

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
Multiplificação 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

Roteiro para formulação experimental pó molhável de biopesticida (sigla internacional WP)

Cláudia Medugno¹

Introdução

Biopesticidas são microorganismos formulados – bactérias, vírus, fungos, ou organismos mais complexos como protozoários e nematóides. O presente capítulo trata da formulação de pequenas partidas de microorganismos para bioensaios e testes preliminares de eficiência a campo ou casa de vegetação. De acordo com a ABNT, NBR-12679, Pó Molhável (WP) é uma formulação sólida, na forma de pó, para ser aplicada com pulverizadores, após suspensão em água. O pó molhável é uma formulação simples, composta de princípio ativo (os microorganismos), inerte e surfactante. À essa formulação básica é possível adicionar inúmeros adjuvantes, como os que conferem as características de deposição em folhas, agentes molhantes, espalhantes, espalhantes adesivos, dispersantes, supressores de espuma, penetrantes, reguladores de taxa de evaporação, reguladores de pH, protetores solares, tóxicos seletivos secundários, compostos gustatórios para a atração de insetos, etc. A qualidade físico-química da formulação pó molhável é avaliada a partir de parâmetros como molhabilidade, dispersibilidade, suspensibilidade, formação de espuma e estabilidade durante a estocagem. Essas propriedades estão relacionadas com a capacidade do produto dispersar em água para formar uma suspensão homogênea.

¹ Química, Ms., Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP.

Componentes principais do Pó Molhável

Princípio Ativo

Na maioria das vezes, a integridade da partícula unitária (célula, esporo, poliedro) deve ser preservada para manter a atividade biológica. O tamanho e a forma do ativo desempenham um papel importante na seleção dos demais componentes, e podem ser definidos por microscopia óptica. No caso de um pó molhável, uma grande diferença de tamanho entre o ativo e o material inerte poderá causar a segregação das partículas, mesmo no estado sólido. Como regra geral, deve-se buscar inertes com dimensões próximas àquelas do microorganismo. A sedimentação das partículas em água é diretamente proporcional ao seu tamanho e densidade. Uma suspensibilidade adequada é obtida com partículas cujo diâmetro varia entre 1 e 3 μ . Via de regra, a maioria dos microorganismos "candidatos" preenchem este requisito, e é possível formular produtos com alta suspensibilidade.

A concentração do ingrediente ativo na formulação (expressa como número de microrganismos/grama de pó molhável) pode ser obtida por contagem em hemacitômetro, após dispersão da formulação. Deve-se, entretanto, ter sempre em mente que nem todas as unidades de microrganismos contadas têm atividade biológica. Assim, a maneira de se padronizar uma formulação é única e exclusivamente através de bioensaios.

Nos casos onde o ativo é hidrofóbico, não é possível a imersão em água e ele flota. Alguns esporos do fungo *M. anisopliae* são tão hidrofóbicos que flutam quase instantaneamente e não passam pelo bico do pulverizador. É possível calcular o grau de hidrofobicidade (tensão superficial crítica para o molhamento) com um experimento simples: prepara-se uma seqüência de frascos com a seguinte composição: água pura; 90% água e 10% etanol; 80% água e 20% etanol; 70% água e 30% etanol, e assim sucessivamente até etanol puro. As partículas hidrofóbicas irão flotar nos primeiros frascos. Cada mistura tem um valor de tensão superficial, e o frasco onde as partículas submergem oferece um valor representativo de seu grau de hidrofobicidade. Com base neste valor, é possível selecionar um surfactante de forma a garantir que o ativo não flote no tanque de diluição e permaneça submerso.

As opções para a obtenção do ativo impossibilitam qualquer generalização. Meios de fermentação, condições de crescimentos, métodos de recuperação influenciam as propriedades físico-químicas e biológicas. Por exemplo, dependendo da granulometria, o meio de fermentação pode ou não ser incorporado à formulação. Para efeito do protocolo deste capítulo, a restrição é que o ativo deve estar seco (secagem ao ar, liofilização, spray dryer) e homogêneo.

Diluyente (inerte)

Os diluentes usados no desenvolvimento de pós molháveis não possuem ação pesticida, mas estão longe de ser inertes. Podem, por exemplo, alterar o microambiente em torno do ativo. As argilas, muito usadas por sua grande disponibilidade e baixo custo, são agrupadas em famílias que diferem grandemente quanto à capacidade tamponante, ao poder de contração e expansão e à capacidade de absorver água e metabólitos. Por exemplo, a família das montmorilonitas tem elevado poder de expansão e contração (bentonita). Algumas argilas e óxidos podem ser usados para melhorar a suspensibilidade e prevenir a compactação. Por outro lado, produtos sintéticos podem ter um comportamento mais próximo de um inerte. As sílicas sintéticas, por exemplo, são esferas micrométricas compactas de óxido de silício, com uma superfície lisa e sem poros. Uma vez que as propriedades diluentes podem alterar a performance do ativo, é importante que a seleção seja criteriosa, seguida de testes de compatibilidade. Muitas empresas se prontificam a enviar amostras com informações importantes, como a distribuição de tamanho de partícula.

Surfactante

O que define um surfactante é o fato da molécula apresentar duplo caráter, ou seja, uma porção polar ou iônica, usualmente chamada grupo cabeça, capaz de interagir fortemente com a água (porção hidrofílica), e uma porção hidrocarboneto, que pode ser linear ou ramificado, que interage muito fracamente com água (hidrofóbica). Os surfactantes têm a propriedade de se ligar fortemente a interfaces, por exemplo, ar-água, óleo-água, água-sólido, óleo-sólido e diminuir a energia interfacial de superfície. Eles são adicionados à formulação pó molhável para conferir molhabilidade e reduzir a sedimentação. Os sistemas surfactantes usados em pós molháveis, consistem de uma mistura de um agente dispersante e um agente molhante. A quantidade de cada componente varia de 1 a 10% do peso total da formulação. Os agentes molhantes, necessários para uma boa e rápida umectação, são usualmente, do tipo aniônico, sendo que os mais largamente empregados são os sais de sódio de alquil-benzeno sulfonato.

Os agentes dispersantes conferem a mesma carga elétrica à superfície de todas as partículas em suspensão, fazendo com que haja repulsão entre elas e, portanto, evitando floculação e aglomeração. Os dispersantes usados nas formulações WP podem ser do tipo lignosulfonatos de sódio ou cálcio, ou sulfonatos de fenóis poliméricos. Os dispersantes são geralmente pós secos, e são facilmente incorporados na formulação. Recomenda-se trabalhar com produtos comerciais de fácil aquisição, dentro do prazo de validade. Aditivos ou adjuvantes não podem interferir com o processo de infecção, e essa resposta só pode ser avaliada com bioensaios.

Objetivo

Preparar pequenas partidas de um Pó Molhável para uso em laboratório e testes de campo.

Protocolo

A seguir, uma receita típica de pó molhável – todos os produtos devem estar no estado sólido.

Tabela 1. Formulação WP típica.

Componentes	% Peso
Ativo	50 — 95
Inerte	0 — 45
Dispersante	1 — 10
Molhante	3 — 5

Fonte: Cláudia Medugno.

Métodos de Preparação de pós molháveis

1. Pesar os sólidos, inerte, surfactantes e ativo; a soma de todas as massas deve estar entre 100 e 200 gramas;
2. calcular a concentração do ativo por contagem em câmara de Neubauer ou hemacitômetro;
3. misturar vigorosamente inertes e surfactantes em um almofariz de 600 mL de capacidade;
4. incorporar o ativo com cuidado, com auxílio de uma espátula;
5. cada amostra de pó molhável é rotulada com informações como data, composição, nome do operador; a avaliação para suspensibilidade e molhabilidade;
6. apenas as que forem aprovadas no item anterior devem ser utilizadas para bioensaios e/ou armazenadas para vida de prateleira.

Métodos de Preparação de pós molháveis

1. Pesar os sólidos, inerte, surfactantes e ativo; a soma de todas as massas deve estar entre 100 e 200 gramas;
2. calcular a concentração do ativo por contagem em câmara de Neubauer ou hemacitômetro;
3. misturar vigorosamente inertes e surfactantes em um almofariz de 600 mL de capacidade;
4. incorporar o ativo com cuidado, com auxílio de uma espátula;
5. cada amostra de pó molhável é rotulada com informações como data, composição, nome do operador; a avaliação para suspensibilidade e molhabilidade;
6. apenas as que forem aprovadas no item anterior devem ser utilizadas para bioensaios e/ou armazenadas para vida de prateleira.

Vida de prateleira

A vida de prateleira pode ser definida como o tempo que o produto pode ser estocado sem que propriedades importantes sejam alteradas. A avaliação é feita para propriedades pré definidas, de tempos em tempos. A formulação que mantiver os parâmetros inalteradas pelo maior período, terá a maior vida de prateleira. O teste pode ser acelerado se a formulação for avaliada em temperaturas maiores que a ambiente, por exemplo a 25, 30, 35 e 40°C.

Alguns ativos, como conídios e blastóporos, apresentam um problema adicional porque devem ser mantidos vivos e ativos, ainda que dormente na formulação, para uma vida de prateleira aceitável, sob condições ambientais. Na presença suficiente umidade e oxigênio, os esporos irão iniciar germinação no produto embalado.

Determinação de suspensibilidade

Suspensibilidade é a capacidade das partículas de permanecerem em suspensão por um período adequado de tempo. A norma ABNT, NBR-13313 descreve o método oficial para medidas de suspensibilidade de pós molháveis.

É um método bastante trabalhoso, que requer, banhos termostatzados, balança analítica, água dura, etc. Para o propósito deste capítulo, as melhores formulações podem ser selecionadas por um processo simples e rápido. Como se trata de um método comparativo, as amostras devem receber tratamento idêntico. A provetas de valor entre 100 e 250 mL adiciona-se 1 a 5% em peso de cada formulação. Cada proveta é invertida 30 vezes (giros de 180°C), uma vez a cada dois segundos, e então retorna à posição original. Anota-se o volume de sedimento na 1ª e 2ª hora. A seguir, deixa-se em repouso por 24 horas, quando o depósito deve ser redisperso, invertendo-se novamente a proveta um número idêntico de vezes. É importante que se observe a consistência da nova dispersão formada. Em muitos casos, a amostra permanece "aguada", "rala", o que denota a impossibilidade das partículas de se dispersarem novamente. Anotar os novos volumes de sedimento após a 1ª hora. As melhores formulações são as que apresentam menores volumes de sedimento e dispersão mais "encorpada" após 24 horas.

Determinação da molhabilidade

A molhabilidade é o tempo necessário para que uma amostra, colocada em uma superfície de água, seja completamente umectada, vindo a submergir. A norma ABNT, NBR-13242 descreve o método oficial para medidas de molhabilidade de pós molháveis. Resumidamente, uma quantidade pesada de amostra é jogada na superfície de água em um béquer, e anota-se o tempo gasto para a amostra ficar completamente molhada. Para efeito comparativo, todas as amostras devem receber exatamente o mesmo tratamento. A melhor formulação, segundo esse teste, é a que submerge em menor tempo.

Referências Bibliográficas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR-8510**: agrotóxico e afins: características físicas. Rio de Janeiro, 1997.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR-12679**: agrotóxicos e afins: produtos técnicos e formulações: terminologia. Rio de Janeiro, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR-13242**: agrotóxico: determinação da molhabilidade. Rio de Janeiro, 1994. 2 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 13313**: agrotóxico: determinação da suspensibilidade. Rio de Janeiro, 2000. 4 p.

POLON, J. A. Formulation of pesticidal dusts, wettable powders and granules. In: VAN VALKENBURG, W. **Pesticide formulations**. New York: Marcel Dekker, 1973. Chapter 5, p. 143-219.

SCHER, H. B. **Advances in pesticide formulation technology**. Washington: American Chemical Society, 1984. 250 p. (ACS Symposium Series, 254).

WARD, M. G. Formulation of biological insecticides: surfactant and diluent selection. In: SCHER, H. B. **Advances in pesticide formulation technology**. Washington: American Chemical Society, 1984. Chapter 13, p. 175-184. (ACS Symposium Series, 254).

YOUNG III, S. Y.; YEARIAN, W. C. Formulation and application of baculoviruses. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Ed.) **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v. 2.