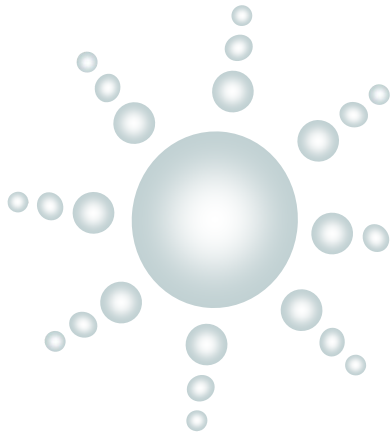


Curso de Tecnologia Pós-Colheita e Processamento Mínimo de
Produtos Hortofrutícolas, 3-4 Dezembro 2007



Protecção das culturas: alternativas ao uso de pesticidas convencionais

Helena Oliveira



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

Algumas das doenças mais comuns



míldio



Figure 1A. Late blight lesion on potato foliage. White "fuzz" is *Phytophthora infestans* sporulating from the lesion. (photo: R. V. James)



Figure 1B. Lesion as seen through a hand lens or dissecting microscope. Sporangiohores with sporangia are interspersed among leaf hairs. (photo: K. Loeffler)



Figure 1C. Micrograph of sporangia (lemon-shaped structures) on sporangiophores. Each sporangium is about 0.030 mm in length.

COOPERATIVE EXTENSION • NEW YORK STATE • CORNELL UNIVERSITY



Pythium sp.

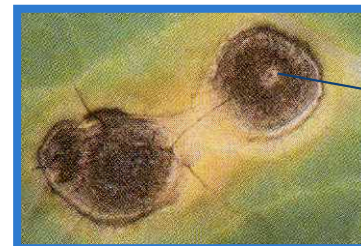


Xanthomonas campestris



Sclerotinia

Alternaria solani



Fusarioses vasculares

❖ **Agentes causais:** *Fusarium oxysporum* formae speciales



f. sp. lycopersici

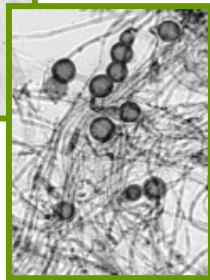
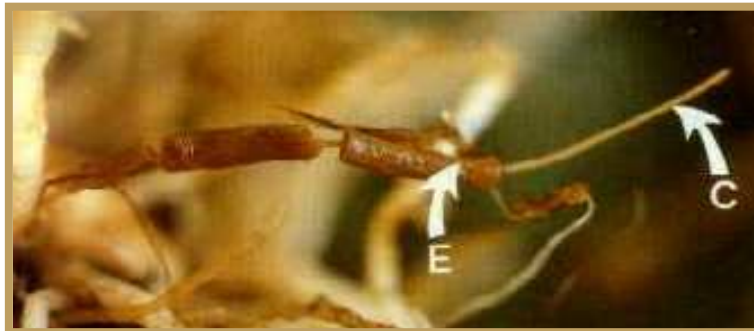
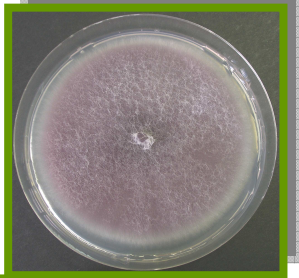


f. sp. melonis



f. sp. niveum

Necrose do colo e podridão radicular do tomateiro



*Fusarium oxysporum
radicis-lycopersici*



Não estão descritas raças fisiológicas

Sintomas causados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*



Região do Oeste, 2003



Algarve, 2004

Doenças radiculares



Phytophthora sp.



Fusarium oxysporum f.
sp. *radicis-lycopersici*

Fusarium oxysporum f.
sp. *lycopersici*



Colletotrichum coccodes



Meloidogyne



Globodera



Rhizoctonia

Department of Plant Pathology
North Dakota State University



Pyrenochaeta lycopersici

Complexos parasitários

- ❖ *Pythium*
- ❖ *Phytophthora*
- ❖ *Rhizoctonia*
- ❖ *Fusarium*
- ❖ *Sclerotinia*
- ❖ *Alternaria*



**Damping-off ou
murchidão e morte de
plântulas**

A limitação do uso dos pesticidas



Ministério da
Agricultura,
do Desenvolvimento
Rural e das Pescas



DGPC
Direcção-Geral
de Protecção das Culturas

DGADR

- ➔ **Substâncias activas **incluídas** na Lista Positiva Comunitária (LPC - Anexo 1 da Directiva 91/414/CEE)**

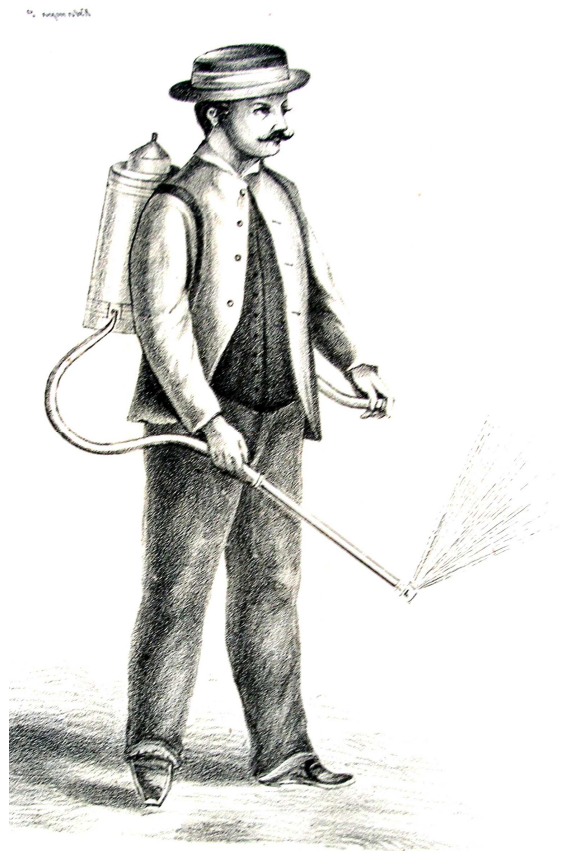
2 páginas
- ➔ **Substâncias activas **não incluídas** na Lista Positiva Comunitária (LPC - Anexo 1 da Directiva 91/414/CEE)**

6 páginas
- ➔ **Cancelamento de AVs e APVs (Circular 16/2004)
Rev. 26 de 19/11/2007**

17 páginas

Iremos regredir ao Séc. XIX?

- Enxofre
- Cúpricos

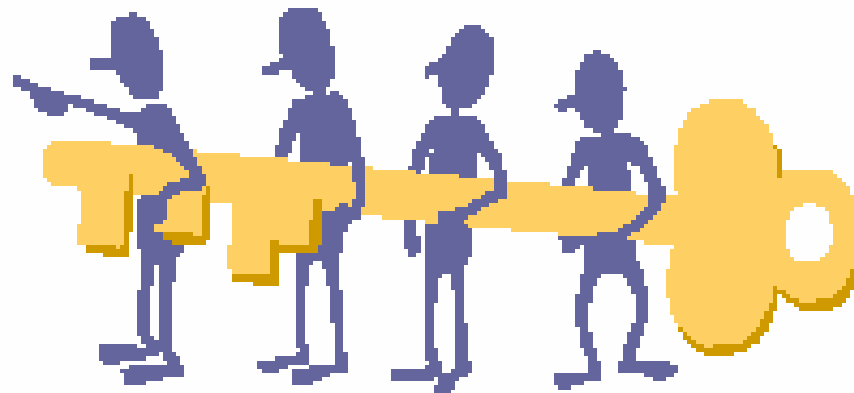


Almeida d`Eça
(1888)



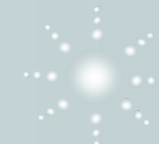
Não!

- ❖ mas, com as crescentes limitações ao uso dos pesticidas, como combater as doenças das plantas?



Prevenção

Modelo explicativo da doença



Triângulo da doença



Estudo de caso: Patogénios do rizoplano

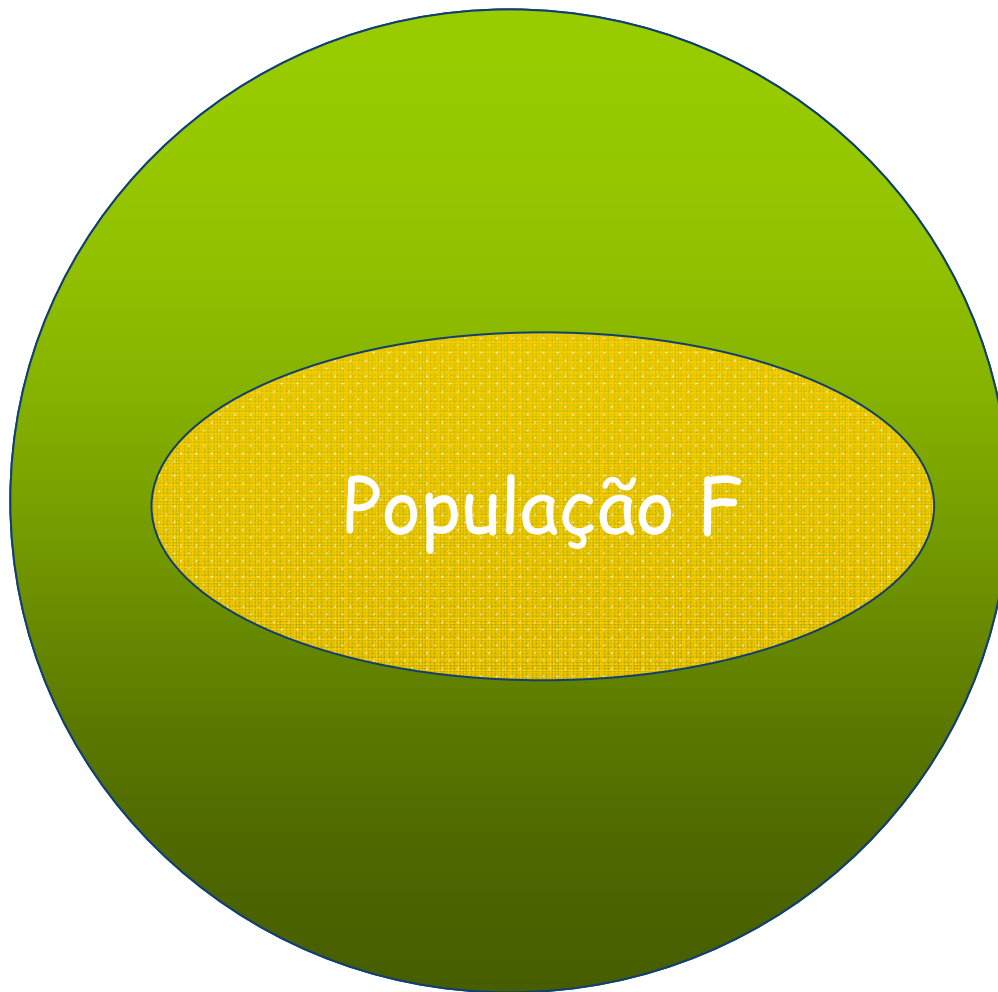
O passado recente

- Durante décadas esteve generalizada a aplicação de fumigantes ao solo
- **Brometo de metilo**, antes da instalação das culturas, era o método mais usado em muito países desenvolvidos
- Banido por razões toxicológicas e ambientais



Este facto veio relançar o estudo de métodos alternativos ao uso do brometo de metilo no combate aos patogénios do solo

As interacções entre microrganismos do solo são de natureza complexa



Forças complexas e divergentes, que se tendem a equilibrar



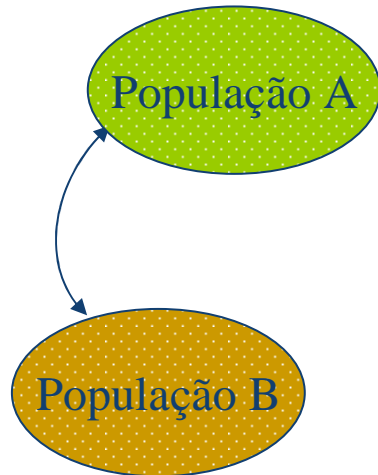
Homeostasia do sistema

Tratamento c/ pesticida
Stresse prolongado



Destruição da comunidade, de populações, ou proliferação incontrolada de determinada população

Interacções entre duas populações



B em A A em B	Favorável (+)	Nula (0)	Desfavorável (-)
Favorável (+)	++	+0	+ -
Nula (0)	0+	00	0-
Desfavorável (-)	- +	-0	--

++ , Protocooperação,
mutualismo, simbiose

+ 0 ou 0 + , comensalismo

- 0 ou 0 - , amensalismo

Controlo biológico


+ - , - + , diversas situações

-- , competição

Diversidade das relações + -

População A desenvolve-se na dependência da B.

Variação, consoante os autores, o que exprime a existência de variantes



Tipo de acção	Exclusão (antagonismo)	Trófica (exploração)
À distância	antibiose	lise (act. enzimática)
Por contacto	Interferência p/hifas	Predação e parasitismo

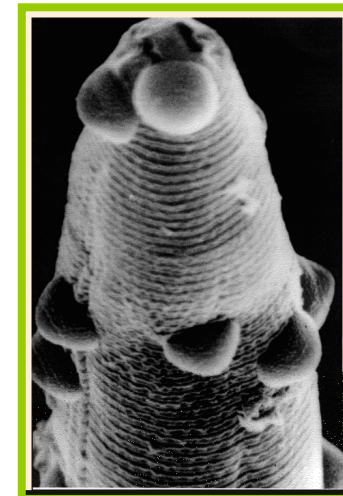
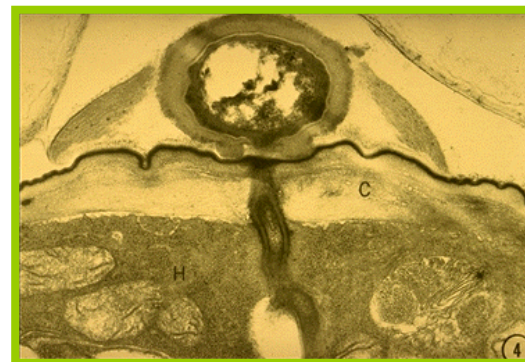
Diversidade das relações + - ...

❑ **Antibiose** (produção de antibióticos solúveis ou voláteis)



❑ **Lise** (resultante da acção de enzimas extracelulares que actuam na parede do organismo alvo)

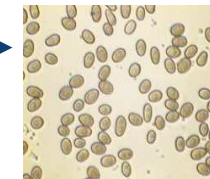
❑ **Predação** (absorção da presa, ex: fungos vs nemátodes)



Diversidade das relações + - ...

❑ **Parasitismo** (fixação de um organismo por outro, com fornecimento total ou complementar de nutrientes)

Parasita esclerotos de *Sclerotinia* spp.



Coniothyrium minitans vs *Sclerotinia* spp.



Alfaces infectadas por *Sclerotinia sclerotiorum*

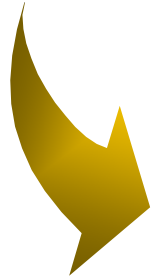
❖ **Competição**

□ para os nutrientes

Sideróforos e competição para o Ferro

Pseudomonas fluorescens vs. *Fusarium oxysporum*

pseudobactina vs **fusarinina**



Complexam o Fe^{3+} , em ambiente deficiente neste nutriente, inviabilizam a sua aquisição, por parte de outros microrganismos

Importantes em luta biológica

□ para os locais de infecção

- n° finito de locais de infecção

Pseudomonas vs. fungos patogénicos

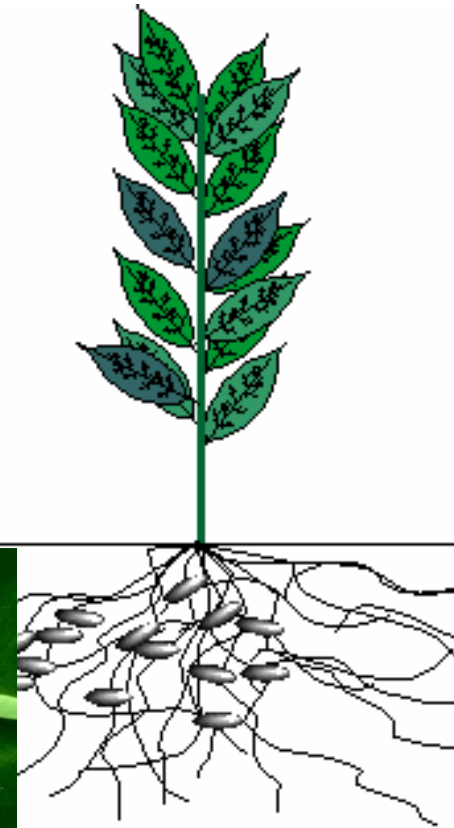
Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs)

- colonizam as raízes das plantas e vivem de compostos orgânicos por elas excretados, ex.

- produzem **sideróforos** que ajudam a planta a assimilar o **ferro** e a indisponibilizá-lo para outros patogénios

- **solubilizam fósforo** insolúvel existente no solo

- induzem a produção de citocininas, giberelinas e IAA



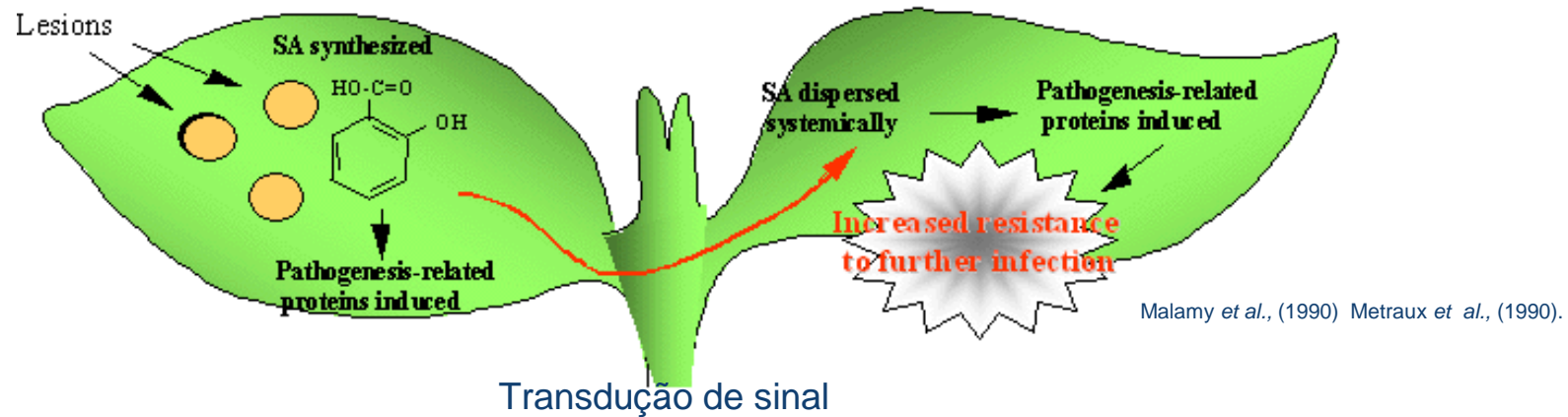
Mecanismo global - rizobactérias

Pseudomonas fluorescentes produzem metabolitos antifúngicos que restringem o crescimento de fungos patogênicos



Resistência Sistêmica Adquirida

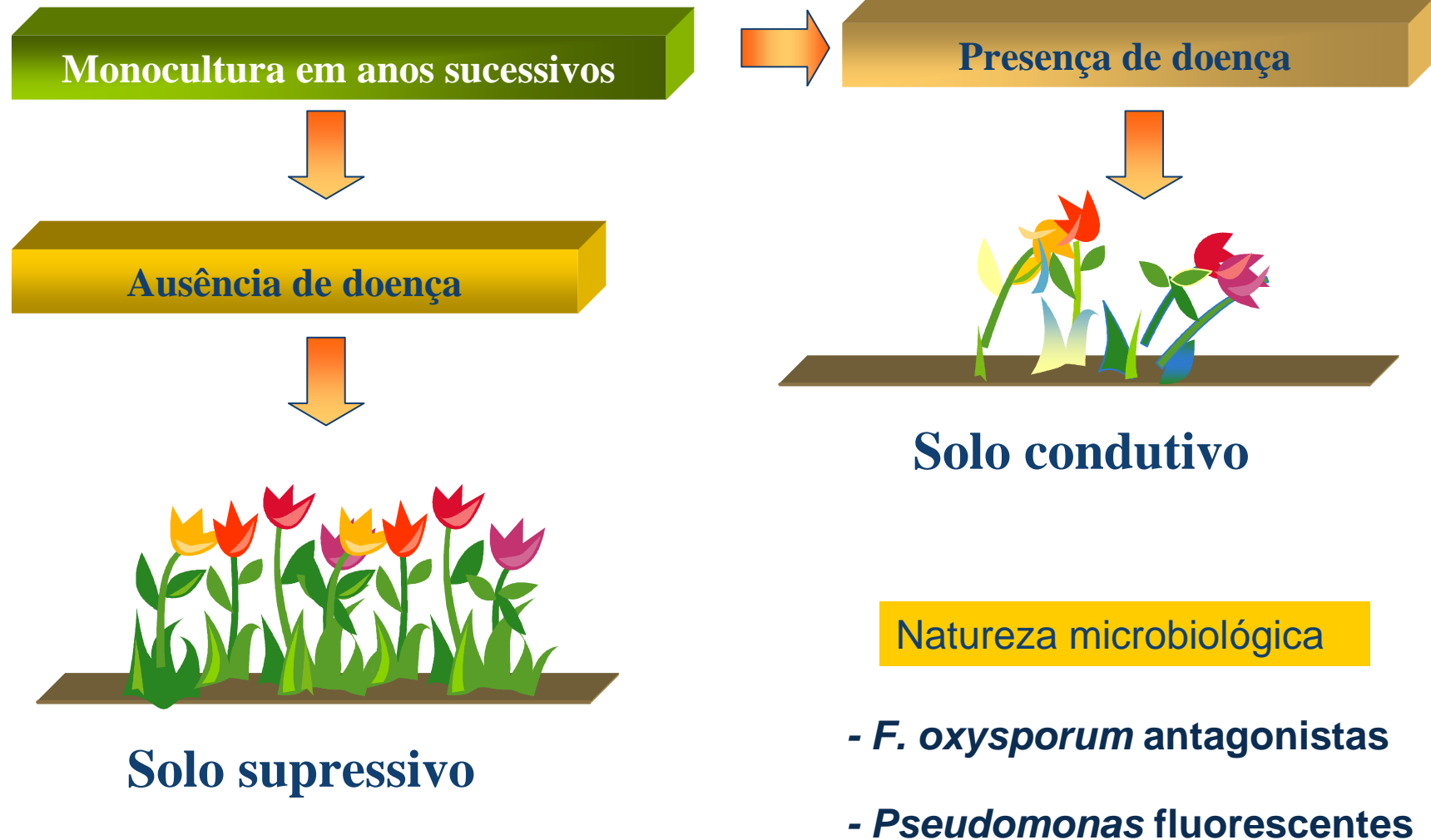
- ❖ **Mecanismo SAR** (demonstrado, entre outras, para inúmeras cucurbitáceas, crucíferas)



- ❖ Induzido por patógenos ou por compostos de síntese (ácido salicílico e isonicotínico)
- ❖ Protecção conferida em tecidos não expostos
- ❖ Protecção não-específica
- ❖ SAR relacionada com a expressão de várias famílias de genes, proteínas PR (quitinases, β -1,3 glucanases, outras)
- ❖ Transmissível por enxertia

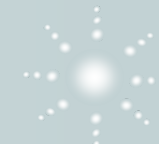
Princípio da supressividade dos solos

Solos supressivos a fusarioses vasculares



Meios de Luta alternativos a pesticidas convencionais

- ❖ **Culturais:** rotação cultural; drenagem do solo, sistemas de rega, alteração do pH do solo, adubações; incorporação de resíduos orgânicos no solo (biofumigação); solarização do solo
- ❖ **Genéticos:** cultivares resistentes
- ❖ **Físicos:** desinfecção por vapor de água, água quente
- ❖ **Biológicos:**
 - antagonistas
 - biopesticidas



Incorporação de **Brássicas** no solo

Biofumigação

Ricas em glucosinolatos

hidrólise



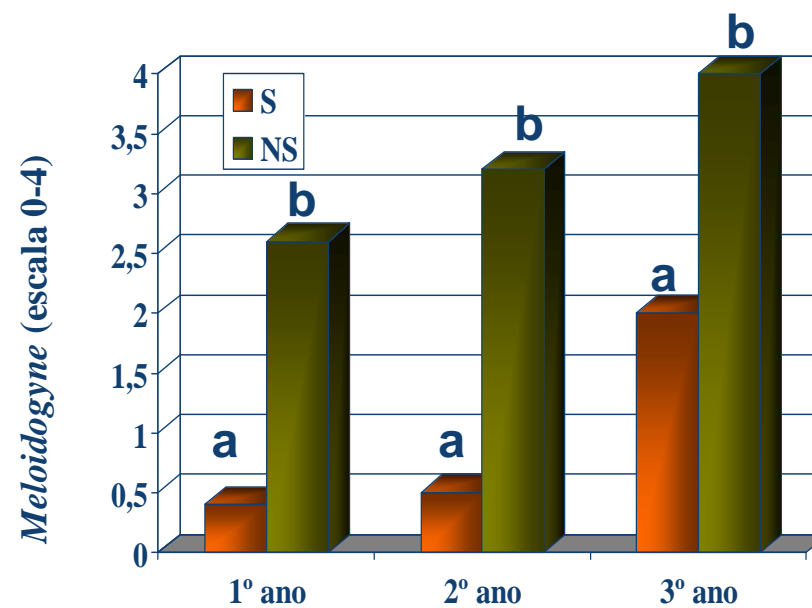
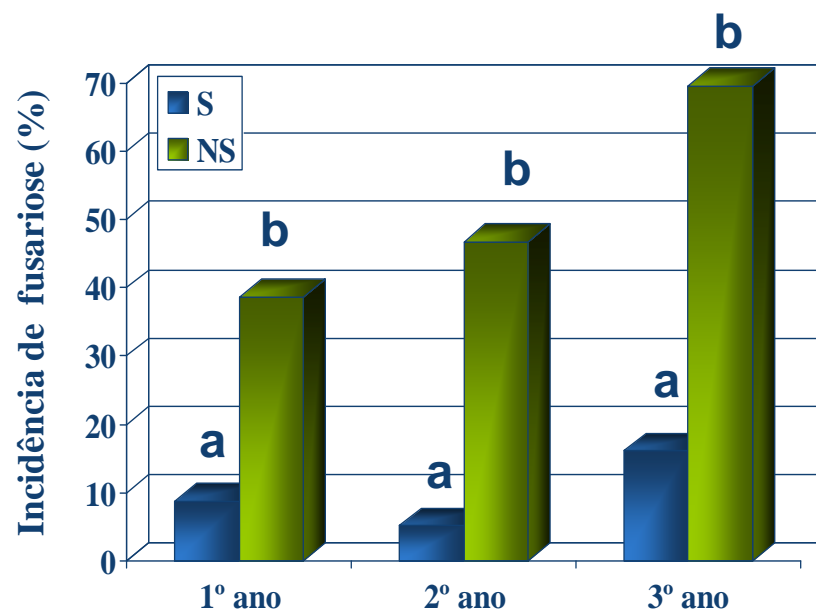
Produção de isotiocianatos



Brássicas

- Apresenta potencialidades, mas os resíduos podem ser fitotóxicos.

Solarização do solo (tomateiro)



Luta Genética

❖ **Primeira linha de defesa:** cultivares resistentes (genética clássica, ou plantas transgênicas)

❖ **Vantagens**

- **Sem problemas ambientais**
- **Compatíveis com outros meios de luta**

❖ **Desvantagens**

- **Não disponíveis para todas as doenças / culturas**
- **Quebra de resistência/tolerância**
- **Susceptibilidade a outras doenças**

Resistência Sistêmica Adquirida

Exs. de produtos comercializados nos EUA como ativadores de resistência

Nome	Origem	Patogénio-alvo	Cultura	Aplicação
Actigard	benzotiadiazol	largo espectro	tomate, alface, espinafre, etc	Rega, pulverização
Blockade	derivado do benzotiadiazol	míldios	saladas	pulverização
Messenger	harpina de <i>Erwinia amylovora</i>	largo espectro	Frutos, vegetais, etc	Rega, pulverização
Serenade	<i>Bacillus subtilis</i> , estirpe QST716	largo espectro	Frutos, vegetais, outros	pulverização

Quitosana

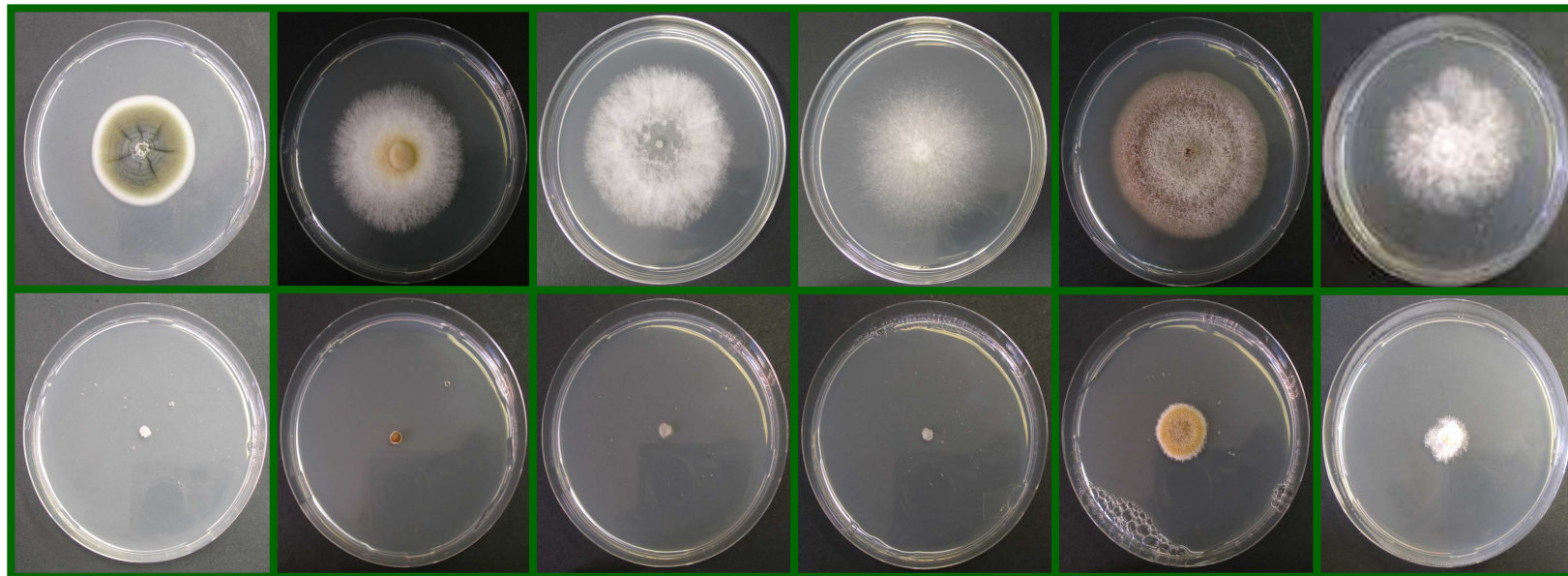


- ❖ É um bioestimulante obtido por desacetilação da quitina.
- ❖ As propriedades físicas e biológicas da quitosana possibilitam a sua aplicação em diversas áreas.
- ❖ Tem actividade quitinase e quitosanase.

Em agricultura é usado como:

- ❖ correctivo do solo
- ❖ na preservação antimicrobiana de alimentos
- ❖ revestimento protector em frutas e legumes
- ❖ biopesticida
- ❖ eliciador de mecanismos de defesa nas plantas

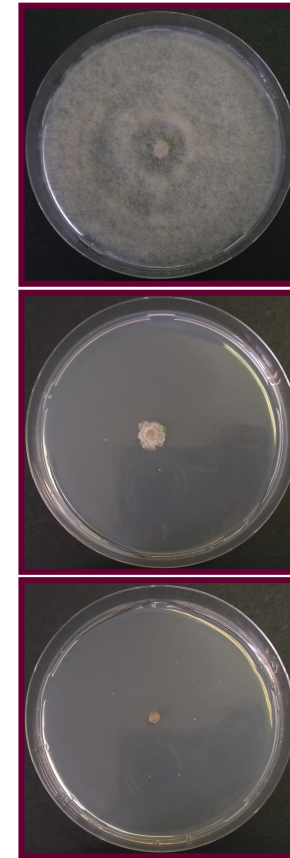
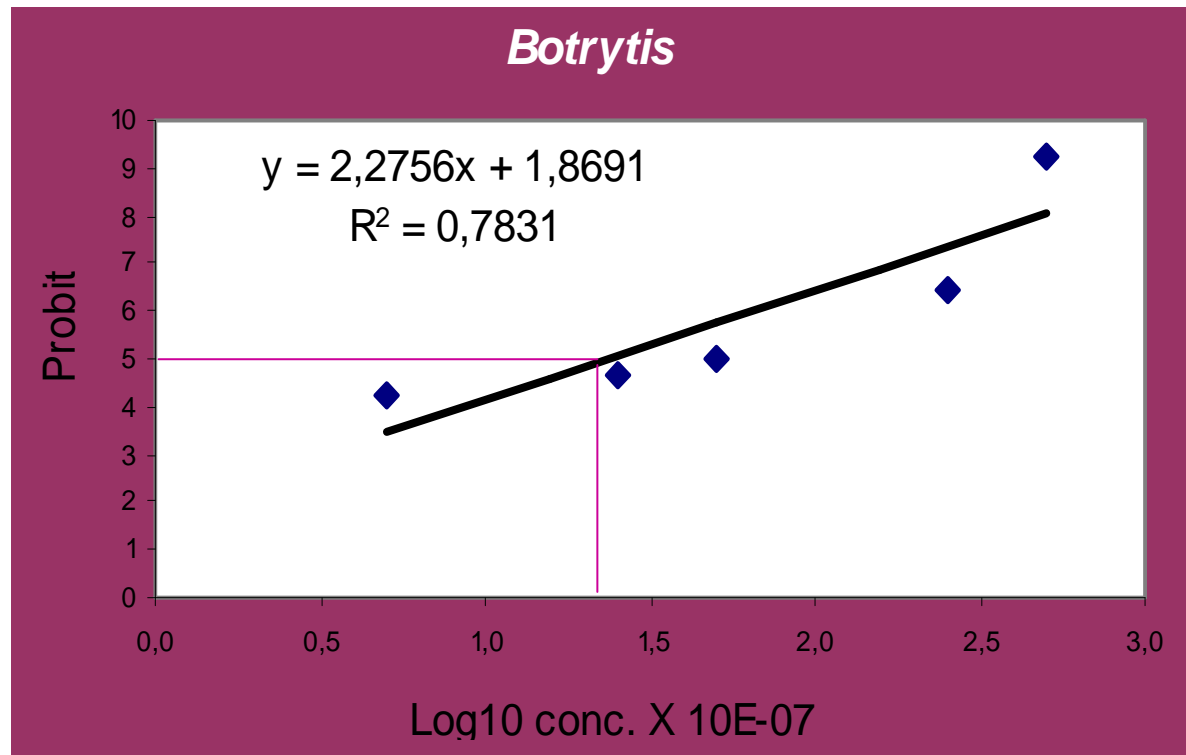
Efeito da quitosana



Pa. chlamydospora *Fomitiporia* sp. *Botryosphaeria* sp. *Eutypa* sp. *C. liriodendri* *Phomopsis* sp.

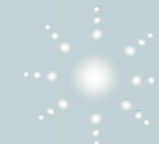
Crescimento micelial dos fungos em PDA (testemunha) e em PDA adicionado de quitosana (concentração mais elevada, 50,0 mg L⁻¹).

Efeito da quitosana em *Botrytis cinerea*



EC₅₀ = 2,38 mg s.a. L-1

Influência da quitosana em plantas infectadas por *Cylindrocarpon liriodendri*

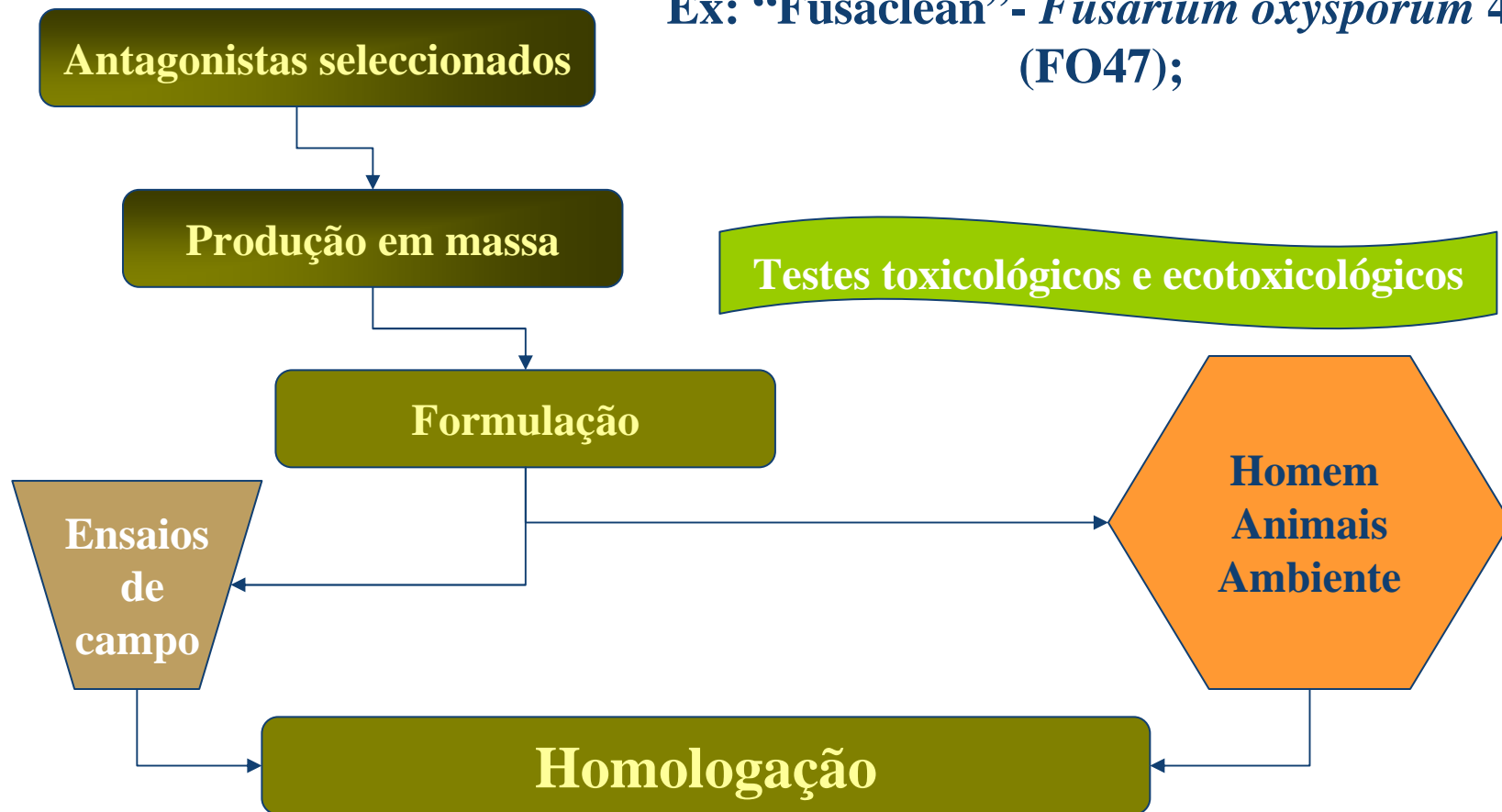


Tratamento	Altura do lançamento maior (mm)	No. total de raízes	Reisolamento (%)
água (Test.)	→ 105,90 a	→ 34,32 a	→ 80,83 a
tebuconazol	106,40 ab	44,60 ab	43,33 ab
carbendazime + flusilazol	112,50 ab	51,30 bc	40,83 ab
ciprodinil+fludioxonil	141,00 ab	60,20 c	21,67 b
quitosana	→ 136,90 b	→ 46,35 b	→ 32,05 b

Como se desenvolve um biopesticida?

➡ Desenvolvimento comercial de um produto biológico

Ex: “Fusaclean”- *Fusarium oxysporum* 47 (FO47);



Alguns biopesticidas

- ❖ ***Agrobacterium radiobacter*: Agrocin 84, Nogall**
- ❖ ***Bacillus subtilis* A13: Epic, Kodiak, Rhizo Plus, Serenade, System 3**
- ❖ ***Coniothyrium minitans*: Contans , KONI**
- ❖ ***Fusarium oxysporum*: Biofox C, Fusaclean**
- ❖ ***Gliocladium virens*: SoilGard**
- ❖ ***Gliocladium catenulatum*: PreStop, Primastop**
- ❖ ***Pythium oligandrum*: Polygandron**
- ❖ ***Trichoderma harzianum* and other spp.: Bio_Fungus, Binab_T, RootShield, T-22G, T-22 Planter Box, Bio-Trek), Supresivit, Trichodex, Trichopel, Trichoject, Trichodowels, Trichoseal , Trichoderma 2000**

Baseados em Bactérias Antagonistas

- ❖ ***Agrobacterium radiobacter*: Agrocin 84, Nogall**
- ❖ ***Bacillus subtilis* A13: Epic, Kodiak, Rhizo Plus, Serenade, System 3**

Mecanismos
gerais de acção

- ❖ Metabolitos antifúngicos
- ❖ Sideróforos
- ❖ Competição para os nutrientes
- ❖ Exclusão dos nichos ecológicos
- ❖ Resistência induzida

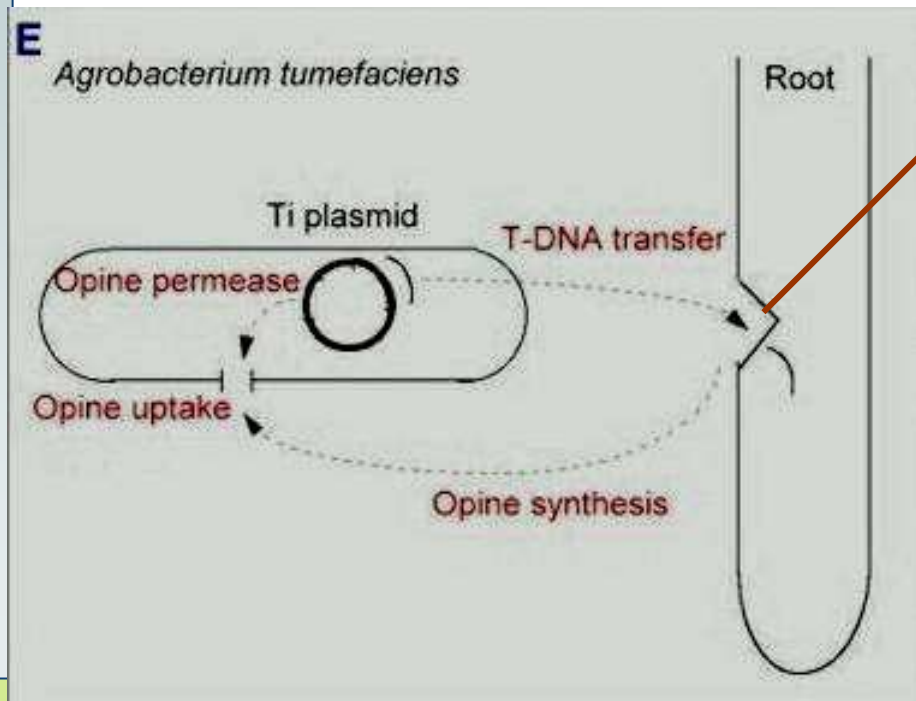
***Agrobacterium radiobacter*: Galltrol-A, Nogall, Diegall, Norbac 84C**

- ❖ **Organismo alvo:** *Agrobacterium tumefaciens*
- ❖ **Culturas:** fruteiras e ornamentais (viveiros)
- ❖ **Formulação:** suspensão aquosa contendo células bacterianas
- ❖ **Aplicação:** imersão de raízes e estacas, ou pulverização

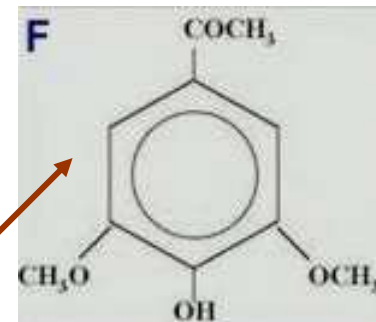


Infecção por *A. tumefaciens*

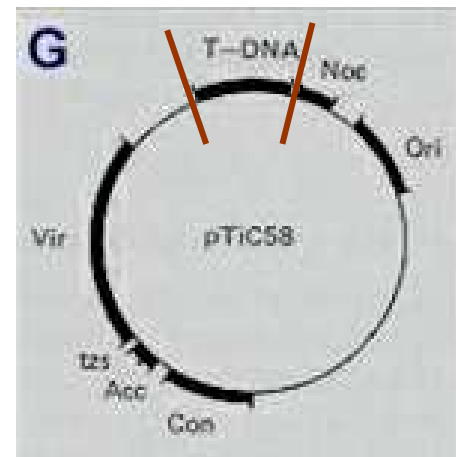
Ferida → Produção de fenóis



Acetosiringona



Atração de AT



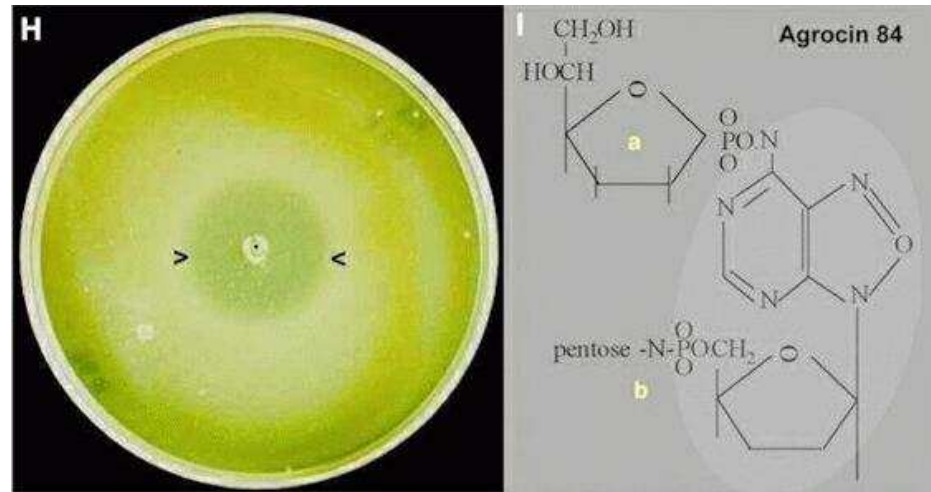
Ativação

- ✓ Genes *vir*
- ✓ Endonucleases
- ✓ Excisão do T-DNA

- ❖ Integração do T-DNA no DNA da planta, produção de opinas, agrocinopinas, citocininas, produção de IAA

Estirpes não patogénicas de *Agrobacterium radiobacter* produzem Agrocina 84

- ❖ Agrocina 84 é um falso nucleótido de adenina que é confundido com o verdadeiro, bloqueando a síntese de DNA em *AT* produtoras de nopalina.



- ❖ A síntese e a resistência à agrocina 84 é conferida pelo plasmídeo pAgK84 que pode ser transmitido a *A. tumefaciens* patogénicas, não produtoras de nopalina, tornando-as resistentes ao antibiótico.
- ❖ Por engenharia genética foi produzida a estirpe K1026 (obtida por deleção da região *tra* de pAgK84), análoga à K84, mas incapaz de transferir o plasmídeo mutante pAgK1026.

Bacillus subtilis - Kodiak



- ❖ **Organismos-alvo:** *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., e *Aspergillus* spp. que atacam raízes
- ❖ **Culturas:** algodão, amendoim e inúmeras hortícolas
- ❖ **Formulação:** pó, pode ser aplicado com fungicidas químicos
- ❖ **Aplicação:** desinfecção de sementes

Efeito bioestimulante: primeira Plant Growth Promoting Rhizobacterium

Baseados em Fungos Antagonistas

→ ❖ ***Coniothyrium minitans***: Contans, KONI

→ ❖ ***Trichoderma harzianum* e outras**

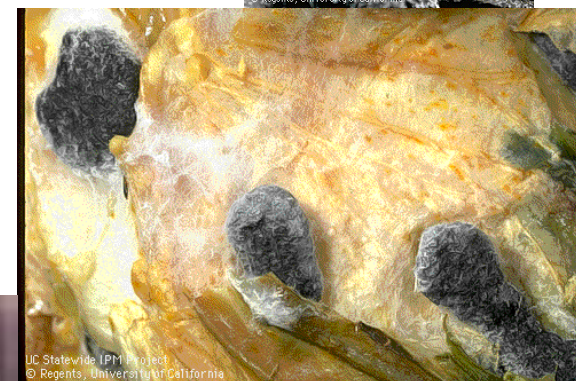
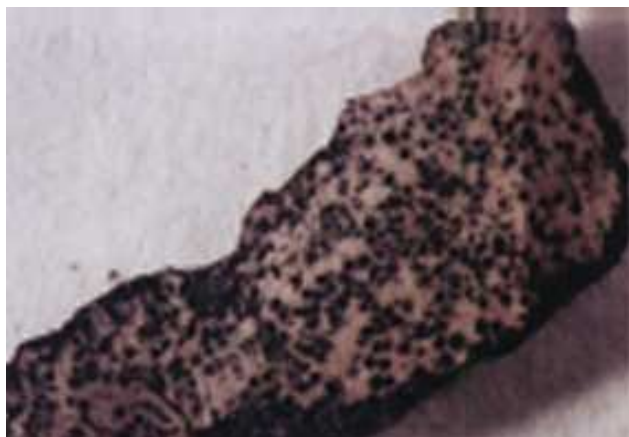
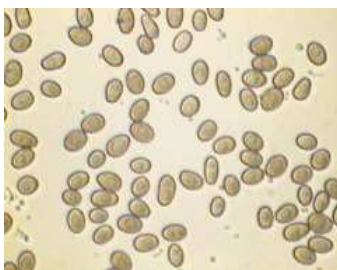
spp.: Trichodex, Trichopel, Trichoject,
Trichodowels, Trichoseal, Trichoderma 2000

Mecanismos
gerais de acção

- ❖ Micoparasitismo
- ❖ Metabolitos antifúngicos
- ❖ Acção enzimática
- ❖ Competição para os nutrientes
- ❖ Exclusão dos nichos ecológicos

Coniothyrium minitans

- ❖ **Organismos alvo:** *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*
- ❖ **Culturas:** girassol, amendoim, soja, e hortícolas (alface, feijão, tomate)
- ❖ **Formulação:** grânulos dispersíveis em água
- ❖ **Método de aplicação:** pulverização
- ❖ **Nomes comerciais**
 - CONTANS
 - KONI



Coniothyrium minitans

❖ Efeito sobre micélio de *Sclerotinia*

- Penetração por forças mecânicas
- Produção de β -1,3 glucanases, quitinases
- Colonização intracelular

❖ Efeito sobre esclerotos

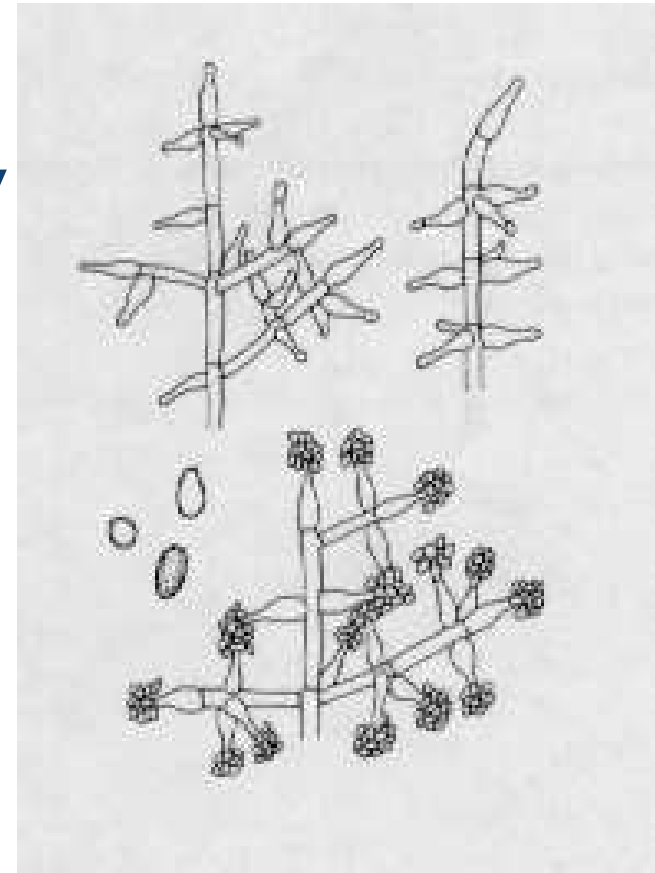
- Penetração por forças mecânicas e acção enzimática
- Colonização e colapso do escleroto
- Formação de picnídios no escleroto, 14 dias após infecção

❖ Indução de supressividade nos solos

- A adição de esclerotos ao solo não origina aumento de incidência de doença

Trichoderma spp.

- ❖ **BCA:** *Trichoderma harzianum* estirpe KRL-AG2 (T-22)
- ❖ **Organismos alvo:** *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp.
- ❖ **Culturas:** árvores e arbustos, transplantes, ornamentais, crucíferas, tomate, pepino
- ❖ **Formulações:** grânulos ou pó molhável
- ❖ **Aplicação:** ao solo, ou água de rega
- ❖ **Nomes comerciais:** vários



Trichoderma spp.

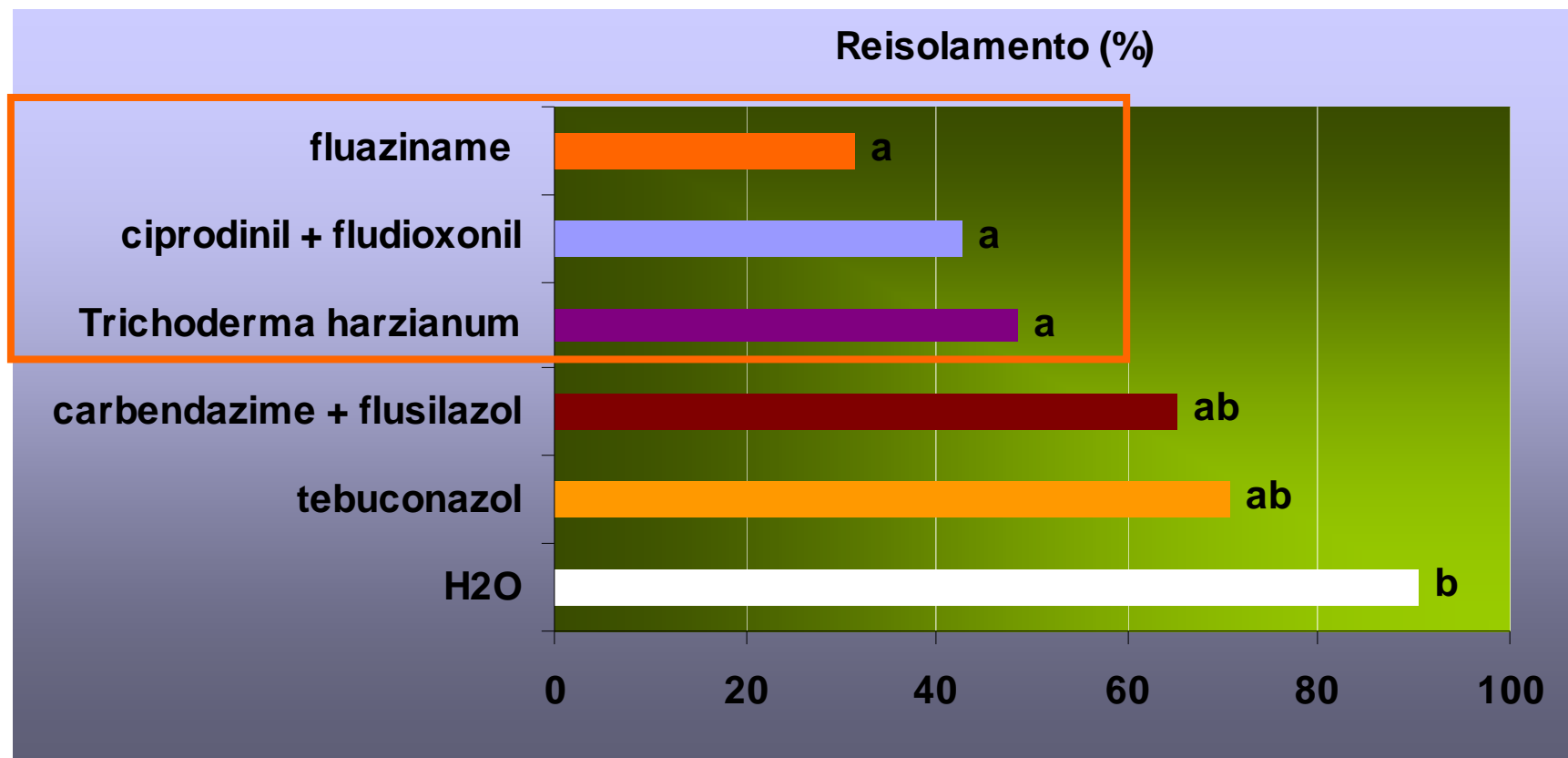


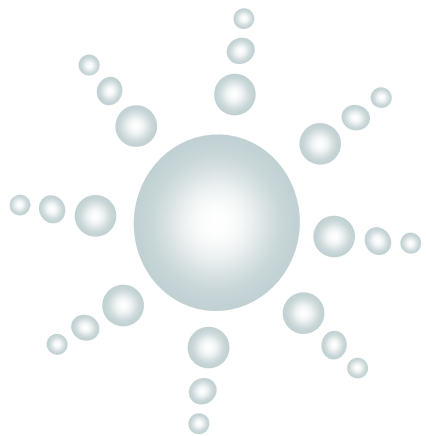
❖ Modo de acção

- Toxinas e antibióticos
- Compostos voláteis (álcoois, terpenos ...)
- Competição
- Micoparasitismo
 - quimiotaxia para o alvo
 - enzimas extracelulares (celulases e quitinases)
 - Diferenciam estruturas semelhantes a apressórios

Ensaio comparativo fungicidas vs. *Trichoderma contra* *Cylindrocarpon*

Eficácia de fungicidas e de *Trichoderma harzianum*





Fim!



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa