

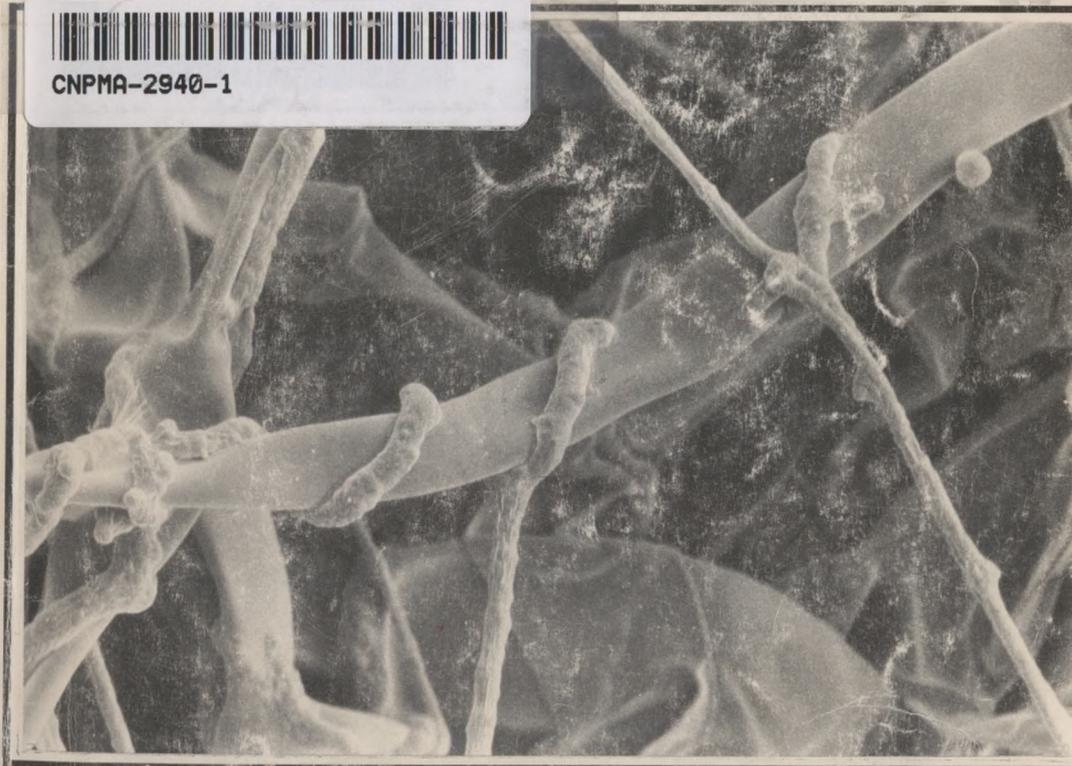
MÉTODOS DE SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS A FITOPATÓGENOS

MANUAL TÉCNICO

Metodos de selecao de ...
1995 LV-1996.00091



CNPMA-2940-1



Coordenadores

Itamar S. de Melo e Rosa Maria V. Sanhuesa

76
F528m
995
V-1996.00091

CNPMA

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária:
José Eduardo Andrade Vieira

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

Presidente: Alberto Duque Portugal
Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari
José Roberto Rodrigues Peres
Elza Angela Battaggia Brito da Cunha

Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental - CNPMA

Chefe Geral: Clayton Campanhola
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento: Ariovaldo Luchiari Junior
Chefe Adjunto Administrativo: Vander Roberto Bisinoto



Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária - MAARA
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental - CNPMA

**MÉTODOS DE SELEÇÃO DE
MICRORGANISMOS
ANTAGÔNICOS A FITOPATÓGENOS
MANUAL TÉCNICO**



Coordenadores

Itamar S. de Melo

Rosa Maria V. Sanhueza

Jaguariúna, SP

1995

EMBRAPA-CNPMA. Documentos, 1.

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental - CNPMA

Rodovia SP-340 - Km 127,5 - Bairro Tanquinho Velho

Caixa Postal 69

13820-000 Jaguariúna, SP

Fone: (019) 867-5633

Fax : (019) 867-5225

e.mail: postmaster@cnpda.embrapa.ansp.br

Comitê de Publicações: Arioyaldo Luchiari Júnior - Presidente

| | | |
|--------|--------|---|
| CLASS | 576 | Claudio Martin Jonsson - Secretário Executivo |
| CUTTER | M528 m | Cláudia Conti Medugno |
| COMBO | 091/96 | Celso João Alves Ferreira |
| | | Paulo Choji Kitamura |
| | | Márcia Izabel Fugisawa Souza |

Editoração: Ivanilde Dispatto

Tiragem: 500 exemplares

Diagramação e Impressão: Hortograf, Campinas, SP

MELO, I.S. de; SANHUEZA, R.M.V., coords. **Método de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos: manual técnico.** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995. 72p. (EMBRAPA-CNPMA. Documentos, 1).

I. Microrganismo - Antagonismo. 2. Controle biológico - Microrganismo. I. Sanhueza, R.M.V. II. Título. III. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental, Jaguariúna, SP. IV. Série.

CDD 576

APRESENTAÇÃO

Este Manual tem como objetivo fornecer informações básicas sobre métodos já estabelecidos para seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos no sentido de minimizar os esforços para obtenção segura de agentes com potencial de controle biológico. Procurou-se selecionar práticas rápidas e simples relacionadas com o assunto, mormente àquelas de interesse aos estudantes de cursos de pós-graduação ou de cursos isolados.

A carência de bibliografia especializada aliada aos anseios dos estudantes faz deste trabalho um instrumento útil que, com as críticas e sugestões advindas, aperfeiçoarão sobremaneira este manual.

Os exercícios aqui apresentados variam desde as práticas mais elementares até experimentos mais detalhados e complexos, exigindo, às vezes, laboratórios mais equipados. Assim, o manual versa sobre isolamento e seleção de microrganismos antagônicos, produção de antibióticos, formulação, etc. A maioria dos exercícios pode servir para uso em demonstrações de aulas.

Verifica-se, no entanto, que muitos métodos de seleção já são bem conhecidos, o que evita perda de tempo e materiais. As chances de se obter sucesso no controle biológico recaem em se elaborar uma boa estratégia para seleção do organismo ideal. O que deve ficar claro é que, por mais bem elaborados que sejam os ensaios *in vitro*, os experimentos em condições naturais são os preferidos. Em muitos casos, todavia, pode-se partir diretamente para seleção de microrganismos *in vivo*, onde os efeitos bióticos e abióticos prevalecem.

Agradecimentos sinceros são expressos aos colegas

Mara D. Mendes, Rosicler Martins, Valmir Alves e Dagmar N. dos Santos, pelo auxílio prestado nos exercícios práticos.

À Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner e a bibliotecária Maria Amélia de Toledo Leme pela revisão do manuscrito.

Itamar S. de Melo

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| Isolamento de antagonistas a patógenos que colonizam ferimentos de plantas Rosa Maria V. Sanhueza e Itamar S. de Melo..... | 7 |
| Obtenção de epífitas de frutos e seleção de antagonistas no controle de podridões de pós-colheita Rosa Maria V. Sanhueza e Itamar S. de Melo..... | 11 |
| Isolamento de colonizadores de clamidosporos de <i>Fusarium oxysporum</i> Itamar S. de Melo e Rosa Maria V. Sanhueza..... | 14 |
| Isolamento de bactérias do rizoplano e endorizosfera e seu efeito na colonização de raízes e na promoção do crescimento Itamar S. de Melo e Rosa Maria V. Sanhueza..... | 17 |
| Obtenção de mutantes e competitividade de isolados de bactérias resistentes a antibióticos Itamar S. de Melo e Rosa Maria V. Sanhueza..... | 20 |
| Isolamento de antagonistas para controle de doenças vasculares Rosa Maria V. Sanhueza e Itamar S. de Melo..... | 22 |
| Isolamento seletivo de bactérias ativas para nucleação de gelo Itamar S. de Melo e Rosa Maria V. Sanhueza..... | 26 |
| Produção de sideróforos por rizobactérias Itamar S. de Melo e Rosa Maria V. Sanhueza..... | 29 |
| Isolamento de fungos micorrízicos Itamar S. de Melo e Rosa Maria V. Sanhueza..... | 32 |
| Isolamento seletivo de <i>Bacillus</i> Wagner Bettiol..... | 35 |
| Obtenção de mutantes de <i>Trichoderma</i> spp. resistentes a fungicidas Itamar S. de Melo e Rosa Maria V. Sanhueza..... | 37 |
| Produção de antibióticos por microrganismos Rosa T.S. Frighetto e Itamar S. de Melo..... | 40 |
| Formulação de agentes microbianos para o controle de fitopatógenos Claudia C. Medugno..... | 47 |
| Encapsulamento de microrganismos Rosa Maria V. Sanhueza e Itamar S. de Melo..... | 60 |
| Apêndice Meios de cultura e soluções..... | 65 |

ISOLAMENTO DE ANTAGONISTAS A PATÓGENOS QUE COLONIZAM FERIMENTOS DE PLANTAS

Rosa Maria V. Sanhueza¹
Itamar S. de Melo²

Plantas que sofrem tratos culturais constituídos por cortes de ramos ou remoção dos brotos, apresentam tecidos expostos suscetíveis de serem colonizados por microrganismos. Nos cortes provocados, quando a cicatrização for demorada, os nutrientes disponíveis pela destruição dos tecidos constituem substrato para a multiplicação e colonização do setor por microrganismos. A velocidade de crescimento, a eficiência na multiplicação, a disponibilidade de nutrientes e a produção de metabólitos tóxicos a outros organismos serão fatores de vantagens para os colonizadores iniciais.

Os patógenos que iniciam a infecção nos ferimentos das plantas podem colonizar ramos de um ou mais anos, como por exemplo, *Botryosphaeria* spp., enquanto outros estabelecem-se em cortes de ramos de dois ou mais anos, como *Chodrostereum purpurem*. Condições de estresse nas plantas podem acelerar os prejuízos provocados pela infecção por estes patógenos.

O controle proposto para estes patógenos se faz pela proteção das feridas com misturas de fungicidas, com géis, tinta vinilica, ou com aplicação de organismos colonizadores e antagonônicos aos patógenos que atacam essas plantas. Esta última abordagem de controle tem vantagens quando comparada com os fungicidas por apresentar maior efeito residual. Os organismos estabelecem nos tecidos e não apresentam grandes riscos de seleção de estirpes resistentes aos patógenos. Por outro lado, a proteção com tinta vinilica ou similares apresenta a desvantagem de se racharem pelo efeito do sol e falta de umidade, permitindo a exposição dos tecidos à ação de organismos patogênicos.

A seleção de organismos colonizadores de ferimentos nas plantas poderá ser feita principalmente a partir dos tecidos necrosados, selecionando-se colonizadores adaptados a esse local e ambiente e, dentre eles, os que apresentarem maior efeito inibitório ao patógeno. Evidentemente, outros antagonistas eficientes para o controle de outros patógenos poderão também ser avaliados no processo de seleção.

¹ Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPV, Caixa Postal 130, 95700-000 - Bento Gonçalves, RS

² Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP

Objetivo

Obter organismos colonizadores de ferimentos de plantas para proteção contra infecção por patógenos.

Protocolo

1. Colher tecido onde foi feita a poda ou outro tipo de ferimento em 10 plantas localizadas em área afetada pelo patógeno que se pretende controlar. As amostragens podem ser feitas em ramos de um, dois e três anos, coletando-se cinco ramos por planta.
2. Cada amostra deve ser desinfestada na epiderme do ramo com algodão embebido em álcool 80°. A seguir, assépticamente, dividir cada material em pequenos pedaços e colocar em BDA* e ágar extrato de malte, com e sem 50 ppm de estreptomicina. Deixar as placas de Petri em estufa, no escuro, 21°-24°C. Transferir e purificar os organismos desenvolvidos. No caso de fungos, recomenda-se fazer a purificação de cada isolado, repicando-se pontas de hifas morfológicamente diferentes, após 24 a 48 horas e permanência do material em estufa. Este trabalho deverá ser feito com auxílio de microscópio estereoscópico com luz transmitida e de uma microespátula que corte o meio de cultura contendo somente a ponta da hifa selecionada. Para selecionar e purificar bactérias, coloca-se 0,1 ml de água esterilizada em um extremo de uma placa com BDA e após encostar a ponta de um estilete na colônia bacteriana desenvolvida, agita-se suavemente na água colocada na placa. A partir dessa suspensão risca-se a placa em um sentido, esteriliza-se a agulha e a seguir são feitas as riscagens perpendiculares à primeira. Somente as colônias isoladas de bactérias e de fungos podem então ser caracterizadas e avaliadas quanto a antagonismo.
3. Produção de propágulos do patógeno: induzir a frutificação do patógeno utilizando celofane ou papel de filtro esterilizado sobre meios de cultura tais como: ágar extrato de malte, ágar farinha de aveia ou ágar-suco V8. Para acelerar a produção de frutificação, se possível, transferir suspensões de esporos aos meios e manter as culturas sob iluminação contínua.

* Ver Apêndice para composição de meios de cultura

4. Determinar a concentração de inóculo e condições ideais do ambiente para induzir altos níveis de infecção no hospedeiro.
5. Fazer a primeira triagem de antagonistas em ramos destacados das plantas hospedeiras de um ou dois anos. Utilizar 3-4 ramos esterilizados superficialmente de 15 a 20 cm, mantendo a parte inferior imersa em água esterilizada. Podar o extremo superior e umedecer o local com suspensões bacterianas de 71 % T ou nível 3 da escala de McFarland. Para fungos, utilizar concentrações de 10^6 esporos/ml ou discos de micélio em crescimento. Cobrir o local tratado com parafilme ou algodão úmido e proteger os extremos tratados dos ramos com um saco de polietileno. Após 12 ou 24 horas, inocular os ferimentos e os ramos testemunhas utilizando-se as concentrações adequadas para cada patógeno. Proteger novamente os extremos dos ramos e mantê-los ensacados de sete a catorze dias, até o surgimento dos sintomas.
6. Na avaliação, é necessário medir o tamanho da lesão e o reisolamento do patógeno de cada ramo. Os isolados mais promissores poderão ser reavaliados, estudando-se menores intervalos entre a proteção do antagonista, a inoculação do patógeno e o efeito curativo. Neste último caso, o primeiro tratamento será feito com suspensões do patógeno e a seguir, em intervalos seriados (2, 4, 8, 12, 24 horas) serão utilizados os antagonistas.
7. Os três isolados mais eficientes poderão ser testados no campo isoladamente ou em mistura em suspensões aquosas com óleos ou géis, e comparados com o método de controle químico recomendado.

Referências bibliográficas

- CORKE, A.T.K.; HUNTER, T. Biocontrol of *Nectria galligena* infection of pruning wounds on apple shoots. **Journal of Horticultural Science**, v.54, p.47-55, 1979.
- GINDRAT, D. Biocontrol of plant diseases by inoculation of fresh wounds, seeds and soil with antagonists. In: SCHIPPERS, B.; GAMS, W., ed. **Soilborne plant pathogens**. London: Academic Press, 1979. 685p.

GROSCLAUDE, C., RICARD, J.; DUBOS, B. Inoculation of *Trichoderma viride* spores via pruning shears for biological control of *Stereum purpureum* on plum trees wounds. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.25-8, 1973.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* e *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v.23, p.23-54, 1985.

OBTENÇÃO DE EPÍFITAS DE FRUTOS E SELEÇÃO DE ANTAGONISTAS NO CONTROLE DE PODRIDÕES DE PÓS-COLHEITA

Rosa Maria V. Sanhueza¹
Itamar S. de Melo²

Os exsudatos produzidos pelos frutos propiciam o desenvolvimento de grupos de organismos que competem pelo aproveitamento desses nutrientes. Dependendo do estágio de desenvolvimento do fruto, das condições do manejo e do impacto ambiental na cultura, esses exsudatos podem variar em composição, interferindo quantitativa e qualitativamente na população epífita.

A capacidade desses microrganismos epífitas de utilizar rapidamente os nutrientes disponíveis na superfície e/ou nos ferimentos dos frutos, bem como a produção de substâncias antibióticas, serão fatores que podem interferir no processo de infecção dos patógenos nos frutos. Assim, a seleção dos melhores competidores, com adaptação igual ao do patógeno no fruto, contribuirá para o controle das podridões. Visto que a produção de antibióticos pelos antagonistas nos frutos não é desejável, a seleção visará somente a competição por nutrientes disponíveis na superfície e polpa dos frutos e a seleção mais eficiente dos organismos neste caso será feita a partir dos colonizadores dos mesmos.

Objetivos

Obtenção e seleção de colonizadores da superfície de frutos para proteção de infecção causada por patógenos.

Protocolo

1. Colher frutos sadios nos estágios de maturação e imergí-los em água destilada contendo 0,005 % de Tween 80. Podem ser utilizados três frutos de 5 a 6 cm de diâmetro e 500 ml de água submetendo-os à agitação durante 30

¹ Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPUV, Caixa Postal 130, 95700-000 - Bento Gonçalves, RS.

² Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP.

minutos ou colocá-los em 100 ml de água e agitar por 30 segundos em ultra-som.

2. Amostras de 0,5 ml da suspensão obtida de duas diluições seriadas serão distribuídas em três placas de Petri contendo meios de cultura tais como: meio King B com 0,01 % de benomil; ágar-extrato de malte; ágar nutritivo + extrato de levedura + dextrose e BDA.
3. Após o surgimento das colônias, cada tipo morfológicamente diferente será purificado e codificado. Para avaliar o controle preventivo dos organismos obtidos podem ser utilizados frutos desinfestados superficialmente ou não, com e sem ferimentos. Após lavagem em água corrente durante uma hora, para reduzir eventuais resíduos de pesticidas, proceder-se-á à desinfestação que deve ser feita umedecendo-os com algodão embebido em álcool 80^o e deixando-os ao ambiente para secar. Para efetuar ferimentos, podem ser utilizadas agulhas de 2 mm de diâmetro com penetração de 2 mm na polpa. As bactérias e leveduras podem ser suspensas em água na concentração de 71 % de transmitância. Quando utilizado meio de cultura líquido, as células devem ser submetidas à centrifugação e ressuspensão em água, para diminuir os nutrientes residuais. Para fungos, as suspensões iniciais podem ser de 10⁷ a 10⁸ cel/ml.
4. Após serem preparadas as suspensões, frutos com ou sem ferimentos serão imersos durante 3 minutos, e após 12 ou 24 horas, esses frutos inoculados com uma suspensão de esporos do patógeno. O inóculo do patógeno deverá ser suficiente para induzir 50 a 70 % de doença. Para a triagem inicial podem ser utilizados três a quatro frutos, cada um com três a quatro ferimentos. Nos próximos testes para confirmação da seleção pode ser aumentado o número de frutos por isolado (10 a 100 frutos).
5. Para avaliação do efeito curativo, o método de preparo e seleção de frutos será semelhante ao descrito anteriormente para o controle preventivo. Neste caso, inicialmente será feita a inoculação com o patógeno. O intervalo necessário para a execução do tratamento com os isolados epífitas, será o necessário para assegurar a germinação dos esporos do patógeno no fruto. Assim, recomenda-se testar períodos de 8, 16 e 24 horas quando o trabalho é desenvolvido à temperatura de 18 a 22^oC e após 24 a 36 horas quando trabalha-se com refrigeração (0-1^oC).
Observação: os parâmetros para seleção de isolados antagonísticos serão o controle da doença, ou seja diminuição do número de lesões em compa-

ração com a testemunha, o tamanho das podridões e a presença de esporulação.

Referências bibliográficas

- HUANG, Y.; DEVERALL, B.J.; MORRIS, S.C.; WILD, B.L. Biocontrol of postharvest orange diseases by a strain of *Pseudomonas cepacia* under semi-commercial conditions. **Postharvest Biology and Technology**, v.3, p.293-304, 1993.
- JANISIEWICZ, W.J. Biocontrol of post-harvest diseases of apple with antagonist mixtures. **Phytopathology**, v.78, p.194-198, 1988.
- JANISIEWICZ, W.J. Post-harvest biology of blue mold on apples. **Phytopathology**, v.77, p.481-485, 1987.
- JANISIEWICZ, W.J.; ROITMAN, J. Biological control of blue mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. **Phytopathology**, v.78, p.1697-1700, 1988.
- McLAUGHLIN, R.J.; WISNIEWSKI, M.E.; WILSON, C.L.; CHAULUTZ, E. Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of post-harvest diseases of apple with *Candida* sp. **Phytopathology**, v.88, p.456-461, 1990.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Controle de *Penicillium expansum* L. resistente a benzimidazóis em maçãs de frigoríficos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.8, p.31-34, 1986.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; KRETZSCHMAR, A.A.; BORSOI, M. Avaliação de organismos antagonísticos a *Penicillium expansum* em maçãs cv. Fuji em pós colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.423-429, 1992

ISOLAMENTO DE COLONIZADORES DE CLAMIDOSPOROS DE *Fusarium oxysporum*

Itamar S. de Melo¹
Rosa Maria V. Sanhueza²

Fusarium oxysporum é um fungo de solo com várias "formas specialis" que causam murcha em diversas espécies de plantas. É muito difícil controlar esse fungo devido à sobrevivência no solo, principalmente na forma de clamidosporos.

A ocorrência de microrganismos associados aos clamidosporos já foi demonstrada (Toyota & Kimura, 1991). Tais microrganismos podem ser de considerável importância como agentes potenciais de biocontrole.

Objetivo

Isolar microrganismos associados intimamente aos clamidosporos de *F. oxysporum* e investigar o efeito desses microrganismos sobre o crescimento do patógeno.

Protocolo

Parte I - Isolamento de bactérias

1. Produzir microconídios de *F. oxysporum* em meio líquido, sob agitação (80-100 rpm) por aproximadamente oito dias.
2. Coletar microconídios sob algodão absorvente e lavá-los em água destilada.
3. Coletar microconídios em um filtro millipore com uma abertura de 0,8 μm , numa quantidade de 10^4 - 10^5 microconídios/filtro.

¹ Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP.

² Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPV, Caixa Postal 130, 95700-000 - Bento Gonçalves, RS.

4. Deixar os filtros flutuando sobre a superfície de água destilada por 24 horas a 28°C, a fim de que os microconídios germinem.
5. Colocar cerca de 2-4 g de solo natural numa placa de Petri esterilizada. Umedecer o solo com água destilada em quantidade suficiente para que o mesmo fique pastoso (o solo não deve, neste caso, ser argiloso).
6. Os filtros millipore com os microconídios germinando são colocados sobre o solo, nas placas de Petri, tampadas em seguida.
7. Incubar as culturas por aproximadamente doze dias (observar a presença de clamidosporos).
8. Proceder ao isolamento de bactérias colonizando os clamidosporos, seguindo as etapas seguintes:
 - 8.1. lavar completamente com água destilada o lado do filtro em contato com o solo;
 - 8.2. coletar os clamidosporos sobre os filtros em uma solução de NaCl 0,7 %;
 - 8.3. submeter a solução à sonificação por, aproximadamente, 1 minuto;
 - 8.4. filtrar a solução em millipore de 2,0 µm;
 - 8.5. fazer diluições em série do filtrado e plaquear em nutriente ágar diluído.
 - 8.6. incubar as culturas e observar periodicamente o crescimento de colônias bacterianas que deverão ser purificadas e identificadas.

Parte II - Efeito das bactérias sobre o crescimento de *F. oxysporum*

1. Coletar microconídios de *F. oxysporum* sobre um filtro millipore de 0,2 µm.
2. Deixar flutuar em solução salina 0,85 % os filtros contendo os microconídios por 24 horas.

3. Inocular cada isolado bacteriano identificado nos filtros.
4. Incubar as culturas sobre solo umedecido, a 28°C, por aproximadamente sete dias.
5. Após a incubação, retirar os filtros das placas, lavar a parte da membrana em contato com o solo com água destilada e dividir os filtros em partes, onde uma parte é corada com rosa bengala para avaliar o número de esporos. As outras partes do filtro são transferidas para água destilada ou meio batata-dextrose-diluido.
6. Após 8-10 horas de incubação adicional, a germinação dos esporos é avaliada por observação dos tubos germinativos.

Referência bibliográfica

TOYOTA, K.; KIMURA, M. Bacteria adsorbing on the chlamidospores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. **Japanese J. of Soil Sci and Plant Nutrition**, v.62, p.533-535, 1991.

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO RIZOPLANO E ENDORIZOSFERA E SEU EFEITO NA COLONIZAÇÃO DE RAÍZES E NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO

Itamar S. de Melo¹
Rosa Maria V. Sanhueza²

Tem-se verificado a presença de *Pseudomonas* sp. tanto na superfície de raízes como na endorizosfera (Foster, 1981). Algumas destas bactérias, isoladas da endorizosfera, produzem metabólitos fitotóxicos, deletérios a plantas de tomate, prejudicando o crescimento normal. Por outro lado, bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) e bactérias promotoras da emergência são comumente isoladas da rizosfera e rizoplano. As PGPR que têm mostrado ser efetivas em condições de campo, funcionam provavelmente por produzir um efeito antibiótico sobre patógenos principais e secundários e por produzir sideróforos que formam quelatos com ferro, tornando-o indisponível aos fitopatógenos.

Objetivos

Isolar rizobactérias do rizoplano e endorizosfera, principalmente do grupo *P. fluorescens* e *P. putida*, observar diferenças na colonização de raízes por estas duas bactérias e detectar aquelas que estimulam o desenvolvimento das plantas.

Protocolo

Parte I - Isolamento de rizobactérias

1. Coletar o sistema radicular de plantas que se deseje trabalhar. No caso de se querer obter o maior número possível de bactérias diferentes deve-se proceder coleta de solos de diversas regiões agrícolas com históricos de terem sido cultivados.

¹ Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariuna, SP.

² Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPV, Caixa Postal 130, 95700-000 - Bento Gonçalves, RS

2. Proceder à semeadura de tomateiro nos diferentes tipos de solos, desinfestar superficialmente as sementes antes do plantio.
3. Coletar as raízes das plântulas; lavar em água corrente e colocar 0,3 g de pedaços de raízes em tubos de ensaio contendo 5 ml de 0,1 M de $MgSO_4$. Agitar vigorosamente por 1 minuto.
4. Fazer diluições em série e plaquear em meio King B (KB).
5. Após três dias de incubação, proceder à enumeração de bactérias da superfície de raízes.
6. Para isolamento de bactérias da endorizosfera, desinfestar pedaços de raízes com H_2O_2 (10 %; 15 segundos). Enxaguar três vezes com $MgSO_4$ (0,1 M), triturar com um bastão de vidro.
7. Proceder às devidas diluições e plaquear em meio KB.
8. Contar as colônias de bactérias.

Parte II - Seleção de bactérias promotoras do crescimento de plantas

1. Todas as bactérias isoladas e purificadas devem ser cultivadas em meio KB por 24 horas 26-28° C.
2. Encher vasos de plástico com vermiculita ou areia lavada com ácido muriático (comercial). Se preferir, o ensaio pode ser feito em tubos de ensaio grandes.
3. Desinfestar sementes da planta, da qual foram isoladas as bactérias, com solução aquosa de hipoclorito de sódio comercial, concentrado (3:1) por 1 minuto.
4. Após serem enxaguadas com água esterilizada, as sementes são postas a germinar sobre papel de filtro em uma placa de Petri.

5. Após germinadas, as plântulas são transplantadas para os vasos e/ou tubos. Regar com solução nutritiva e introduzir um volume de 0,5 ml de suspensão bacteriana de 10⁹ ufc/ml.
6. Deixar os vasos sob câmara de crescimento até a avaliação, que deve ser feita tomando-se como parâmetro o efeito observado no crescimento das plantas testemunha.
7. Após este período, fazer medições de planta e peso seco de raiz e parte aérea.
8. Isolados com efeitos estatisticamente significantes sobre o crescimento de plântulas, num total de 30-60 isolados do rizoplano e 30-60 isolados da endorizosfera são testados novamente, por duas vezes, sobre o crescimento de plantas, em solo natural e esterilizado.
9. Os isolados selecionados no item 7 podem ser retestados em condições assépticas a fim de comprovar mais adequadamente o efeito sobre o crescimento de plântulas.

Referências bibliográficas

- BAKER, R. Molecular Biology in Biological Control of Soilborne Pathogens. **Molecular Strategies for Crop Protection**, p.115-124, 1987.
- FOSTER, R.C. The ultrastructure and histochemistry of the rhizosphere. **New Phytologist**, v.89, p.263-273. 1981.
- LYNCH, J.M.; CLARK, S.J. Effects of microbial colonization of barley roots on seedling growth. **Journal of Applied Bacteriology**, v.56, p.46-52, 1984.

OBTENÇÃO DE MUTANTES E COMPETITIVIDADE DE ISOLADOS DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Itamar S. de Melo¹
Rosa Maria V. Sanhueza²

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e antagonísticas a fitopatógenos, quando introduzidas ao solo, devem colonizar o sistema radicular eficientemente. Este é um pré-requisito fundamental. Para avaliação da colonização, crescimento e sobrevivência na rizosfera, necessário se faz identificar certas características da bactéria que a torne conhecida com segurança. Em geral, resistência aos antibióticos, principalmente a rifampicina, é o marcador mais comumente utilizado. Contudo, deve-se levar em conta que resistência a antibiótico pode mudar características de interesse nas linhagens selecionadas, como também pode apresentar instabilidade sob certas condições de ambiente.

Objetivo

Obter mutantes de bactérias resistentes a rifampicina e/ou ácido nalidíxico e investigar a segurança de utilização desta característica para monitoração da dinâmica populacional de bactérias na rizosfera.

Protocolo

Parte I - Seleção de mutantes

1. Preparar meio King B contendo concentrações crescentes de rifampicina (50, 100, 150, 200, 250 ug/ml).
2. Preparar uma suspensão bacteriana, fazer diluições até 10^{-5} e plaquear nas concentrações de rifampicina acima discriminadas.

¹ Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP.

² Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPV, Caixa Postal 130, 95700-000 - Bento Gonçalves, RS.

3. Incubar as culturas a 27°C por quatro dias.
4. Observar o crescimento de colônias nas diferentes concentrações, repicá-las para meio KB contendo a concentração de rifampicina limite para o crescimento.
5. Subcultivar por, aproximadamente dez vezes os mutantes Rifr. em meio KB, e comparar o número de unidades formadoras de colônias (ufc) após diluição das suspensões nos meios KB e KB com rifampicina.
6. Os mutantes devem ser armazenados a 4°C em meio KB suplementado com rifampicina (600 ppm).
7. Comparar estes mutantes Rifr. com a linhagem selvagem no que concerne à taxa de crescimento, fluorescência, antagonismo *in vitro*, aspectos bioquímicos, etc.

Parte II - Competitividade entre mutantes Rifr. e linhagem selvagem

1. Cultivar 0,1 ml (109 ufc/ml) da linhagem selvagem e dos mutantes Rifr. em 25 ml em KB.
2. Imediatamente após a repicagem e a intervalos de 6, 10 e 24 horas de incubação, amostras são tomadas e diluições em série são plaqueadas em meio KB ágar contendo 0 ou 150 ug/ml de rifampicina, a fim de determinar as densidades de população da linhagem selvagem e dos mutantes Rifr.
3. A cada 24 horas, 0,1 ml da mistura de culturas é adicionado a 25 ml de meio fresco, repetindo-se o processo por três vezes. Fazer três repetições por tratamento.
4. Comparar o antagonismo dos mutantes com o do isolado selvagem.

Referência bibliográfica

- HOMMA, Y.; SUZUI, T. Role of antibiotic production in suppression of radish damping-off by seed bacterization with *Pseudomonas cepacia*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.55, p.643-652, 1989.

ISOLAMENTO DE ANTAGONISTAS PARA CONTROLE DE DOENÇAS VASCULARES

Rosa Maria V. Sanhueza¹
Itamar S. de Melo²

As doenças causadas por organismos do solo que penetram pelas raízes e colonizam o sistema vascular das plantas são as que apresentam maior dificuldade de controle. Este problema relaciona-se principalmente à impossibilidade técnica e econômica de suprimir o patógeno no solo e/ou de atingí-lo no local protegido onde se localiza: no sistema vascular das plantas.

As práticas de controle recomendadas para este tipo de moléstia são variadas e visam reduzir a população do patógeno no solo, com práticas culturais e fungicidas, proteger as raízes das plantas e utilizar cultivares resistentes.

Em muitos casos, porém, essas medidas não têm sido suficientes para o controle econômico dessas enfermidades. O uso do controle biológico, tem sido proposto para complementar os tratamentos de desinfestação do solo em condições de campo ou de substratos artificiais em culturas protegidas. E também, para tratamento das raízes evitando ou diminuindo a infecção e/ou a colonização pelo patógeno. Para reduzir a contaminação do solo por esses patógenos é necessário selecionar organismos adaptados às características do local de alta taxa de crescimento e multiplicação, e com eficiente efeito antagônico ao patógeno. Provavelmente estes organismos serão encontrados em solos onde a doença ocorra com menor frequência ou em solos supressivos. Para colonizadores de raízes, os organismos mais competitivos provavelmente serão obtidos do rizoplane. Na sua maioria serão constituídas por rizobactérias de plantas sadias desenvolvidas em locais onde a doença ocorre ou em solos supressivos. Colonizadores radiculares e do sistema vascular serão também de interesse para seleção. A competição desses organismos ocorrerá nos vasos das plantas, exercendo proteção pela ocupação e competitividade do sítio e, provavelmente, também pela indução de resistência.

Objetivos

Seleção de organismos para competir com patógenos vasculares no solo, raiz e sistema vascular das plantas.

¹ Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPV, Caixa Postal 130, 95700-000 - Bento Gonçalves, RS.

² Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP

Protocolo: Isolamento, seleção de isolados e bioensaios

1. Obtenção de isolados a partir do solo: quatro subamostras constituídas de 1 g de solo rizosférico ou de solos provavelmente supressivos serão suspensas separadamente em 100 ml de ágar-água 0,1 % e homogeneizadas durante 10 minutos. Cada amostra será submetida a diluição seriada até a concentração 10^{-6} . Para obtenção de actinomicetos 0,2 ml da diluição 10^{-3} será distribuída em meio de cultura agar-glicerina asparaginato. Para bactérias pode ser utilizada a diluição 10^{-6} e meio King B, e para fungos as diluições 10^{-4} e 10^{-5} e meio de Martin com 0,1 g de Agrimicina.
2. Obtenção de isolados do rizoplane: raízes finas de plantas sadias serão lavadas com detergente e enxaguadas com água destilada. A seguir, cada amostra será colocada em erlenmeyer ou tubos de vidro com água destilada necessária para cobri-las e submeter a agitação durante 1 hora ou a ultrassom por 30 segundos. Amostras de 0,2 ml da suspensão obtida das diluições 10^{-1} e 10^{-2} serão distribuídas nos meios citados, para obtenção de organismos do solo (item 1).
3. Obtenção dos organismos endófitos: amostras de raízes e do caule de plantas sadias serão desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio 0,1 % e enxaguadas com água destilada. A seguir, serão retiradas as epidermes de cada segmento amostrado e, separadamente, agitadas em solução salina 0,85 % durante 5 minutos. A suspensão será filtrada em gase e preparadas diluições aquosas 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . A suspensão original e as diluições podem ser distribuídas nos meios de cultura King B e meio de Martin. As colônias morfologicamente diferentes obtidas no meio de cultura deverão ser purificadas e codificadas.
4. Seleção de antagonistas para evitar a recontaminação do solo: a avaliação da colonização do substrato esterilizado pelos organismos isolados será feita preparando suspensões com concentrações de 10^8 e 10^{11} propágulos por ml. As triagens são iniciadas colocando volumes de 20 a 40 ml de cada suspensão em vasos com 200 cc de solo úmido. Quatro a seis dias após a incorporação de cada microrganismo, será introduzido no solo o patógeno, na quantidade adequada para produzir 80 a 90 % de infecção das plantas. Uma semana após a colonização do solo pelo patógeno, serão transferidas mudinhas da planta susceptível, aparando-se as raízes para assegurar o estabelecimento da doença. Na avaliação podem ser considerados os sintomas reflexos, índices de necrose vascular, peso seco da parte aérea e raízes e/ou a população do patógeno no solo e no sistema vascular das plantas. Os organismos que suprimem a doença, total ou parcialmente nos vasos, serão selecionados para um segundo processo de seleção. Na primeira triagem podem ser utilizados dois vasos enquanto que nos trabalhos posteriores é recomendável utilizar quatro a oito vasos contendo uma a quatro plantas em cada um.

5. Seleção de organismos para controle do patógeno no solo contaminado: para verificar o efeito dos organismos em avaliação sobre o patógeno previamente estabelecido recomenda-se incorporar o organismo em estudo conforme o método descrito no item 4, e após cinco a sete dias transferir as plântulas. A avaliação e o processo de seleção podem ser semelhantes aos apresentados no item 4. Para estudos em solo sem esterilização, recomenda-se que a concentração do organismo estudado seja aumentada em duas a cinco vezes.
6. Seleção de organismos protetores da infecção ou colonização pelo patógeno: as raízes das mudas devem ser levemente aparadas logo antes da sua imersão na suspensão do provável antagonista. A inoculação com o patógeno pode ser feita incorporando-o no solo ou pela imersão das raízes na suspensão de propágulos do agente causal da doença após o tratamento com o provável antagonista. Neste tipo de trabalho as concentrações dos organismos avaliados é de 70 % de transmitância para bactérias e 10^6 a 10^8 propágulos/ml nos fungos. As suspensões devem ser preparadas sem resíduo dos meios de cultura, ou seja, com células lavadas por centrifugação e ressuspensas em água destilada ou solução tampão. O período de imersão deve ser estudado, podendo ser utilizado 30 minutos; e 1, 4, 12 ou 24 horas antes da inoculação com o patógeno.
Para avaliação do biocontrole serão comparados os níveis de infecção das testemunhas inoculadas com os das plantas tratadas com os organismos em avaliação. Efeitos promotores de resistência poderão ser detectados nesta seleção de antagonistas.

Referências bibliográficas

- BAKER, R.; HANCHEY, P.; DOTTORAR, S.D. Protection of carnation against *Fusarium* stem rot by fungi. **Phytopathology**, v.68, p.1045-1051, 1978.
- LANGERAK, C.J. The role of antagonistic in the chemical control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *narcissi*. **Netherland Journal of Plant Pathology**, v.83, p.365-81, 1977. Suppl. 1.
- LOCH, J.C. MAROIS, J.J.; PAPAIVIZAS, G.C. Biological control of *Fusarium* wilt of greenhouse-grown Chrysanthemus. **Plant Disease**, v.69, p.167-69, 1985.
- MICHAEL, A.H.; NELSON, P.E. Antagonistic effect of soil bacteria on *Fusarium roseum* "Culmorum" from carnation. **Phytopathology**, v.62, p.1052-56, 1972.

MOOR, K.J.; WONG, P.T.W. **Ecology and management of soilborne plant pathogens.** Minnesota: American Phytopathological Society, 358p. 1985.

OGAWA, K.; KOMADA, H. Biological control of *Fusarium* wilt of sweet potato with cross protection by nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. In: PARKER, C.A.; ROVIRA, A.D. American Phytopathological Society, 358p. 1985.

ISOLAMENTO SELETIVO DE BACTÉRIAS ATIVAS PARA NUCLEAÇÃO DE GELO

Itamar S. de Melo¹

Rosa Maria V. Sanhueza²

Bactérias ativas para nucleação de gelo - INA⁺ têm sido reportadas como sendo responsáveis por danos causados por geadas em várias culturas sensíveis. Algumas já foram previamente descritas, como: patovares de *Pseudomonas syringae*, *P. fluorescens*, *P. viridiflava*, *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*, e *Erwinia herbicola*. Estas bactérias INA⁺ têm sido isoladas de plantas ou partes de plantas com ou sem injúria causada por geadas. Segundo Lindow (1985) de 0,02 % a 20 % do total de bactérias encontradas na comunidade microbiana do filoplano são nucleadoras ativas de gelo e estão diretamente envolvidas em danos causados por geadas em plantas em temperatura de aproximadamente -1,0°C. No entanto, algumas estirpes de *E. herbicola* e *P. syringae* são negativas para nucleação, ditas INA⁻ e como estas bactérias colonizam o filoplano das plantas, tem-se sugerido substituí-las em estádios fenológicos com o propósito de controlar biologicamente as bactérias INA⁺. Algumas estirpes, como a M232A de *E. herbicola* não catalizam a cristalização ou solidificação da água a temperaturas baixas e são antagônicas a patovares INA⁺ de *P. syringae* e *E. herbicola*.

Objetivo

Identificar bactérias INA⁺ isoladas de folhas danificadas por geadas.

Protocolo

1. Coletar folhas de fruteiras, de brócolis, nabo ou milho durante a manhã quando a temperatura estiver a -2°C.
2. Cortar imediatamente as folhas em pedaços de 2 x 2 cm. Colocá-las em tubos contendo 10 ml de água destilada esterilizada. Agitar por minutos e filtrar.

¹ Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariuna, SP.

² Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPUV, Caixa Postal 130, 95700-000 - Bento Gonçalves, RS.

3. Pulverizar o lavado em placas contendo ágar-nutritivo.
4. Após três dias, separar e repicar colônias ao acaso.
5. Cultivá-las, em meios contendo poliálcoois (glicerol, manitol, sorbitol, etc.) ou meio KB, incubando-as individualmente, por mais três dias, à temperatura que não ultrapasse 24°C.
6. Proceder seleção para nucleação de gelo a -10°C. Tal atividade é determinada pelo método do congelamento de gotículas sobre papel de alumínio impregnado com cera ou parafina, à temperatura de -5°C a -10°C.
Aproximadamente 30-50 gotas de 50 µl de cada cultura bacteriana, desenvolvida em meio nutriente líquido são pipetadas sobre a folha de alumínio flutuante em etanol frio.
7. Submeter a teste de congelamento. Se todas as gotas congelarem dentro de 30 segundos, as linhagens bacterianas serão consideradas ativas para nucleação de gelo.
8. Para comprovar o efeito destas linhagens *in vivo*, deve-se proceder a inoculação de folhas de plântulas de milho, desenvolvidas em solo esterilizado e mantidas em câmara de crescimento.
9. Após a inoculação, manter as plântulas a temperatura de -1°C.
10. Avaliar os danos nas folhas causados pelo super-resfriamento. O tratamento controle receberá somente água esterilizada.

Referências bibliográficas

- LONDOW, S.E. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.21, p.363-384, 1983.
- LONDOW, S.E. Integrated control and role of antibiosis in biological control of fire blight and frost injury. In: WINDELS, C.E.; LINDOW, S.E. **Biological control on the Phylloplane**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1985. p.83-115.

SUSAN, S.H.I.; BAKER, L.S.; UPPER, C.D. Ice nucleation temperature of individual leaves in relation to population sizes of ice nucleation active bacteria and frost injury. **Plant Physiology**, v.11, p.259-265, 1985.

PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR RIZOBACTÉRIAS

Itamar S. de Melo¹
Rosa Maria V. Sanhueza²

Mais de um mecanismo tem sido provado que ocorrem em bactérias do gênero *Pseudomonas*, com efeitos benéficos sobre as 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 continua 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 antogônicas a *Fusarium solani* e produtoras de sideróforos.

Protocolo

Parte I - Teste de Antagonismo “in vitro”

1. Suplementar o meio KB com as seguintes concentrações de Fe^{+3} : 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{m/l}$.
2. Cultivar em três pontos equidistantes da placa cada bactéria. Usar três placas para cada tratamento. Proceder à inoculação com palito esterilizado ou introduzir 5 μl em cada ponto.

¹ Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP.

² Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPUV, Caixa Postal 130, 95700-000 - Bento Gonçalves, RS.

3. Incubar as culturas por 24 horas;
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 $FeCl_2/l$ 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 μm).
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 & Neilands (1987) adotaram a técnica de eletroforese.

Referências bibliográficas

- GEELS, F.P.; SCHIPPERS, B. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Les Antagonismes microbiens de l'INRA**, n° 8, 1983.

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, p.1567-73, 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.

ISOLAMENTO DE FUNGOS MICORRÍZICOS

Itamar S. de Melo¹

Rosa Maria V. Sanhueza²

Os fungos micorrizicos vesículo-arbusculares (MVA) são formados pelos componentes: raízes da planta hospedeira, hifas do fungo micorrizico no interior das raízes e hifas externas que se estendem através da rizosfera. Através de modificações das hifas, originam-se os arbúsculos, vesículas e esporos.

Há fortes evidências na literatura de que os fungos MVA afetam significativamente o efeito de alguns patógenos, na planta hospedeira, além de aumentar a capacidade das plantas em absorver fósforo, alguns micronutrientes e água.

Objetivo

Estudar o efeito de fungos MVA no controle de alguns patógenos de solo: *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. e *Fusarium solani*.

Protocolo

Parte I - Isolamento de fungos micorrizicos vesículo-arbusculares (MVA)

1. Colocar aproximadamente 50 ml de solo em 1 litro de água. Agitar com um bastão.
2. Passar a solução do solo por um conjunto de peneiras cujas malhas devem ser de 250, 105 e 53 μ . Repetir a operação várias vezes.
3. Recolher os esporos em um béquer com água.

¹ Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP

² Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPUV, Caixa Postal 130, 95700-000 - Bento Gonçalves, RS.

4. Centrifugar as frações recolhidas nas peneiras (esporos + grãos de areia e outros sedimentos) com água destilada por um tempo total de 3 minutos a 3.000 rpm.
5. Eliminar cuidadosamente o sobrenadante.
6. Adicionar sacarose ao precipitado dos tubos e mexer suavemente com um bastão.
7. Centrifugar novamente por 2 minutos a 3.000 rpm.
8. Passar com cuidado o sobrenadante por uma peneira de 44 μ e lavar com bastante água destilada até que diminua a concentração de sacarose na parede dos esporos.
9. Coletar os esporos e proceder à contagem dos mesmos com auxílio de placa estriada e dividida em seis partes sob microscópio estereoscópico.

Parte II - Avaliação do estabelecimento dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (MVA)

1. Raízes micorrizadas são lavadas em água corrente e, caso não sejam imediatamente avaliadas, devem ser acondicionadas em frascos contendo solução AFA (ácido acético glacial, 5 ml; formol, 13 ml e álcool etílico, 200 ml).
2. Clarear uma amostra de raízes fixadas com KOH 10% em banho-maria a 90°C por 40 minutos. Caso o tratamento não surta efeito, pode-se aumentar o tempo de exposição.
3. Lavar as raízes com água corrente.
4. Lavar as raízes com HCl 1 % a frio por 3 minutos.
5. Proceder à coloração com solução lactofenol mais "trypan-blue" 1 %, em banho-maria a 90°C por 10 minutos.
6. Escorrer o corante e recobrir as raízes com solução de lactofenol incolor, por aproximadamente 12 horas.

7. Escorrer o lactocfenol para retirar o excesso de corante e novamente cobrir as raízes com lactocfenol incolor.

Parte III - Determinação da porcentagem de colonização de raízes por MVA

1. Pesar aproximadamente 500 mg de raízes coradas com "trypan blue", cortá-las em pedaços de 1 cm e espalhá-las em placas de Petri, cujo fundo fora marcado, com linhas paralelas transversais, formando um quadrilátero cujos quadrados medem 1,2 cm.
2. Contar sob microscópio estereoscópico o número de intersecções entre os pedaços de raiz com as linhas horizontais ou verticais (numa só direção), e observar as raízes que têm ou não, naquele ponto, a presença de estruturas fúngicas características dos fungos MVA. O cálculo da porcentagem de colonização de raiz, é feito utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de colonização de raiz} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de raízes com presença de MVA}}{\text{n}^\circ \text{ total de raízes}} \times 100$$

Referências bibliográficas

- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet surviving and decoupling. **Transactions of the British Mycological Society**, v.46, p.235-244, 1963.
- GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v.84, p.489-500, 1980.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society** v.55, n.1, p.158-161, 1970.

ISOLAMENTO SELETIVO DE *Bacillus*

Wagner Bettioli¹

Bacillus subtilis se caracteriza por ser um excelente produtor de antibióticos que podem ser utilizados para o controle de fungos e bactérias fitopatogênicas.

Objetivo

Isolamento seletivo de *Bacillus* spp.

Protocolo

1. Coletar material vegetal (rizoplano, caule, fruto, folhas) e lavar com jato de água destilada esterilizada.
2. Recolher o lavado em béquer esterilizado e filtrar em camada de gase, 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^{-5}).
5. Transferir 0,2 ml da suspensão das diluições para placas com BDA 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 cresceram para tubos com BDA. Para identificação das bactérias ao nível de espécies, proceder os testes bioquímicos (Buchaman & Gibbons, 1975).

¹ Eng.-Agr., Ph D., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP

Atenção: substituição das passagens 1 e 2.

Retirar discos das folhas e colocar num tubo com 20 ml de água destilada esterilizada e deixar por 10 minutos em banho ultra-som ou sob agitação.

Referências bibliográficas

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

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

MORRIS, J.R.; BERKELEY, R.C.W.; LOGAN, N.A.; O'DOONELL, A.G. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: STANIMIP. **The Prokaryotes**, p.1711-1742, 1981.

OBTENÇÃO DE MUTANTES DE *Trichoderma* spp. RESISTENTES A FUNGICIDAS

Itamar S. de Melo¹
Rosa Maria V. Sanhueza²

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 freqüências 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 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.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP.

² Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPV, 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

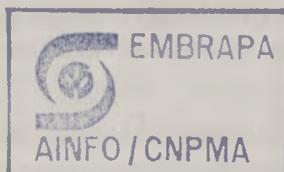
1. Suspensões de conídios de formação recente (10^7 /ml) de *Trichoderma* spp. são obtidas em solução de Tween 80. O fungo pode ser cultivado em qualquer meio de cultura para produção de conídios.
2. A suspensão de conídios (10 ml) é vertida em uma placa de Petri esterilizada e submetida à irradiação 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 o 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.

Referências bibliográficas

ABD-EL MOITY, T.K.; PAPAVIDAS, G.C.; SHAULA, M.N. Induction of new isolates of *Trichoderma harzianum* tolerant to fungicides and their experimental use for control of wilt rot of onion. **Phytopathology**, v.72, p.396-400, 1982.

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

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



PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS POR MICRORGANISMOS

Rosa T.S. Frighetto¹

Itamar S. de Melo²

A maioria dos microrganismos produtores de antibióticos é comumente encontrada no solo. Muitos deles são organismos de crescimento lento. Actinomicetos, bactérias e fungos estão entre os produtores mais conhecidos. A vasta maioria de antibióticos em uso é produzida por actinomicetos e em particular por membros do gênero *Streptomyces*. Entre os fungos, *Penicillium* e *Cephalosporium* spp. são os mais conhecidos. Bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são também estudadas como produtoras de potentes antibióticos, como *Bacillus colistinus*, produtor da colistina; *B. brevis* (tirotricina); *B. licheiformis* (gramicidinas); *B. subtilis* var. Tracy (bacitracina); *B. polymyxa* (polimixina), etc.

Alguns fungos agentes de biocontrole de doenças de plantas também atuam no controle, possivelmente por produzirem substâncias antibióticas. *Trichoderma* spp. produzem 6-n-pentil-2H-pirano, triconodermina (um antibiótico terpenóide); *Talaromyces flavus* produz vermiculina, vermicilina, vermistatina e talaron. Somente o *talaron* tem sido relatado ser antifúngico, com efeito sobre *Verticillium dahliae*.

Quando do isolamento de antagonistas, geralmente por facilidade de certas metodologias, testa-se *in vitro* a capacidade de antagonistas inibirem o crescimento, que se dá por metabólitos secundários, como antibióticos, sideróforos, etc. (Homma & Suzui, 1989).

Um passo importante na busca de microrganismos produtores de antibiótico diz respeito ao isolamento seletivo em meios de cultivos apropriados, como também, ao pré-tratamento do material, a fim de aumentar as chances de isolar o microrganismo desejado. Aquecimento de vários materiais tem sido frequentemente usado para diminuir o número de bactérias, quando se intenciona isolar actinomicetos. Presume-se que muitos propágulos de actinomicetos, tanto esporos (*Streptomyces*) como fragmentos de hifas *Micrococcus rhodochrous* (antigo *Rhodococcus*) são mais resistentes do que células de bactérias gram-negativas.

¹ Química, Ph.D., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP.

² Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP.

Técnicas de enriquecimento com nutrientes do material antes do isolamento têm sido usadas rotineiramente. Adição ao solo de substratos sólidos, como quitina, favorece certos microrganismos quitinolíticos.

A literatura nestes últimos dez anos traz numerosos exemplos de técnicas para isolamento seletivo de microrganismos, como também para isolamento de metabólitos com atividade contra fitopatógenos.

Protocolo

Parte I - Produção de metabólitos livre de células

1. Preparar meio líquido a base de batata-dextrose em erlenmeyers de 500 ml. Verter 200 ml de meio em cada erlenmeyer.
2. Colocar três discos de meio com crescimento de *Trichoderma* em cada erlenmeyer e incubar a 28°C por sete dias, sob agitação a 100 rpm.
3. Após este período, filtrar o conteúdo do frasco em papel de filtro (Whatman nº 4).
4. Filtrar o sobrenadante em membrana millipore (0,22 µm), a fim de se conseguir um filtrado livre de células de *Trichoderma*.
5. O metabólito é testado contra alguns fitopatógenos a fim de se verificar a atividade tóxica do mesmo. Para tanto, cerca de 2 ml do filtrado esterilizado são transferidos para uma placa de Petri a qual receberá em seguida 20 ml de BDA diluído. Agitar suavemente o meio fundente para que haja uma mistura uniforme do metabólito.
6. Transferir um disco (5 mm de diâmetro) de meio com abundante crescimento do(s) patógeno(s) que se deseja controlar para o centro da placa. Fazer cerca de cinco repetições para cada tratamento.
7. Incubar as culturas até que se possa distinguir alguma diferença no crescimento dos organismos testes, quando comparado com o controle (placas sem o metabólito).

8. O crescimento do patógeno é medido periodicamente através do tamanho da colônia.
9. Caso o metabólito tenha algum efeito inibitório, proceder-se-á a extração do antibiótico com solventes apropriados (Parte II).

Esta etapa visa economizar material e tempo, evitando-se proceder extração sem conhecimento prévio se o organismo produz tais metabólitos. É ideal para se fazer seleção de dezenas ou centenas de linhagens produtoras.

Parte II - Extração de antibióticos

1. Os processos empregados para extração de antibióticos são: a precipitação, a extração com solventes e a adsorção por meio de resinas de troca iônica. Exemplificaremos a extração com solvente.
Cultura de *Trichoderma* crescida em meio líquido, filtrada em papel de filtro Whatman nº 4, é usada para extração. Cerca de 1 litro de sobrenadante já é suficiente.
Em geral, para identificação do composto maiores quantidades são necessárias.
2. Misturar ao filtrado cerca de 10-30 % do volume de solventes orgânicos. Esta metodologia consiste na separação das fases aquosa e orgânica. Dividir o volume do filtrado para cada solvente a ser testado. Neste caso, seleciona-se aquele que melhor extrair o antibiótico. Para alguns organismos já se conhece o solvente mais apropriado. No caso de *Trichoderma*, o acetato de etila tem sido empregado (Ghisalberti et al., 1990).
Os solventes mais empregados em extração de antibióticos são: os álcoois alifáticos (propanol, butanol), ésteres alifáticos (acetato de etila); os aromáticos (benzeno, fenol), os halogenados (diclorometano, clorofórmio). A escolha do solvente é governada pelo coeficiente de partição do antibiótico entre o solvente e caldo, e pela miscibilidade do solvente com o caldo.
3. Agitar em funil de separação e coletar a fase orgânica. Repetir a operação, pelo menos três vezes, aproveitando-se o filtrado que será extraído com nova quantidade do solvente.
4. A separação entre as duas fases pode ser facilitada pela adição de solução aquosa saturada de cloreto de sódio.

5. Devido à presença de umidade em solvente após a extração, secar com sulfato de sódio anidro.
6. Filtrar e remover o solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo.
7. Recolher o resíduo no fundo do balão, que no caso de *T. Koningii* é um óleo de cor avermelhada.
8. Dissolver o extrato bruto em solvente adequado.
9. Analisar o extrato-bruto, assim diluído, em cromatografia de camada fina utilizando-se como eluente diclorometano (CH_2Cl_2) metanol (CH_3OH), numa proporção de 1:1. Para tanto, depositar algumas gotas (utilizar capilares de vidro) do extrato na base de uma placa de cromatografia. Fazer que haja migração do composto em diferentes frações sob ação do solvente mencionado.
10. Após observação das frações sob luz ultravioleta, proceder cuidadosamente à remoção das frações que serão colocadas em empendorf e eluídas com solvente.
11. As diferentes frações serão testadas individualmente usando-se discos de papel de filtro com 5 mm de diâmetro ou fazendo-se um pequeno poço no meio de cultura, no centro de uma placa de Petri. Mergulha-se o disco de papel por aproximadamente 2 horas nos extratos. Através do método de difusão em ágar, coloca-se cerca de 40 ul/poço de extrato dissolvido em solvente adequado e permite-se a evaporação do solvente antes da aplicação do organismo-teste. Após o que pulveriza-se, com um pulverizador De Vilbis esterilizado, uma suspensão de conídios do organismo teste.
12. Incubar as culturas até que se possa evidenciar o halo de inibição do crescimento micelial do fungo teste. Mensurar o tamanho do halo.
13. Das frações com atividade antibiótica, assim determinadas pelos testes *in vitro* e identificadas pelo R_f nas placas de cromatografia, proceder-se-á a identificação química (Parte III).

Nota: no caso de fungos e actinomicetos a extração feita no caldo pode não ser eficiente, pois grande parte do metabólito liberado pela célula é depositado na parede da mesma. Aconselha-se, neste caso, proceder extração do micélio. Também, aconselha-se adicionar à cultura, antes de efetuar o processo de extração, acetona numa concentração de 1,5:1 (caldo:acetona) (v/v) e incubar, sob agitação, por 30 minutos. Após a filtração, remover a acetona sob pressão reduzida em evaporador rotativo, e então prosseguir a extração com solvente adequado.

Parte III - Purificação e identificação

Após a extração do caldo da cultura com acetato de etila, o resíduo pode ser fracionado e purificado através dos seguintes métodos:

1. Cromatografia de camada delgada

Sem dúvida, podemos afirmar que a cromatografia de camada delgada (CCD) é uma técnica rápida, barata, simples e das mais utilizadas rotineiramente. Sua desvantagem é a baixa precisão na quantificação (relativamente a HPLC e CG) e a falta de automação. As placas podem ser assim preparadas (por exemplo: para cinco placas de 20 x 20 cm): preparar as placas de vidro sobre uma superfície plana, limpá-las com hexano embebido em chumaço de algodão. Pesar 25 g de sílica gel para cromatografia em camada delgada, em um frasco erlenmeyer com tampa, e acrescentar cerca de 50 ml de água destilada. Agitar bem até que a mistura fique homogênea e a consistência adequada para um espalhamento homogêneo. Para CCD utiliza-se espessura de 0,25 mm de sílica gel sobre placas de vidro, e para cromatografia preparativa utiliza-se espessura de até 2 mm, sendo neste caso a quantidade de sílica e o volume de água duplicados.

1.1. Coluna cromatográfica de adsorção

A coluna de vidro é facilmente empacotada adicionando-se sílica gel, numa proporção de 1:30 (extrato/sílica gel) ou dependendo do caso até 1:100, suspensa em solvente, anteriormente selecionado através de análise por CCD, e passando várias vezes o solvente para melhor empacotamento da sílica. O extrato é adicionado na coluna, dissolvido em solvente adequado ou adsorvido em pequena quantidade de sílica gel, e os componentes eluídos.

A separação por coluna cromatográfica de sílica gel é facilmente utilizada tanto para pequenas como para grandes quantidades de amostra. Entretanto, é um processo lento e laborioso.

1.2. Cromatografia por exclusão molecular

Também conhecida como cromatografia de filtração em gel ou de permeação em gel, ela separa materiais com base em seus pesos moleculares. As moléculas maiores do que o tamanho dos poros do material de empacotamento (limite de exclusão) são eluídas primeiro, seguidas pelo restante em ordem decrescente de peso molecular.

2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC)

É particularmente utilizada para constituintes de alto peso molecular e pouco voláteis, bem como materiais termicamente instáveis. HPLC é uma técnica rápida, comparada aos métodos clássicos de cromatografia em camadas menos eficientes, e possibilita boas análises quantitativas além de poder ser automatizada para alta produtividade. A maior desvantagem da HPLC é o alto custo do equipamento.

Os materiais purificados podem ser identificados baseados em: i) valor de R_f em cromatografia em camada delgada (CCD), ii) coloração em CCD quando pulverizados com reagentes específicos, iii) através de espectros como o infravermelho, ultravioleta, ressonância magnética nuclear de próton e carbono-13, e espectro de massa, e iv) dependendo da classe química, esses compostos são também caracterizados por eletroforese.

Referências bibliográficas

HEISEY, R.M.; MISHRA, S.K.; PUTNAM, A.R.; MILLER, J.R.; WHITENACK, C.J.; KELLER, J.E.; HUANG, J. Production of herbicidal and insecticidal metabolites by soil microorganisms. In: CUTLER, H.G., ed. **Biologically active natural products**: potencial use in agriculture. Washington: ACS, 1988. Chap. 5, p.65-78. (ACS Symposium Series, 380).

HO, W.C.; KO, W.H. Alkalized water agar as a selective medium for enumerating soil actinomycetes. **Phytopathology**, v.69, p.1031, 1979.

KUSTER, E.; WILLIAMS, S.T. Selection of four isolations of streptomycetes. **Nature**, v.202, p.928-929, 1964.

- LIEVENS, K.H.; Van RIJSBERGEN, R.; LEYNS, F.R.; LAMBERT, B.J.; TENNING, P.; SWINGS, J. & JOOS, H.J.-P. Dominant rhizosphere bacteria as a source for antifungal agents. **Pesticide Science**, v.27, p.141-154, 1989.
- STESSEL, G.L.; LEBEN, C.; KEIT, G.M. Screening tests designed to discover antibiotics suitable for plant disease control. **Mycologia**, v.45, p.325-334, 1953.
- MIZUNO, K.; YAGI, A.; TAKADA, M.; MATSUURA, K.; YAMAGUCHI, K.; ASANO, K. A new antibiotic, talaron. **Journal of Antibiotics**, v.27, p.560-563, 1974.
- GHISALBERTI, E.L.; NARBAY, M.J.; DEWAN, M.M.; SIVASITHAMPARAM, K. Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. **Plant and Soil**, v.121, p.287-291, 1990.

FORMULAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS PARA O CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Claudia C. Medugno¹

Na área química, formular é a ação de encontrar uma combinação apropriada de ingredientes de um produto, e expressar suas concentrações matematicamente, através de uma fórmula.

Em geral, formulação é a maneira de apresentar o ingrediente ativo em uma forma física mais efetiva com respeito à atividade biológica, estocagem e aplicação. Também pode-se definir formulação, de acordo com Flanagan (1983), como a mistura física de um ou mais princípios ativos com ingredientes inertes para promover o controle efetivo e econômico de pragas e doenças. Nada mais é que o processo de transformação de um pesticida em um produto que possa ser aplicado por métodos práticos que permitam seu uso efetivo, seguro e econômico.

1. Tipos de formulações

Até o presente, a legislação para Registro e Fiscalização segue o que existe para agrotóxicos. Neste item estão relacionados os diversos tipos de formulações, com as respectivas siglas e definições. Muitas das formulações foram retiradas da relação por não serem adequadas a microrganismos. Na maioria das vezes, o agente biológico de controle é uma entidade unicelular (poliedros, esporos, bacilos) cuja habilidade de causar a doença desaparece se a célula for rompida física ou quimicamente. Dessa forma, foram retiradas as formulações que descrevem soluções verdadeiras, homogêneas, ou que desprendem gases. Por exemplo, saíram emulsão, microemulsão, granulado solúvel, pó solúvel, líquido para pulverização eletrostática, óleo para pulverização, solução para tratamento de sementes, pastilha fumigante, gerador de gás, laca, etc. A relação consta da Norma de Tecnologia da ABNT, NBR-8510, de outubro de 1990. As siglas foram elaboradas pela GIFAP e adotadas pela FAO e outras organizações internacionais.

¹ Química, M.Sc., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP.

1.1. Formulações para diluição com água

| Sigla | Tipo | Definição |
|--------------|--------------------------------|---|
| CS | Suspensão de Encapsulado | Formulação constituída por uma Encapsulado suspensão estável de cápsulas, contendo o(s) ingrediente(s) ativo(s), num líquido, para aplicação após diluição em água. |
| EC | Concentração Emulsionável | Formulação líquida homogênea para aplicação após diluição em água sob a forma de emulsão. |
| SC | Suspensão Concentrada | Formulação constituída por uma suspensão estável de ingrediente(s) ativo(s) num veículo líquido, que pode conter outro(s) ingrediente(s) ativo(s) dissolvido(s) para aplicação após diluição em água. |
| SCS | Suspo/suspensão de encapsulado | Formulação constituída de uma suspensão estável de ingrediente(s) ativo(s) na forma de partículas sólidas e de cápsulas num líquido para aplicação após diluição em água. |
| SE | Suspo/emulsão | Formulação fluida e heterogênea, constituída de uma dispersão estável de ingredientes ativos, na forma de partículas sólidas e de finos glóbulos, na fase contínua aquosa para aplicação após diluição em água. |
| TB | Tablete | Formulação sólida que se apresenta sob a forma de tabletes para aplicação após a dissolução/dispersão em água. |
| WG* | Granulado | Formulação sólida constituída de grânulos para aplicação sob a forma de suspensão após a desintegração e dispersão em água. |
| WP | Pó molhável | Formulação sólida, na forma de pós, para aplicação sob a forma de suspensão, após a dispersão em água. |

* Este tipo de formulação também poderá ser utilizada em aplicação direta.

1.2. Formulações para diluições com solventes orgânicos

| Sigla | Tipo | Definição |
|--------------|---|---|
| OF | Suspensão concentrada dispersível em óleo | Formulação constituída por uma suspensão estável de ingrediente(s) ativo(s) para aplicação após dispersão num líquido orgânico. |
| OP | Pó dispersível em óleo | Formulação sólida na forma de pó, para aplicação após a dispersão em um líquido orgânico sob a forma de suspensão. |

1.3. Formulações para aplicação direta

| Sigla | Tipo | Definição |
|--------------|------------------------------|--|
| CG | Granulado Encapsulado | Formulação sólida, uniforme, sob a forma de granulados, possuindo cobertura para proteção ou para liberação controlada do(s) ingrediente(s) ativo(s), para aplicação direta. |
| DP | Pó seco | Formulação sólida, uniforme, sob a forma de pó, possuindo boa mobilidade para aplicação direta através de polvilhamento. |
| GR | Granulado | Formulação sólida, uniforme, sob a forma de granulados com dimensões bem definidas, para aplicação direta. |
| SU | Suspensão Ultra Baixo Volume | Formulação constituída por uma suspensão estável de ingrediente(s) ativo(s) num líquido para aplicação direta e específica em equipamentos de pulverização a Ultra Baixo Volume. |

1.4. Formulações para tratamento de sementes

| Sigla | Tipo | Definição |
|--------------|---|--|
| DS | Pó para tratamento a seco de sementes | Formulação sólida, uniforme, sob a forma de pó, para aplicação direta sobre as sementes. |
| FS | Suspensão concentrada para tratamento de sementes | Formulação constituída por uma suspensão estável de ingrediente(s) ativo(s) num líquido, para aplicação direta sobre as sementes, como tal ou após diluição em água. |
| WO | Pó para preparação de pasta em óleo | Formulação sólida, uniforme, sob a forma de pó para aplicação sobre as sementes, após a dispersão em óleo sob a forma de pasta. |
| WS | Pó para preparação de pasta em água | Formulação sólida, uniforme, sob a forma de pó para aplicação direta sobre as sementes, após a dispersão em água sob a forma de pasta. |

1.5. Formulações especiais

| Sigla | Tipo | Definição |
|--------------|-------------------|--|
| PR | Bastonete vegetal | Formulação sólida, uniforme, sob a forma de pequenos bastões com alguns centímetros de comprimento e alguns milímetros de diâmetro, impregnados com ingrediente(s) ativo(s) para aplicação direta. |
| PA | Pasta | Formulação pastosa uniforme, muito viscosa, a base de água, para aplicação direta sob a forma de película no alvo desejado. |
| RB | Isca | Formulação sólida, uniforme, sob diversas formas (*), para aplicação direta e destinada a atrair ou ser ingerida pelo alvo desejado. |

1.6. Adjuvantes para agrotóxicos

| | |
|-----------------------|--|
| Adjuvantes | Formulação que quando utilizada em conjunto com um agrotóxico, melhora a sua eficácia. As formulações de adjuvantes podem conter substâncias, tais como: agentes molhantes, espalhantes, dispersantes, supressores de espuma, reguladores de pH, solventes e solubilizantes. |
| Espalhantes* | Formulação que reduz a tensão interfacial de duas superfícies limítrofes, líquidas ou sólidas, modificando as propriedades de umectação, dispersibilidade, espalhamento e/ou emulsificação. |
| Espalhantes adesivos* | Formulação que aumenta a adesividade de um agrotóxico no alvo desejado. |

* Formas particulares de adjuvantes.

2. Atributos gerais das formulações

A forma final de um defensivo agrícola representa um compromisso entre as propriedades físicas e químicas do ingrediente ativo, a eficiência agrônômica, e fatores econômicos ligados à sua produção e comercialização. Os inseticidas biológicos apresentam as exigências de qualidade de qualquer defensivo convencional. Por exemplo, a formulação de um entomopatógeno com vida de prateleira superior a 18 meses é crítica para a industrialização. A razão é simples: se a preparação não for viável, virulenta e estável por um período prolongado, ela não é econômica do ponto de vista comercial. O produto deve apresentar diluição satisfatória em água com ampla faixa de dureza, composição e temperatura, frequentemente em mistura com outros pesticidas. A composição diluída deve se manter em suspensão ou diluição por um período de horas ou dias, em uma variedade de pulverizadores que podem ou não ser agitados. O fator diluição está na faixa de 1:5 a 1:1.000, e muitas vezes a formulação deve cobrir esses extremos. A formulação também não pode interferir com o processo de infecção, não pode afetar a cultura adversamente e, se possível, deve aumentar a chance de transmissão do agente causador da doença. A tecnologia de aplicação deve ser compatível com as já existentes no mercado, e o custo da formulação e a disponibilidade dos

componentes devem resultar em um produto de preço competitivo. Uma vez pulverizada, a formulação deve se espalhar para dar uma cobertura satisfatória, e as gotículas devem se reter no alvo.

A padronização do produto é essencial para a efetiva formulação do pesticida. Os inseticidas biológicos representam um problema especial, uma vez que não podem ser padronizados por análises químicas. A padronização deve ser analisada do ponto de vista do fabricante (manutenção de certas qualidades), e do usuário (eficácia contra a peste). A padronização é feita através de bioensaios, comparando-se a atividade do patógeno com padrões de referência. O controle de qualidade por parte do fabricante resulta em algum grau de padronização industrial, que pode diferir quando os produtos são comparados, devido a diferentes processos de produção, ao uso de diferentes isolados, ou ao uso de diferentes insetos (ou qualidade de insetos) no bioensaio.

3. Exemplos de formulações usuais

3.1. Pó molhável - WP

Um pó molhável é formulado para ser diluído com água no momento da aplicação no campo. A formulação de um pó molhável é mais difícil que a formulação de sistemas de dois componentes (pós secos e granulados). A razão é que agentes surfactantes devem ser adicionados para que se obtenha uma suspensão pulverizável quando o pó é diluído no tanque de aplicação. Um pó molhável é composto pelo princípio ativo, surfactantes, inertes, e possíveis 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, agentes gustatórios, protetores solares, tóxicos seletivos secundários, filtros solares, compostos gustatórios para a atração de insetos, etc.

A qualidade de uma formulação pó molhável é julgada pela rapidez da molhabilidade quando misturada em água, e pela estabilidade da suspensão obtida quando a formulação é diluída nas condições no campo. No preparo de uma formulação pó molhável, quando as partículas do sólido não estão associadas, elas sedimentam sob a força da gravidade, e podem ficar tão

perfeitamente empacotadas a ponto de se ligarem irreversivelmente. A redução do tamanho das partículas ou o aumento da viscosidade da fase contínua são insuficientes para eliminar a sedimentação (partículas muito finas presentes em um meio viscoso decantam mais lentamente que partículas maiores mas, após a sedimentação, elas se organizam em um denso arranjo estrutural difícil de ressuspender). A formulação de um pó molhável requer que a sedimentação seja minimizada, e isso pode ser conseguido pela produção de um sistema parcialmente flocculado. Os surfactantes são adicionados à formulação para promover flocculação reversível, conferir molhabilidade e reduzir a sedimentação na mistura do tanque. 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. A seleção do par compatível é um processo empírico, sendo geralmente necessário um grande número de tentativas. A molhabilidade de um pó é o tempo requerido para um dado peso da formulação umedecer completamente e submergir da superfície da água. Quanto menor for o período de tempo (em segundos) requerido para o umedecimento, melhor é a molhabilidade da formulação. A velocidade da molhabilidade pode ser aumentada pela escolha apropriada de agentes molhantes, como os não-iônicos, que são preferidos devido à baixa reatividade química, baixa fitotoxicidade, e razoável estabilidade sob condições ácidas e alcalinas. Também, não são afetados por água dura.

Outro componente essencial da formulação pó molhável é o inerte. O papel do inerte está longe de ser apenas o de um diluente sólido. Materiais finamente divididos, como argilas e óxidos, quando adicionados à uma suspensão podem, sob certas condições, eliminar a formação de sedimentos compactados. O tamanho e a forma de ativo desempenham um papel importante na seleção dos demais ingredientes. No caso de um pó ou pó molhável, uma grande diferença entre o ativo e o material inerte irá causar a segregação das partículas, afetando a sua distribuição.

3.2. Pó seco - DP

Os pós são formulações secas, aplicadas no campo, sem posterior diluição. A concentração do princípio ativo nestes produtos varia de 1 a 20 %, e o restante é completado com diluente. As principais propriedades para se avaliar um diluente para este tipo de formulação, são o tamanho da partícula, a densidade de compactação e a fluidez. A fluidez de um pó é a

velocidade com que o material pode ser despejado. É medida pela resistência do pó em fluir quando colocado em um plano inclinado. Os diluentes que tendem a aglomerar e formar bolos, requerem um grande ângulo de inclinação antes de começarem a fluir. A fluidez depende da forma, densidade e, em menor extensão, do tamanho das partículas. Quando o tamanho é reduzido, diminui a importância de diferenças na forma. Se fluírem livremente, partículas dentro de uma faixa de tamanho podem ser rapidamente misturadas. A densidade de compactação do inerte (uma medida da capacidade de empacotamento das partículas) vai afetar o grau de cobertura do pesticida, o arraste pelo vento, a penetração nas folhagens, a facilidade de manuseio durante a produção e aplicação, o custo do empacotamento e transporte, etc. Produtos feitos com inertes muito leves são espalhados pelo vento, com baixa deposição das partículas nos locais onde a praga deve ser controlada. Os inertes mais pesados não oferecem boa cobertura e são difíceis de aplicar. Existem diluentes sintéticos, como CaCO_3 e Ca_2SiO , que são especialmente planejados para aumentar ou diminuir a densidade de compactação. Esses diluentes também auxiliam na moagem e retardam a formação de bolos nos pós secos.

4. Determinação de suspensibilidade

Finalidade

Este método descreve um processo para a determinação da suspensibilidade de pós molháveis. O método pode, entretanto, ser adaptado à determinação de suspensibilidade de pós dispersivos e suspensões concentradas e pastas molháveis.

Método Resumido

Uma amostra representativa do material a ser analisado, contendo uma quantidade determinada de inseticida, é misturada com água dura para dar 250 ml de uma suspensão. A suspensão é deixada em repouso durante 30 minutos. Nove décimos do volume de suspensão são removidos por sucção e a quantidade restante da suspensão é determinada por pesagem. O teste pode ser feito usando água dura a 30°C.

Aparelhagem

- Banho de temperatura constante. Um recipiente capaz de acomodar várias provetas de 250 ml, imersas em água até acima da superfície graduada e de manter uma temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

- Conjunto para filtração, consistindo num frasco e adaptador para filtração a vácuo de cadinhos de Gooch.
- Provetas graduadas, com tampa esmerilhada, capacidade de 250 ml, graduação de 2 em 2 ml, uma distância de 20,5 a 21,5 cm.
- Estufa capaz de manter uma temperatura de $70 \pm 5^{\circ}\text{C}$.
- Termômetro tendo uma faixa de 0 a 100°C , com precisão de $0,5^{\circ}\text{C}$. O termômetro GP 105 C/0,5 é adequado.
- Tubo de vidro de cerca de 40 cm de comprimento e 5 mm de diâmetro interno, devendo a ponta ser mergulhada na suspensão sobre um estreitamento de modo a ficar com diâmetro de 2-3 mm. A outra ponta será conectada a um reservatório apropriado, ligada a um sistema de vácuo.
- Balança analítica.

Reagentes

Água dura tendo uma dureza total de 20 ppm de carbonato de cálcio.

Protocolo

1. Em um béquer de 250 ml contendo 30 ml de água dura a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, adicionar lentamente 2,5 g do material a ser analisado, e agitar o béquer com a mão a uma velocidade de 120 rotações por minuto. Fazer adição do pó molhável e os outros durante um período de 5-10 segundos. Continuar a agitação do conteúdo do béquer à mesma velocidade por um período total de 2 minutos, e em seguida mantê-lo em repouso por um período de 15 minutos à mesma temperatura. Transferir quantitativamente a "lama" produzida para uma proveta de 250 ml com tampa esmerilhada, e completar o volume com água dura a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
2. Tampar a proveta, invertê-la 30 vezes (uma a cada dois segundos) girando-a de 180°C e retornando à posição original. Anotar a hora e deixar a proveta em repouso durante 30 minutos. De preferência, usar um cronômetro para marcar o tempo. Manter a proveta a 30°C durante esse tempo, em banho-maria.

3. Ao final dos 30 minutos, remover a proveta do banho, inserir o tubo de vidro e por meio de vácuo succionar nove décimos do volume (225 ml) da suspensão. Conduzir a operação durante 10-15 segundos, mantendo a ponta do tubo imersa no ponto de interrupção e tendo o cuidado de reduzir ao mínimo qualquer turbilhonamento.
4. Filtrar o décimo restante (25 ml) da suspensão em um cadinho de Gooch, usando água destilada para lavar a proveta. Se aparecerem sólidos ou turvação no filtrado, refiltrar no mesmo cadinho até que o filtrado se apresente completamente transparente. Colocar o cadinho em um dessecador à vácuo sobre P_2O_5 deixando a torta secar de um dia para outro ou pelo menos, durante 8 horas, ou secar na estufa a $70 \pm 5^\circ C$.
5. Determinar a quantidade do material que restou nos 25 ml de suspensão, de acordo com o método aplicado na fórmula.

Observações

1. Para o caso das suspensões, o tempo deverá ser de 2 horas ao invés de 30 minutos
2. No caso de ressuspensibilidade, ao atingir o tempo necessário, deve-se inverter as provetas por mais três vezes e deixar no banho por mais um período de tempo, procedendo-se, em seguida, como manda o método.

Cálculo

Calcular a suspensibilidade da amostra pela seguinte equação e anotar os resultados com precisão de 1 %.

$$\text{Suspensibilidade, \% m/m} = \frac{b-a}{b} \times \frac{1000}{9}$$

onde:

a = Peso do material a ser analisado encontrado no extrato de 25 ml de suspensão, gramas.

b = Peso do mesmo inseticida na amostra usada para preparar a suspensão, gramas.

5. Determinação de molhabilidade

Finalidade

Este método descreve um processo para a determinação de molhabilidade em pós molháveis e pastas molháveis.

Resumo do método

Uma quantidade pesada de amostra é jogada na superfície de água dura em um béquer de altura especificada e anota-se o tempo gasto para a amostra ficar completamente molhada.

Aparelhagem

Béquer com capacidade de 250 ml, diâmetro interno 6,5 cm e altura 9,0 cm; cronômetro com precisão de segundos.

Reagentes

Água dura tendo uma dureza total equivalente a 20 ppm de carbonato de cálcio.

Procedimento

Introduzir num béquer 100 ml de água dura; pesar cerca de 5 g de uma amostra representativa do material. Adicionar a amostra pesada, sem agitação e de uma só vez, à água dura contida no béquer, jogando a amostra na superfície da água de uma altura correspondente à agulha do béquer. Começar a marcar o tempo quando o pó for adicionado e anotar o tempo gasto para que a amostra fique completamente molhada.

Referências bibliográficas

BOTTS, M.F. Using computers in the development of pesticide formulations. In: SCHER, H.B., ed. **Advances in pesticide formulation technology**. Washington: American Chemical Society, 1984. Chapter 7, p. 89-104. (ACS Symposium Series, 254).

- BURGES, H.D. Safety, safety testing and quality control of microbial pesticides. In: BURGES, H.D. ed. **Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. Chapter 40, p.737-767.
- CORNELL, J.A.; DENG, J.C. Combining process variables and ingredient components in mixing experiments. **Journal of Food Science**, v.47, p.836-848, 1982.
- DAOUST, R.A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.40, p.228-236, 1982.
- GREMLYN, R.J. **Pesticides: preparation and mode of action**. New York: John Wiley, 1979. 240p.
- KURSTAK, E. **Microbial and viral pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1982. 720p.
- LUTHY, P.; ARIF, B.M. Designing microorganisms for insect control. **BioEssays**, v.2, n.1, p.23-25, 1985.
- MARSHALL, K.C. Clay mineralogy in relation to survival of soil bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.13, p.357-373, 1975.
- 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. 250p. (ACS Symposium Series, 254).

SEAMAN, D. Colloid and surface science and technology in the pesticide industry. **Chemistry and Industry**, n.12/24:159-165, Mar. 1979.

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., eds. **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v.2, p. 157-179.

ENCAPSULAMENTO DE MICRORGANISMOS

Rosa Maria V. Sanhueza¹

Itamar S. de Melo²

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, sobrevivência curta 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 sua 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 propilenóxido.

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

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

¹ Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPUV, Caixa Postal 130, 95700-000 - Bento Gonçalves, RS.

² Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA-CNPMA, Caixa Postal 69, 13820-000 - Jaguariúna, SP.

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 granulado encapsulado (“pellets”) do organismo antagonico, na qual os propágulos sejam mantidos viáveis durante o armazenamento nas condições do ambiente e que mantenham atividade antagonica 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 e uma bomba peristáltica.
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 seu 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 hemacitômetro;
10. Outro procedimento utilizado é dissolver os grânulos (10) em tampão fosfato (100 ml) e proceder o 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.

Referências bibliográficas

FRAVEL, D.R.; MAROIS, J.J.; LUMSDEN, R.D.; CONNICK JUNIOR, W.J. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate clay matrix. *Phytopathology*, v.69, p.64-68, 1985.

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

LEWIS, J.A.; PAPAIVIZAS, 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.



APÊNDICE

MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

1. Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

Composição

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Batata (Caldo)* | 200,0 ml |
| Dextrose..... | 20,0 g |
| Ágar | 15,0 g |
| Água destilada. Completar para..... | 1.000,0 ml |
| pH ajustado para 6.0 com NaOH | |

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

* Cozinhar as batatas (1 kg por 1 litro de água) e aproveitar o caldo para preparo do meio de cultura.

2. Meio King B

Composição

| | |
|---|--------|
| | 20,0 g |
| Proteose peptona nº 3..... | 10,0 g |
| Glicerol..... | 1,5 g |
| K ₂ HPO ₄ anidro..... | 1,5 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O..... | 1,5 g |
| Ágar..... | 7,2 |
| pH..... | |

A formação de fluorescência por *Pseudomonas* depende do tipo de peptona utilizada na preparação do meio. King et al. (1948) demonstraram que o conteúdo de fosfato juntamente com a reação alcalina simultânea do meio são responsáveis pela formação de pigmento, geralmente amarelo esverdeado. Observaram também que a formação de fluorescência é estimulada intensamente se estão presentes no meio ions magnésio e glicerina.

É bom que, após autoclavagem do meio, não haja queda do pH o que reduz a formação de fluorescência.

Para aumentar a produção de pigmento no meio KB, Garibaldi (1967), citado por Tuite (1969), adicionou ao meio 10% de clara de ovo esterilizada, a 45°.

Referências bibliográficas

- KING, J.V.; CAMPELL, J.J.R.; EAGLES, B.A. The mineral requeriment for fluorescein production. **Canadian Journal Research**, v.26, p.514-519, 1948.
- TUITE, J., ed. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969.

3. Meio Líquido para Produção de Sideróforos

Composição

| | |
|--|----------|
| Sacarose | 20,0 g |
| L-asparagina | 2,0 g |
| K ₂ HPO ₄ | 1,0 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5 g |
| Água destilada | 1.000 ml |
| pH | 7.1 |

Esterilizar ou adicionar a sacarose, ao meio, por filtração.

Referência bibliográfica

- SCHER, F.M.; BAKER, R. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. **Phytopatology**, v.72. p.1567-73, 1982.

4. Meio de cultura para isolamento de actinomicetos: PORTES Pimarinica

Composição

| | |
|-------------------------|--------|
| Glicerol | 20,0 g |
| L-arginina | 2,5 g |
| NaCl | 1,0 g |
| CaCO ₃ | 0,1 g |

| | |
|--|----------|
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,1 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,1 g |
| Pimaricina | 50 ug/ml |
| Água destilada..... | 1.000 ml |
| Ágar | 15 g |
| pH..... | 7.2-7.4 |

Adicionar pimaricina após autoclavagem do meio.

5. Isolamento de fungos: meio de Martin, modificado

Composição

| | |
|--|----------|
| KH ₂ PO ₄ | 1,0 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5 g |
| Peptona | 5,0 g |
| Dextrose | 10,0 g |
| Rosa Bengala | 0,033 g |
| Estreptomicina (sigma) 772 u/mg | 0,03 g |
| Oxgall (sigma) | 5,0 g |
| Propionato de sódio | 1,0 g |
| Ágar | 15,0 g |
| Água | 1.000 ml |
| pH | 5.6-5.8 |

6. MPE (produção de antibióticos a partir de actinomicetos)

Composição

| | |
|-------------------------|----------|
| Farinha de soja | 2 % |
| Glucose | 2 % |
| CaCO ₃ | 0,2 % |
| NaCl..... | 0,5 % |
| Água destilada | 1.000 ml |
| pH | 7.0 |

7. Meio glicerol asparaginato ágar (actinomicetos)

Composição

| | |
|-----------------------------|----------|
| Glicerol | 10 ml |
| K_2HPO_4 | 1 g |
| Asparaginato de sódio | 1 g |
| $CaCO_3$ | 3 g |
| Ágar | 15 g |
| Água destilada | 1.000 ml |
| pH..... | 7.0 |

8. Meio de extrato de malte (isolamento de bactérias e leveduras)

Composição

| | |
|----------------------|----------|
| Malte | 20,0 g |
| Dextrose | 20,0 g |
| Peptone | 10,0 g |
| Ágar | 20,0 g |
| Água destilada | 1.000 ml |
| pH | 6.5 |

9. Meio de Martin modificado por Homechin (1987) (isolamento seletivo de *Trichoderma*)

Composição

| | |
|----------------------------|---|
| KH_2PO_4 | 1 g (KH_2PO_4 :0,5g+0,5g K_2HPO_4 *) |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,5 g |
| Peptona | 5,0 g |
| Dextrose | 10,0 g |
| Rosa de Bengala | 0,033 g |
| Agrimicina 100 | 0,18 g Estreptomicina: 0,03 g* |
| PCNB | 0,20 g |
| Ágar (17) | 20,0 g |
| Água destilada | 1.000 ml |
| pH..... | 6.0 |

* Meio de Martin original.

Referência bibliográfica

HOMECHIN, M. **Potencial e emprego de isolados brasileiros de *Trichoderma harzianum*, Rifai, para controle de patógenos de soja.** Piracicaba:ESALQ/USP, 1987. 186p. Tese Doutorado.

10. Solução de Benomil

Metil-1.(Butilcarbamoil) 2-Benzimidazol Carmabato.....100,0 mg
 Água destilada esterilizada100,0 ml
 O Benomil é o Benlate 500 (50% de princípio ativo)

O Benomil deve ser dissolvido em acetona e acrescentar posteriormente a água. Depois de filtrar colocar em banho-maria durante 15 minutos. A solução é colocada ao meio fundente.

11. Meio caseína-glicerol (actinomicetos dil. 10)

Composição

Caseína (sem vitamina - DIFCO).....0,3 g
 Glicerol (ou amido)10,0 g
 KNO₃2 g
 NaCl2 g
 K₂HPO₄2 g
 MgSO₄x7H₂O0,05 g
 CaCO₃0,02 g
 FeSO₄x7H₂O0,01 g
 Ágar18 g
 Água destilada1.000 ml
 pH.....7.0

12. Tampão Fosfato 0,2 M, pH 5,8

Solução A

NaH₂PO₄.H₂O 24,0 g
 Água destilada1.000 ml

Solução B

| | |
|--|----------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 71,6 g |
| Água destilada | 1.000 ml |

Na obtenção da solução tampão 0,2 M, misturar uma proporção de nove para uma (9:1) das soluções A e B respectivamente. O pH é ajustado com as soluções A e B e completado até 100 ml com água destilada. As soluções A e B são mantidas separadamente em refrigerador.

13. Solução Lactofenol + trypan-blue

| | |
|----------------------|----------|
| Fenol | 20 g |
| Ácido láctico | 20 g |
| Glicerina | 40 g |
| Água destilada | 20 g |
| Trypan-blue | 1 g (1%) |

14. Solução Salina (0,85%)

| | |
|----------------------|----------|
| NaCl | 8,5 g |
| Água destilada | 1.000 ml |

Esterilizar e conservar em geladeira.

15. Solução de "Tween 80" (0,1% v/v)

| | |
|----------------------|---------|
| Tween 80 | 0,1 ml |
| Água destilada | 99,9 ml |

Esterilizar e conservar em meio ambiente.

16. Solução de Giemsa

| | |
|-----------------|---------|
| Giemsa | 1,0 |
| Glicerina | 66,0 ml |
| Metanol | 66,0 ml |

Misturar o giemsa com glicerina a 60°C durante 30 minutos. Após resfriamento adicionar o metanol. Filtrar a solução corante e armazená-la em frasco escuro a temperatura ambiente.

EMBRAPA

576

FICHA DO LIVRO

M528m

AUTOR MELO, I.S.de; SANHUEZA, R.
R.V.

TÍTULO: Método de seleção de mi-
croorganismos antagonísticos a fito-
patógenos: manual técnico.

DEVOLVER EM

NOME DO LEITOR

22/07/97

Sandra Pessoa de Lima

10/09/97

Fluor Fátima



EMBRAPA

— BIBLIOTECA —

