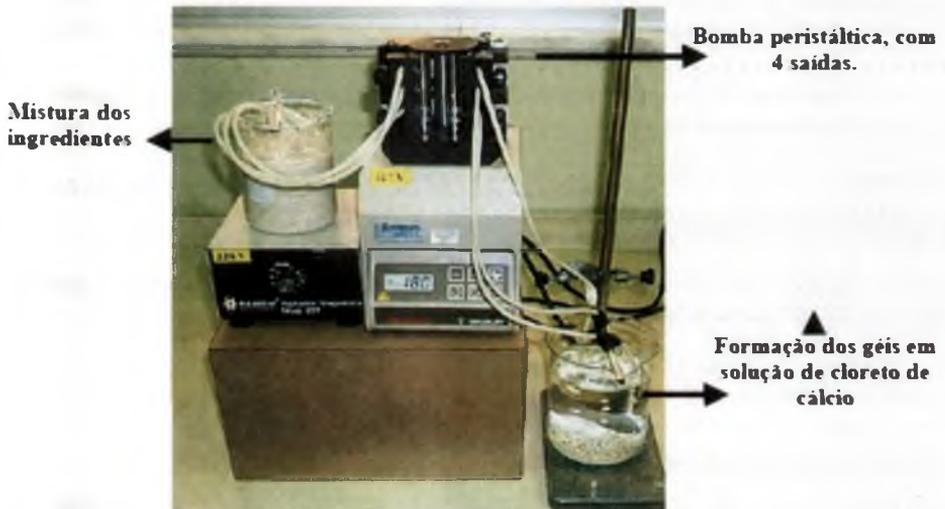


Fig. 2: Visualização de bomba peristáltica utilizada para produção de géis (Foto: I. S. Melo).

6. Decorridos 5 a 20 minutos separar os "pellets" da solução através de filtração com um funil de Buchner. Os "pellets" podem ser lavados ou não para retirar o excesso de cálcio.

7. Proceder a secagem dos "pellets" a de 35°C, em estufa com circulação de ar. Essa temperatura deve ser avaliada para assegurar a sobrevivência do organismo utilizado.
8. Para determinar a viabilidade dos esporos encapsulados plaquear aproximadamente 20 "pellets" em meio BDA, com antibiótico ou fungicidas, quando utilizar mutantes resistentes. Incubar as culturas a 25-27°C por 24 horas e contar o número de "pellets" germinados.
9. Para contar o número de propágulos contidos em um grânulo, proceder da seguinte maneira:
 - 9.1. Verter exatamente 1 mL de meio BDA, com antibiótico ou fungicida (fundente), numa lamínula que deverá estar sobre uma lâmina de microscópio e dentro de uma placa de Petri. Todo este conjunto (placa, lâmina e lamínula) deve ser esterilizado antes do uso;
 - 9.2. Sobre o meio da lamínula cultivar um grânulo, a 30°C por 48 horas;
 - 9.3. Após a incubação, retirar a lamínula com o fungo crescido e transferir para um tubo de cultura contendo 2 mL de solução salina (0.85%);
 - 9.4. Agitar para desagregação dos propágulos e proceder a contagem em hemacitâmetro.
10. Outro procedimento utilizado é dissolver os grânulos (10) em tampão fosfato (100 mL) e proceder ao plaqueamento em BDA.

Nota: No preparo da solução de alginato, adicionar 10 g deste polímero em 750 mL de água destilada previamente aquecida a 60°C.

Bibliografia Consultada

FRAVEL, O. R.; MAROIS, J. J.; LUMSDEN, R. O.; CONNICK JUNIOR, W. J. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate clay matrix. **Phytopathology**, v. 75, n. 7, p. 774-777, 1985.

KNUDSEN, G. R.; BIN, L. I. Effects of temperature, soil mixture and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. **Phytopathology**, v. 80, n. 8, p. 724-727, 1990.

LEWIS, J. A.; PAPANIZAS, G. C. Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. **Plant Pathology**, v. 34, p. 571-577, 1985.