



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Fitopatologia

**Murcha bacteriana do eucalipto
causada por *Ralstonia solanacearum*
Raça 3 biovar 2T: etiologia, influência
do solo e controle**

Eder Marques

Brasília DF

Março 2012



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Fitopatologia

**Murcha bacteriana do eucalipto
causada por *Ralstonia solanacearum*
Raça 3 biovar 2T: etiologia, influência
do solo e controle**

Eder Marques

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Fitopatologia.

Brasília DF

Março 2012

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, sob a orientação do Professor Carlos Hidemi Uesugi, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Tese aprovada em: 06/03/2012, por:

Prof. Dr. Carlos Hidemi Uesugi (Orientador)

Prof^a. Dra. Marisa A.S.V. Ferreira (UnB – FIT)

Dra. Abi S.A. Marques (Embrapa – Quarentena Vegetal)

Prof^a. Dra. Denise Vilela de Rezende (UnB – FIT)

Prof. Dr. Jean Kleber de Abreu Mattos (UnB – FAV)

*“...E vós, meu bom anjo, não me abandoneis,
tenho necessidade de toda a vossa proteção
para suportar com fé e amor as provas que
aprouver a Deus me enviar...”*

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, pela misericórdia que tem por mim, por todas as vitórias que me permitiu e permitirá alcançar nessa vida e por mostrar que sou merecedor.

Ao professor, orientador e incentivador *Carlos Hidemi Uesugi*, por dividir comigo seus conhecimentos, pela paciência, parceria, por acreditar nos meus trabalhos, por compartilhar idéias e acima de tudo por me deixar livre para ter iniciativas.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, que fizeram parte da minha formação acadêmica. À prof^a *Marisa Ferreira*, em especial, pela disposição e colaboração nos trabalhos e à prof^a *Denise Vilela* pelo incentivo a pesquisa com eucalipto.

Aos funcionários do Laboratório de Fitopatologia: *Arenildo, Kamila, Cezar, Marivaldo, D^a Francisca, Arlindo & Maria*, pelos momentos de descontração e conversas calorosas que faziam os dias de trabalhos muito mais agradáveis. Aos funcionários da Estação Experimental de Biologia, em especial ao Seu *Fábio* pelo suporte nos experimentos e a D^a *Olinda*, pelas prosas.

Aos alunos de “Pesquisa em Bacteriologia”: *Diego, Daiane, Poliana e Andrea*, que de alguma forma contribuíram para a realização dos trabalhos.

A todos os colegas e amigos de pós-graduação que passaram ao longo do mestrado e doutorado. A *Sarah Barreto* que me acompanhou nessas duas fases e a *Caroline Rabelo*, que mesmo a distância se fez presente. A *Kamila Araújo*, que além de amiga e funcionária, por ventura se tornou colega no curso de pós-graduação. A “dupla dinâmica” *Cecília Rodrigues & Claudênia Ferreira*, que me acompanhou nos almoços e sessões de cinema e pela força dada em momentos de falta de motivação. A *Adriana Magali & Anna Cristina*

por me escutar em momentos de ansiedade e insegurança. A querida amiga e agora professora *Ednalva Andrade* pela força, alegria e motivação mútuos. E a *Caroline Pedroso* pela amizade e companheirismo durante o curso de doutorado e fora dele.

Ao *Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais* – IPEF, por me ceder parte das sementes de *Eucalyptus* utilizadas neste trabalho. E aos fornecedores de mudas *Edmárcio* e *Júlio*.

Aos amigos de infância e de graduação que persistem nas lembranças. Aos companheiros da vida *Suellen Neves, Paulo Marcello, Aline Avito & Luiza Pessoa* que se fizeram presentes e a tantos outros que passaram ou passarão.

Aos familiares que de certa forma compartilham dessa vitória. Em especial a minha querida avó *Dionizia (in memoriam)* & avô *Francisco (in memoriam)*. E a minha prima *Isis* que tantas vezes me deu uma “mãozinha” nos experimentos na Estação Biológica, a caminho de nossas casas.

Por fim, não menos importante, a minha família, sem a qual não estaria escrevendo, agora, essas palavras embargadas por lágrimas. Ao meu pai *Antônio Marques (in memoriam)*, por nossa profissão e ensinamentos, que estão aqui, comigo guardados. A minha mãe *Jacira Leal*, pelo exemplo de disposição, caráter e honestidade. A minha querida irmã *Terla Leal*, que esteve junto a mim, inclusive nas ocasiões maçantes de experimentos, suportando as vezes meu temperamento e mau humor. A minha irmã *Andrea Leal* e aos lindos e queridos sobrinhos que me deu, *Marco Antônio & Ana Beatriz*, e seu esposo *Angelo Henrique* que também esteve a ouvidos, em momentos de insegurança.

Meus sinceros agradecimentos!

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
RESUMO GERAL	xx
GENERAL ABSTRACT	xxii

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cultura do eucalipto	1
Doenças do eucalipto no Brasil	2
<i>Doenças causadas por agentes bióticos ou infecciosos em viveiro</i>	3
<i>Doenças causadas por agentes bióticos no campo</i>	3
<i>Doenças causadas por agentes abióticos ou não infecciosos</i>	4
Murcha bacteriana	4
<i>Sintomatologia</i>	4
<i>Etiologia</i>	5
<i>Epidemiologia</i>	9
<i>Diagnóstico</i>	11
Interações ambientais	11
<i>Influência da umidade do solo na murcha bacteriana</i>	12
<i>Interação com nematóides</i>	12
<i>Impacto da murcha bacteriana na cultura do eucalipto</i>	13
<i>Distribuição geográfica da murcha bacteriana do eucalipto</i>	13
Sobrevivência	14
<i>Fase viável, mas não cultivável - VMNC</i>	15
<i>Conversão fenotípica</i>	17
<i>Ralstonia solanacearum em culturas florestais</i>	17
<i>Gama de hospedeiras da Raça 3 biovar 2</i>	19

Medidas gerais de controle da murcha bacteriana	21
<i>Controle Químico</i>	21
<i>Controle Cultural</i>	22
<i>Indução de resistência</i>	23
<i>Evasão</i>	24
<i>Controle Físico</i>	24
<i>Formas alternativas de controle da murcha</i>	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
OBJETIVOS	43
CAPÍTULO 1 - Caracterização de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> da biovar 2, relatados em cultivo do híbrido “urograndis” de eucalipto	
RESUMO	44
ABSTRACT	45
INTRODUÇÃO	46
MATERIAL E MÉTODOS	47
Origem das amostras vegetais: local de coleta e isolados bacterianos	47
<i>Isolamento - Cultivo e preservação</i>	48
<i>Caracterização bioquímica</i>	48
<i>Reação de hipersensibilidade e teste de patogenicidade</i>	49
Identificação por PCR	49
<i>Extração e quantificação do DNA genômico</i>	49
<i>Identificação com oligonucleotídeos iniciadores para espécie</i>	50
<i>Identificação com oligonucleotídeos iniciadores para Raça 3 biovar 2</i>	51
<i>Identificação do filótipo dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i></i>	51
Teste de hospedeiras	52
RESULTADOS	52

Testes bioquímicos e de patogenicidade	52
Identificação dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> por PCR	57
Teste de hospedeiros	58
DISCUSSÃO	66
CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

CAPÍTULO 2 - Avaliação de bactérias extremófilas facultativas no controle de *Ralstonia solanacearum* R3bv2T de eucalipto

RESUMO	74
ABSTRACT	75
INTRODUÇÃO	76
MATERIAL E MÉTODOS	79
Origem dos isolados bacterianos	79
Testes <i>in vitro</i> - Prospecção da antibiose por difusão em dupla camada	79
Seleção dos isolados	81
<i>Caracterização bioquímica, morfológica e cultural</i>	81
<i>Identificação dos isolados através do sequenciamento do gene do 16S rDNA</i>	81
Teste <i>in vivo</i> – microbiolização de sementes	81
RESULTADOS	83
Isolados obtidos	83
<i>Caracterização bioquímica, morfológica e cultural</i>	84
<i>Testes in vitro</i>	84
<i>Sequenciamento baseado no gene do 16S rDNA</i>	87
<i>Controle in vivo</i>	88
DISCUSSÃO	90
CONCLUSÕES	94

CAPITULO 3 - Estudo da interação de *Ralstonia solanacearum* R3bv2T com diferentes tipos de solo, no desenvolvimento do híbrido “urograndis” (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*)

RESUMO	102
ABSTRACT	103
INTRODUÇÃO	104
MATERIAL E MÉTODOS	106
Obtenção das amostras de solo e análise química	106
<i>Local de realização dos ensaios</i>	107
<i>Delineamento experimental</i>	107
<i>Observação dos sintomas e reisolamento</i>	108
<i>Análise estatística</i>	108
RESULTADOS	108
Análise química dos solos	108
Observação dos sintomas e reisolamento	109
Análise estatística	111
DISCUSSÃO	115
CONCLUSÕES	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

CAPÍTULO 4 - Avaliação da suscetibilidade, *in vitro*, de diferentes espécies de *Eucalyptus* a R3bv2T de *Ralstonia solanacearum*

RESUMO	126
ABSTRACT	127
INTRODUÇÃO	128
MATERIAL E MÉTODOS	130

Origem dos isolados bacterianos	130
Avaliação da suscetibilidade de <i>Eucalyptus</i> spp. através do teste de microbiolização em sementes	130
RESULTADOS	131
DISCUSSÃO	135
CONCLUSÕES	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
CAPÍTULO 5 - Avaliação de bactérias extremófilas facultativas na promoção do crescimento do híbrido “urograndis” (<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i>) a partir de sementes	
RESUMO	141
ABSTRACT	142
INTRODUÇÃO	143
MATERIAL E MÉTODOS	145
Local de realização dos ensaios	145
Origem das estirpes bacterianas	146
Testes de promoção de crescimento via microbiolização de sementes	146
Delineamento experimental e análises estatísticas	146
RESULTADOS	147
DISCUSSÃO	150
CONCLUSÃO	152
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153
CONSIDERAÇÕES FINAIS	157
ANEXO	159

ÍNDICE DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 - Testes bioquímicos diferenciais para as biovars 1 a 5 de <i>Ralstonia solanacearum</i> (Hayward, 1994).	6
TABELA 2 - Distribuição das hospedeiras por raça, biovar e local de ocorrência de isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> , adaptado de Buddenhagen et al. (1962) e Denny & Hayward (2001).	7
TABELA 3 - Fenótipos variantes da biovar 2, segundo Hayward (1994).	7
TABELA 4 - Esquema de classificação hierárquica de <i>Ralstonia solanacearum</i> segundo Fegan & Prior (2005).	9
TABELA 5 - Espécies arbóreas hospedeiras de <i>Ralstonia solanacearum</i> (Modificado de Mafia, 2006).	18

CAPÍTULO 1

TABELA 1 - Caracterização bioquímica e molecular dos isolados de <i>Ralstonia solanacearum</i> utilizados neste estudo.	54
TABELA 2 - Suscetibilidade de diferentes espécies de plantas a Raça 3 biovar 2T de <i>Ralstonia solanacearum</i> oriunda de eucalipto.	55

CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Isolados bacterianos obtidos dos cinco diferentes tipos de solos, nas respectivas condições ambientais extremas.	83
TABELA 2 - Isolados obtidos de condições ambientais extremas, selecionados dos testes <i>in vitro</i> contra <i>Ralstonia solanacearum</i> e sua	

caracterização bioquímica, morfológica e cultural. 86

TABELA 3 - Isolados bacterianos obtidos de solos em condições ambientais extremas e selecionados para testes *in vivo*, de controle de *Ralstonia solanacearum*, através do sequenciamento de parte do gene do16S rDNA. 87

TABELA 4 - Efeito das estirpes bacterianas, oriundas de solo submetido a condições ambientais extremas, no controle de *Ralstonia solanacearum* em plantas do híbrido “urograndis” de eucalipto, obtidas de sementes microbiolizadas e plantadas em solo infestado com a fitobactéria. 90

CAPÍTULO 3:

TABELA 1 - Características química, física e granulométrica dos solos utilizados neste estudo. 110

TABELA 2 - Influência da relação tipo de solo *versus Ralstonia solanacearum*, sobre a altura e massa seca da parte aérea e raízes do híbrido “urograndis”. 113

TABELA 3 - Influência da relação tipo de solo *versus Ralstonia solanacearum* indiretamente sobre a altura e massa seca da parte aérea e raízes do híbrido “urograndis”, comparando-se apenas os tratamentos com a bactéria. 114

TABELA 4 - Influência do tipo de solo sobre a altura e massa seca da parte aérea e raízes do híbrido “urograndis”. 115

CAPÍTULO 4

TABELA 1 - Estirpes de *Ralstonia solanacearum* utilizadas nos testes de

suscetibilidade das diferentes espécies de *Eucalyptus*. 131

TABELA 2 - Espécies e híbridos de *Eucalyptus* utilizados nos testes de suscetibilidade, *in vitro*, a *Ralstonia solanacearum* R3bv2 e R1bv1. 133

CAPÍTULO 5:

TABELA 1 - Efeito das estirpes bacterianas, oriundas de solos submetidos a condições ambientais extremas, na promoção do crescimento de plantas do híbrido “urograndis” obtidos de sementes. 149

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - A. Planta de “urograndis” com sintoma de murcha no campo do qual foram coletadas amostras utilizadas neste trabalho; **B.** fluxo bacteriano observado logo após a coleta das amostras; **C.** colônias virulentas, com bordos brancas e centro avermelhado de *Ralstonia solanacearum*, obtidas a partir dos isolamentos, em meio Kelman com tetrazólio. **D.** reação de hipersensibilidade em folhas de fumo 12 h após a inoculação, com a estirpe UnB 1364. **E.** teste de patogenicidade em planta de batata (cv. Achat) inoculada com a estirpe UnB 1359, mostrando murcha severa; **F.** fluxo bacteriano em batata. **G.** planta de “urograndis” nove meses após início do teste de patogenicidade (via solo) exibindo desfolha e arroxamento das folhas; **H.** sintoma de mancha em “V” invertido e **I.** corte longitudinal do ramo de eucalipto, mostrando escurecimento do lenho.

56

FIGURA 2 - Amplificação de fragmentos de aproximadamente 553 pb gerados pelos oligos **PS-1/PS-2** referentes ao gene da região 16S do rRNA, a partir do DNA purificado dos isolados de *Ralstonia solanacearum*: **M.** Marcador de 100 pb (Promega®); **1.** Controle negativo (água estéril); **2.** UnB 575 (R1bv1, eucalipto); **3.** UnB 1018 (R3bv2, batata); **4.** UnB 1173 (R1bv1, tomate). Estirpes deste estudo da **R3bv2T**: **5.** UnB 1359, **6.** UnB 1360, **7.** UnB 1361, **8.** UnB 1362, **9.** UnB 1363, **10.** UnB 1364 e **11.** UnB 1365.

57

FIGURA 3 - Perfis da amplificação da PCR multiplex mostrando fragmentos de aproximadamente 372 pb gerados pelos oligos específicos para filótipo a partir do DNA purificado dos isolados de *Ralstonia solanacearum*: **M.** Marcador de 100 pb (Promega®); **1.** Controle negativo (água estéril); **2.** UnB 575 (R1bv1, eucalipto); **3.** UnB 1018 (R3bv2, batata); **4.** UnB 1173 (R1bv1, tomate). Estirpes deste estudo da **R3bv2T** de: **5.** UnB 1359, **6.** UnB 1360, **7.** UnB 1361, **8.** UnB 1362, **9.** UnB 1363,

10. UnB 1364 e 11. UnB 1365.

58

FIGURA 4 - Patogenicidade de *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, isolada de eucalipto, em tomate (A-C), berinjela (D e E) e datura (F-H). **A.** inoculação com a estirpe UnB 1360, induzindo murcha e superbrotamento, **B.** fluxo bacteriano e **C.** formação de raiz adventícia; **D.** plantas de berinjela mostrando murcha e **E.** fluxo; **F.** murcha em planta inoculada com isolado UnB 1359, **G.** necrose nas bordas e limbo foliar e **H.** necrose apical.

59

FIGURA 5 - Patogenicidade de *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, isolada de eucalipto, em gerânio (A-D) e feijão (E-F). **A.** sintomas de necrose, amarelecimento e murcha incitados pela estirpes UnB 1359, **B.** fluxo bacteriano, **C.** corte longitudinal do caule mostrando escurecimento de vasos e tecidos; **D.** clorose internerval nas folhas, **E.** sintoma de amarelecimento e **F.** crescimento bacteriano recuperado de plantas inoculadas.

60

FIGURA 6 - Patogenicidade de *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, isolada de eucalipto, em girassol (A-C) e beterraba (D e E). **A.** plantas de girassol exibindo redução no crescimento (planta inoculada a esquerda) e planta controle (a direita) e superbrotamento de ramos laterais; **B.** murcha e **C.** lesões encharcadas nas folhas e amarelecimento. **D.** planta controle (à esquerda) e planta inoculada exibindo murcha avançada e arroxamento das folhas e **E.** murcha severa em beterraba.

61

FIGURA 7 - Patogenicidade de *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, isolada de eucalipto, em nabo (A-C) e mostarda lisa (D-F). **A.** murcha avançada em planta inoculada de nabo (direita) e controle (esquerda); **B.** corte longitudinal em raiz de nabo mostrando escurecimento dos tecidos; **C.** bactéria reisolada em meio 523. **D.** planta controle de mostarda a esquerda e inoculada com isolado UnB 1359 a direita, exibindo diminuição do crescimento e murcha; **E.** detalhe da folha de planta inoculada com lesões nos bordos e limbo foliar e **F.** corte longitudinal do caule com escurecimento dos vasos e tecidos.

62

FIGURA 8 - Patogenicidade de *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, isolada de eucalipto, em cravo-de-defunto (A e B) e capuchinha (C-F). **A.** planta controle à esquerda e planta inoculada a direita exibindo redução no crescimento e desfolha e **B.** detalhe da necrose em ramo. **C.** planta controle de capuchinha; **D.** folha de planta inoculada exibindo amarelecimento; **E.** lesões no limbo foliar e **F.** murcha avançada. 63

FIGURA 9 - Patogenicidade de *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, isolada de eucalipto, em moringa (A-C) e cajueiro (D e E). **A.** planta controle a direita e planta inoculada com a estirpe UnB 1359 à esquerda, mostrando diminuição do crescimento, **B.** e **C.** detalhes do amarelecimento e murcha dos ponteiros; **D.** cajueiro com superbrotamento das folhas próximas ao local de inoculação e **E.** supercrescimento de ramo. 64

FIGURA 10 - Patogenicidade de *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, isolada de eucalipto, em goiaba (A-C) e beldroega (D-F). **A.** muda de goiaba inoculada com a estirpe UnB 1361, exibindo murcha, **B.** morte dos ponteiros onde foi inoculada bactéria por picada de agulha, **C.** mancha em “V” invertido em folha; **D.** planta controle a esquerda e planta inoculada com a estirpe UnB 1359 a direita, exibindo redução no crescimento, **E.** encarquilhamento das folhas e **F.** planta morta, com necrose generalizada. 65

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Etapas do teste *in vitro*, de antibiose por difusão em dupla camada, para seleção de microrganismos extremófilos facultativos antagonistas a *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, segundo Romeiro (2007, com modificações). 80

FIGURA 2 - Caracterização morfológica, cultural (A-D) e teste *in vitro* (E e F) de bactérias extremófilas facultativas isoladas de diferentes solos.

A. colônias mucóides de coloração creme brilhante do isolado pH 7 ORGA (2) e **B.** células Gram positivas pequenas, em forma de bacilos, do isolado 15% GLEI (2) isolado 15% GLEI (2); **C.** colônias de aspecto seco, brancas e opacas do isolado 15% GLEI (2) e **D.** bastonetes Gram negativos, do isolado 15% GLEI (2). Teste *in vitro*, através da antibiose por difusão em dupla camada contra *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T** de eucalipto, halos de inibição formados por **E.** isolado 15% GLEI (2) e **F.** a direita isolado pH 7 CAMB e à esquerda pH 5 ORGA.

85

FIGURA 3 - Sintomas, incitados por *Ralstonia solanacearum*, em plantas de “urograndis” obtidas a partir de sementes, nos testes de controle *in vivo*. **A.** arroxamento foliar e de nervuras em tratamento com a estirpe UnB 1370; **B.** sintomas de “V” invertido em folha de planta do tratamento com UnB 1373; **C.** lesão partindo da nervura central em tratamento com UnB 1368; **D.** lesão na margem da folha, **E.** lesões de cor parda dispersas no limbo foliar em tratamento com UnB 1373; murcha de plântulas; **F.** em tratamento com UnB 1366; **G.** em tratamento com UnB 1371 e **H.** murcha em tratamento com UnB 1372. **I.** planta com arroxamento generalizado na testemunha, tratada apenas com *R. solanacearum* e **J.** plântula com necrose nas extremidades das folhas e no limbo foliar, também no tratamento com UnB 1371.

89

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 - Sintomas incitados pela estirpe UnB 1359 da **R3bv2T** de *Ralstonia solanacearum* em plantas oriundas de miniestacas do híbrido “urograndis” de eucalipto (A, B) e em plântulas de tomate (C-E). **A.** arroxamento esparso e lesões marginais no limbo foliar e **B.** arroxamento da nervura de folhas. Sintomas de murcha e amarelecimento em plântulas de tomate, plantadas nos vasos junto aos eucaliptos: **C.** lesões encharcadas nos bordos das folhas em tratamento do

organossolo; **D.** murcha e amarelecimento em plântula do tratamento do Latossolo Vermelho e **E.** bactéria reisolada das plântulas de tomate em altas concentrações, a esquerda do tratamento do Latossolo Vermelho e a direita do organossolo. 112

CAPÍTULO 4

FIGURA 1 - Forma de avaliação da suscetibilidade de *Eucalyptus* spp. a estirpes de *Ralstonia solanacearum*, exibindo testemunha com plântulas saudias, plântulas afetadas e sementes mortas da espécie *E. pellita*. 132

FIGURA 2 - Suscetibilidade de diferentes espécies de *Eucalyptus* a estirpes de *Ralstonia solanacearum* UnB 575 (R1bv1) e UnB 1359 (R3bv2). **A.** *E. deanei*; **B** e **C.** *E. cloeziana*; **D.** *E. acmenoides*; **E.** *E. resinifera*; **F.** *E. phaetricha*; **G.** *E. pilularis* e **H.** *E. propinqua*. 134

CAPÍTULO 5

Figura 1 - Parte do teste de promoção de crescimento a partir de sementes do híbrido “urograndis” com as estirpes bacterianas obtidas de solos submetidos a condições ambientais extremas, seis dias após a semeadura. **A.** testemunha, sementes microbiolizadas em água esterelizada; **B.** plântulas de sementes sementes microbiolizadas com a estirpe UnB 1366; **C.** plântulas de sementes microbiolizadas com a estirpe UnB 1368 e **D.** sementes microbiolizadas com a estirpe UnB 1367. 148

RESUMO GERAL

A murcha bacteriana do eucalipto é causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, biovars 1 e 3. Entretanto, em 2009, foi descrita a biovar 2 em cultivo de campo do híbrido “urograndis” de eucalipto no município de Alexânia – GO, Brasil. O controle dessa bacteriose é dificultado devido a natureza sistêmica da infecção e pela eficiente sobrevivência do patógeno. Além disso, pouco se conhece a cerca da ecologia, evolução, resistência genética e de fontes de controle da doença. Dessa forma, torna-se necessário um maior conhecimento do patógeno e a busca por formas de controle, tais como: o controle biológico e o emprego de fontes de resistência genética. Este trabalho teve como objetivos: 1) caracterizar isolados de *R. solanacearum* de eucalipto com o uso de testes bioquímicos, além da avaliação de diferentes plantas hospedeiras e identificação por PCR com oligonucleotídeos iniciadores para espécie, biovar e filótipo; 2) realizar a prospecção de bactérias isoladas em condições extremas de temperatura, pH e salinidade, de cinco diferentes tipos de solo com potencial no controle *in vitro* e *in vivo* de *R. R3bv2T solanacearum* da, 3) avaliar a interação entre *R. solanacearum* da **R3bv2T** e cinco diferentes tipos de solo, no desenvolvimento de miniestacas do híbrido “urograndis”; 4) avaliar a suscetibilidade, *in vitro* através do teste de microbiolização de sementes, de dezessete espécies de *Eucalyptus* a duas estirpes de *R. solanacearum* (**R3bv2T** e **R1bv1**) e 5) avaliar bactérias extremófilas facultativas com potencial na promoção do crescimento do eucalipto. De acordo com os testes, os isolados são pertencentes à biovar 2T, filótipo II de *R. solanacearum* e foram capazes de induzir sintomas da doença e de serem recuperados de: eucalipto, batata, berinjela, tomate, datura, nabo, gerânio, girassol, beterraba, capuchinha, feijão, mostarda, cravo-de-defunto, moringa e caju. A partir dos solos coletados foram obtidos 61 isolados bacterianos nas diferentes condições extremas, sendo que 30 tiveram ação *in vitro*, contra a fitobactéria. As 10 estirpes selecionadas foram identificadas, com base no sequenciamento de parte do gene do 16S rDNA, como *Bacillus* sp. e *Enterobacter* sp. e dentre elas, a UnB 1370 (*Enterobacter* sp.) se destacou ao mostrar uma maior atividade contra a bactéria no solo, permitindo maior desenvolvimentos das plantas. No estudo da interação de *R. solanacearum* versus tipos de solos, de maneira geral, a presença da

bactéria no solo prejudicou o desenvolvimento das plantas, com exceção do peso seco da raiz no cambissolo onde o tratamento com a bactéria mostrou média maior que a testemunha e diferença estatisticamente significativa. O organossolo se destacou no peso seco da parte aérea e raízes, diferindo-se estatisticamente dos demais tratamentos, ao garantir melhores condições para as plantas resistirem ao ataque da bactéria. Os latossolos, mais utilizados para plantio de eucalipto no Brasil, foram considerados, neste estudo, conduçivos ao patógeno. Nas espécies de *Eucalyptus* analisadas, a suscetibilidade variou e foi maior devido a estirpe UnB 1359 (biovar 2T), quando comparada a UnB 575 (biovar 1), ambas de eucalipto. A primeira estirpe levou a morte de mais 50% das sementes em 13 das 17 espécies analisadas, enquanto a segunda estirpe somente em 8 espécies. O híbrido “urograndis” e as espécies *E. deanei*, *E. pilularis* e *E. robusta* foram consideradas tolerantes a ambas as estirpes. Ao contrário *E. cloeziana*, *E. paniculata*, *E. exserta*, *E. acmenoides*, *E. botryoides*, *E. pellita*, *E. propinqua* e *E. resinifera* exibiram baixa tolerância. Nos testes de promoção do crescimento, a avaliação do peso seco da parte aérea revelou que todas as estirpes bacterianas levaram a ganhos quando comparados à testemunha, variando entre 11,3 e 78,0%. Entretanto, as estirpes UnB 1366, UnB 1371, UnB 1375, UnB 1370 e UnB 1373, foram as que se diferiram significativamente da testemunha. Em contrapartida, a estirpe UnB 1368 (*Bacillus* sp.) se destacou individualmente no incremento (130,0%) da biomassa massa radicular. Pôde-se observar também, aparentemente, que algumas estirpes induziram uma germinação precoce das sementes, em destaque a UnB 1366 (*Bacillus* sp.).

Palavras-chave: murcha bacteriana, filótipo II, microbiolização de sementes, bactérias extremófilas facultativas, biocontrole, promoção de crescimento, conduçividade, resistência genética.

GENERAL ABSTRACT

Bacterial wilt of eucalyptus is caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, biovars 1 and 3. However, in 2009, biovar 2 was described in a cultivated field of the hybrid “urograndis” of eucalyptus in the municipality of Alexânia – Goiás state, Brazil. It is difficult to control this bacterial disease because of the infection’s systemic nature and the pathogen’s ability to survive. Moreover, little is known about the ecology, evolution, genetic resistance and sources of control of this disease. To this end, it is necessary to carry out a more thorough knowledge of the pathogen and to search for ways to control it, such as the use of biological control and use of sources of genetic resistance. This work had the following objectives: 1) to characterize isolates of *R. solanacearum* from eucalyptus with the use of biochemical tests, and to carry out evaluation of various host plants and identification by PCR primers for species, biovar and phylotype; 2) to prospect for bacteria isolated in extreme temperature, pH and salinity conditions, from five different types of soil with potential for use for *in vitro* and *in vivo* control of *R. solanacearum*; 3) to evaluate the interaction between *R. solanacearum* and five different types of soil, in the development of mini-cuttings of the hybrid “urograndis”; and 4) to evaluate the susceptibility, *in vitro*, of 17 species of *Eucalyptus*, by means of the seed microbiolization test to two strains of *R. solanacearum* and 5) evaluate a potential of extremophile bacteria in promoting eucalyptus growth. According to the tests, the isolates belong to biovar 2T, phylotype II of *R. solanacearum*, and were capable of inducing symptoms of the disease and being recovered from, the following plants: eucalyptus, potato, eggplant, tomato, datura, turnip, geranium, sunflower, beetroot, nasturtium, bean, mustard, tagetes minuta, moringa and cashew. From the collected soils 61 bacterial isolates were obtained under different extreme conditions, and among them 30 showed *in vitro* action against the plant bacterium. The 10 selected strains were identified, based on sequencing some of the 16S rDNA genes, as *Bacillus* sp. and *Enterobacter* sp. Among these, UnB 1370 (*Enterobacter* sp.) stood out by showing a higher activity against the bacteria in the soil, allowing for greater plants development. The organosol stood out in terms of dry weight of the aerial part and roots, differing statistically from the other treatments, in that it provided better conditions for the plants to resist bacterial attack. The latosols, most

used for planting eucalyptus in Brazil, were considered in this study to be conducive to the pathogen. In the species of *Eucalyptus* analyzed, susceptibility varied and was greatest due to the UnB 1359 strain (biovar 2T), when compared to the UnB 575 (biovar 1), both from eucalyptus. The former presented more than 50% of dead seeds in 13 of the 17 species analyzed, while the latter did so in only 8 species. The hybrid “urograndis” and the species *E. deanei*, *E. pilularis* and *E. robusta* were considered tolerant to both strains, while *E. cloeziana*, *E. paniculata*, *E. exserta*, *E. acmenoides*, *E. botryoides*, *E. pellita*, *E. propinqua* and *E. resinifera* exhibited low tolerance. In tests for growth promotion, the evaluation of the dry weight of the aerial part revealed that all the bacterial strains led to gains compared to the control, varying from 11.3 to 78.0%. However, strains UnB 1366, UnB 1371, UnB 1375, UnB 1370 and UnB 1373 were the ones that differed significantly compared to the control. In contrast, the UnB 1368 strain (*Bacillus* sp.) stood out in the increase (130,0%) it showed in root biomass. It could also be observed that some strains apparently induced early seed germination, especially UnB 1366 (*Bacillus* sp.). In the study on interaction of *R. solanacearum* with types of soil, the presence of the bacterium in the soil generally hampered plant development, apart from the root dry weight in cambisol, where the treatment with the bacterium showed a higher mean weight than the control and a statistically significant difference.

Key words: bacterial wilt, phylotype II, seed microbiolization, facultative extremophile bacteria, biocontrol, growth promotion, conductivity, genetic resistance.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cultura do eucalipto

As florestas naturais no mundo somam cerca de 4 bilhões de hectares, cobrindo aproximadamente 30% da superfície terrestre do globo (SBS, 2008). Cinco países concentram mais da metade da área florestal total: Rússia, Brasil, Canadá, Estados Unidos e China. No Brasil, que é o segundo maior, a área florestal total absoluta é de aproximadamente 851,4 milhões de hectares. Deste total, apenas 0,7% é de florestas plantadas, e destas 81,6% é com eucalipto (BRACELPA, 2009). O crescimento da área de florestas plantadas no país foi de 27,11% entre os anos de 2004 a 2009 (ABRAF, 2011).

O gênero *Eucalyptus* pertence à família *Myrtaceace* e é composta por aproximadamente 600 espécies, predominantemente, em regiões tropicais e subtropicais. É a árvore mais plantada no mundo, ocorrendo naturalmente na Austrália, Indonésia e ilhas próximas, mas foi introduzido em diferentes regiões do globo (Santos et al., 2001). No Brasil a introdução da planta ocorreu em 1868 no Rio Grande do Sul, entretanto seu plantio em escala comercial, data de 1904 no Estado de São Paulo (Dossa, 2003).

A distribuição percentual das florestas plantadas com eucalipto no Brasil, por estado no ano de 2009 foi: Minas Gerais (29%), São Paulo (23%), Bahia (14%), Mato Grosso do Sul (6,5%), Rio Grande do Sul (6%), Espírito Santo (5%) e outros 17%. A produção se concentrou nos últimos 40 anos nas regiões Sul e Sudeste do país (ABRAF, 2009).

Os plantios florestais, via de regra, são impulsionados por empresas consumidoras da madeira (ABRAF, 2008), tendo a eucaliptocultura um importante papel na economia do país. Em 2008, o Brasil subiu do sexto para o quarto lugar entre os produtores mundiais de celulose. A produtividade florestal em 2009 do Brasil foi de 44,2 m³ de eucalipto com casca/ha, gerando aproximadamente 46.850 empregos diretos (BRACELPA, 2009).

A produção de espécies de eucalipto no Brasil ocupa a maior parte dos plantios

florestais de rápido crescimento. A sua expansão tem sido capaz de suprir a demanda por matéria-prima para celulose, carvão vegetal, óleos essenciais, madeira para serraria, postes de eletricidade, moirões de cercas, ornamentação, quebra-vento e indústria farmacêutica. É também utilizado em programas de reflorestamento (Rocha & Santos, 2007), indiretamente em produtos apícolas, em programas de remoção de CO₂ da atmosfera (BRACELPA, 2007), entre outros multiprodutos.

Existem mais de 21 espécies comerciais de eucalipto, sendo possível encontrar uma espécie que atenda às necessidades do produtor e que seja indicada para determinada região (Crestana & Moreira, 2009). As principais espécies cultivadas no Brasil são o *E. grandis* (W. Hill ex Maiden), *Corimbia citriodora* (L.), *E. camaldulensis* (Dehnh.), *E. saligna* (Smith), *E. urophylla* (S.T. Blake). Além disso, existem cruzamentos entre as espécies, derivando as espécies híbridas como é o caso do *E. urophylla* x *E. grandis* “urograndis” (Agenda Silvicultura, 2009), muito utilizado para serraria, postes, moirões, aglomerados e chapas de fibra. Esse híbrido cresce bem em solos arenosos, pobres e sujeitos à seca (Higa et al., 2000).

As plantações para produção de lenha, carvão vegetal, moirões e madeira para a indústria de celulose são normalmente cortadas entre 6 e 8 anos de idade. No caso dos plantios para produção de madeira serrada, a colheita é feita após 12 ou 13 anos de idade (Higa et al., 2000). Segundo Silva et al. (2004), o custo médio para a implantação de 1 hectare de eucalipto em uma região de cerrado é de R\$ 703,02.

Doenças do Eucalipto no Brasil

Até algumas décadas atrás, os relatos de doenças bacterianas em essências florestais eram poucos, principalmente no Brasil (Ferreira, 1989). Entretanto, após a introdução do eucalipto no Brasil para fins comerciais e com sua expansão para regiões mais quentes e úmidas, além do plantio de procedências suscetíveis, ciclos sucessivos e com o estreitamento da base genética, várias doenças têm surgido tanto em viveiro quanto em plantio definitivo no campo (Alfenas & Mafia, 2003). As doenças ocorrem em todas as fases, desde a multiplicação por estaquia, enraizamento, aclimação até a fase de colheita (Alfenas et al., 2009).

Doenças causadas por agentes bióticos ou infecciosos em viveiro

Em viveiro, inúmeras são as doenças causadas por diferentes patógenos, sendo que a incidência varia de acordo com o estágio de desenvolvimento das mudas, hospedeiro e patógeno (Alfenas et al., 2009). Dentre elas pode-se citar: Tombamento de mudas causado por várias espécies de *Cylindrocladium*, além de *Pythium* e *Fusarium*; mela de *Rhizoctonia solani* (Kuhn.); mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* (Pers.); anelamento da haste e mancha foliar de *Quambalaria eucalypti* [(Wingfield, Crous & Swart) Simpson] (Alfenas et al., 2009; Krugner & Auer, 2005; Santos et al., 2001); manchas foliares bacterianas causadas, segundo Gonçalves (2003), por: *Xanthomonas axonopodis* (Hasse, 1915), *Xanthomonas campestris* (Pammel 1895; Dowson 1939), *Pseudomonas syringae* (Van Hall, 1904), *Pseudomonas putida* (Trevisan, 1889) e *Pseudomonas cichorii* (Swingle, 1925; Stapp, 1928). Oídio causado por *Oidium eucalypti* (Rostr.); antracnose de *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.), murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, entre outras (Alfenas et al., 2009; Krugner & Auer, 2005; Santos et al., 2001).

Doenças causadas por agentes bióticos em campo

As doenças que ocorrem no campo, diferentes daquelas que também ocorrem em viveiros, são: ferrugem causada por *Puccinia psidii* (Winter); mancha de *Kirramyces epicoccoides* [(Cooke & Masee) J. Walker]; de *Pilidiella eucalyptorum* (Crous & M.J. Wingf.); de *Aulographina eucalypti* [(Cooke & Masee) Arx & E. Müll.); mancha causada por várias espécies de *Teratosphaeria* e *Mycosphaerella*; mancha de *Cryptosporiopsis eucalypti* (Sankaran & B. Sutton); mancha causada por várias espécies de *Harknessia*; murcha de *Ceratocystis fimbriata* (Ell. & Halst.); cancro causado por *Chrysosporthe cubensis* [(Bruner) Gryzenhout & M.J. Wingfield]; rubelose de *Erythricium salmonicolor* [(Berk. & Broome) Burdsall.]; podridão de *Inocutis jamaicensis* [(Murr.) Gottlieb, Wright & Moncalvo]; cancro de *Coniothyrium zuluense* (Wingf., Crous & Cout.); cancro de *Cytospora eucalypticola* (Van der Westh.); cancro de *Botryosphaeria ribis* (Grossenb. & Dugg.); estromas negros de *Hypoxylon* spp., etc. (Alfenas et al., 2009; Krugner & Auer, 2005; Santos et al., 2001).

Doenças causadas por agentes abióticos ou não infecciosos

Dentre as doenças abióticas pode-se citar: distúrbios radiculares, resultantes do desequilíbrio raiz - parte aérea; déficit hídrico; excesso de umidade no ar e solo; estiolamento pela falta de luz; gomose e pau-preto incitados injúrias, que provocam o extravasamento da goma; seca dos ponteiros do eucalipto do Vale do Rio Doce, causado por vários fatores; afogamento do coleto; assamento ou escaldadura de coleto ocasionada por altas temperaturas na superfície do solo ou substrato; canela-preta; queima por geada; injúria por granizo; queima por fogo e quebra de árvores pelo vento (Alfenas et al., 2009; Krugner & Auer, 2005; Santos et al., 2001).

Murcha bacteriana

Sintomatologia

Segundo Buddenhagen & Kelman (1964), a relação entre sintomas e mecanismos de patogênese na murcha é: **1)** sintomas externos: **a)** murcha associada à formação de polissacarídeos extracelulares; **b)** amarelecimento pela quebra de clorofila resultante do decréscimo do suprimento de nutrientes e água, além da produção de metabólitos pela hospedeira e/ou patógeno; **c)** necrose marginal das folhas pelo decréscimo do suprimento de água e fatores desconhecidos; **d)** epinastia pelo aumento dos níveis de AIA (ácido indolacético) e etileno, formados tanto pelo hospedeiro quanto pelo patógeno; **e)** raízes adventícias também pelo aumento de AIA e **f)** redução do crescimento por todos os motivos anteriores; **2)** Sintomas internos: **a)** descoloração vascular devido a enzimas como tirosinases e polifenoloxidasas do hospedeiro; **b)** tiloses, colapso de vasos, proliferação do parênquima devido a aumento dos níveis de AIA; **c)** dissolução de substâncias pécnicas na lamela média devido à pectimetilesterases e poligaracturonases e **d)** degradação da celulose nos vasos pelas celulasas.

O sintoma típico da bacteriose é a murcha de cima para baixo. Sob certas condições favoráveis à doença (cultivar suscetível, ambiente quente e úmido) as bactérias se multiplicam em altas populações, produzindo exsudatos viscosos. Dessa forma, as folhas murcham começando pelas mais novas, principalmente nas horas mais quentes do dia. Com o passar do tempo a murcha se torna irreversível e a planta morre.

As enzimas produzidas pela bactéria levam ao escurecimento dos vasos, o que pode ser percebido pelo corte longitudinal do caule, na parte inferior das plantas afetadas. A formação de raízes adventícias também pode ser observada no coleto, sendo uma reação da planta a falta de água suficiente para mantê-la túrgida (Lopes, 2009).

Em eucalipto no campo a doença se pronuncia no estágio fenológico A e início do B (Ferreira, 2002). Inicialmente o murchamento das plantas é acompanhado ou não de clorose e avermelhamento (bronzamento), com queda parcial das folhas mais baixas (desfolha basal) sob a copa. Algumas plantas podem exibir necroses foliares em “V” invertido. Também pode haver necrose foliar, geralmente a partir do quarto mês após o transplante. Quando as mudas já estão contaminadas observa-se escurecimento do lenho a partir da região central, contrariamente ao que ocorre quando a infecção ocorre após o plantio, onde o escurecimento se dá no sentido da casca para o interior do lenho (Alfenas et al., 2009).

Segundo Alfenas & Mafia (2003), a diferença dos sintomas foliares entre lesões fúngicas e bacterianas em *Eucalyptus* spp. é que lesões bacterianas são angulares e inicialmente exibem uma coloração esverdeada escura e encharcada. Essa diferenciação é importante para fornecer subsídios à correta diagnose.

Em minijardim clonal, a doença caracteriza-se por necrose foliar, escurecimento anelar ou completo do lenho, murcha e morte de minicepas. Na fase de enraizamento, as miniestacas de eucalipto infectadas podem apresentar arroxamento das nervuras do limbo foliar e podridão (Alfenas et al., 2006).

Etiologia

A murcha bacteriana tem como agente causal a bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896); (Yabuuchi et al., 1995), a qual foi descrita anteriormente com diferentes nomenclaturas, tais como: *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia*. Trata-se de uma bactéria gram-negativa, aeróbica, bastonetiforme, móvel por flagelos polares (Garrity et al., 2005), não fluorescente (EPPO, 2004). É catalase e oxidase positiva (Garrity et al., 2005). As células tem entre 0,5-0,7 x 1,5-2,5 µm de dimensão. Suas colônias são lisas, fluidas, irregularmente arredondadas e opacas. Em meio Kelman (contendo tetrazólio) as colônias virulentas apresentam centro avermelhado e bordas brancas, enquanto as avirulentas são totalmente vermelhas (Kelman, 1954).

A espécie está situada no Domínio Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Betaproteobacteria, Ordem Burkholderiales e Família Burkholderiaceae (Garrity et al., 2005). Segundo Hayward (1991), na antiga classificação fazia parte do grupo II de homologia de rRNA junto com outros fitopatógenos, tais como: *P. andropogonis* (Smith), *P. caryophylli* (Burkh.), *P. cepacea* (Burkh.) etc. e patógeno humanos tais como: *P. mallei* (Zopf), *P. pseudomallei* (Whitmore, 1913; Yabuuchi et al., 1993) e *P. pickettii* (Ralston et al., 1973; Yabuuchi et al., 1993).

Tal espécie é classificada, principalmente, em biovars com testes bioquímicos, que se baseiam na formação de ácido a partir de certos açúcares e álcoois. Hayward (1964) utilizou essas características para separar isolados de várias partes do mundo, inclusive os de batata do Brasil (**Tabela 1**). E em raças, ou seja, na sua capacidade de infectar diferentes hospedeiros (Buddenhagen et al., 1962) (**Tabela 2**).

TABELA 1 - Testes bioquímicos diferenciais para as biovars 1 a 5 de *Ralstonia solanacearum* (Hayward, 1994).

Utilização de:	<i>Ralstonia solanacearum</i>				
	Biovar 1	Biovar 2	Biovar 3	Biovar 4	Biovar 5
Maltose	-	+	+	-	+
Lactose	-	+	+	-	+
Celobiose	-	+	+	-	+
Manitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-

Apesar de ser útil, a classificação em raças e biovars não é consistente já que se baseia em caracteres fenotípicos (Silveira et al., 2005) e não são grupos filogeneticamente coerentes, com exceção da biovar 2, que corresponde à Raça 3 (**R3bv2**) (Fegan & Prior, 2005). Além disso, esse grupo informal à nível infra subespecífico não é governado pelo Código de Nomenclatura de Bactérias (Lapage et al, 1992).

A instabilidade dessa classificação foi demonstrada quando se adicionou os

carboidratos trealose e inositol (**Tabela 3**) revelando a existência de novos fenótipos da biovar 2: 2-A (Andino), que engloba a Raça 3 e os isolados especializados em batata, encontrados no Chile e Colômbia e a biovar 2-T (Tropical) correspondendo aos isolados de terras mais baixas encontrados no Peru e Brasil (Hayward, 1994).

TABELA 2 - Distribuição das hospedeiras por Raça, biovar e local de ocorrência de isolados de *Ralstonia solanacearum*, adaptado de Buddenhagen et al. (1962) e Denny & Hayward (2001).

Raça	Hospedeira	Biovar	Ocorrência
1	Muitas espécies, mais de 50 famílias	1, 3 e 4	Ásia, Austrália, Américas
2	Banana e outras espécies de musa e helicônias	1, 3 e 4	Brasil, Caribe, Filipinas
3	Batata e gerânio	2	Geral, exceto Canadá e EUA
4	Gengibre	3 e 4	Ásia
5	Amora	5	China

TABELA 3 - Fenótipos variantes da biovar 2, segundo Hayward (1994).

Origem geográfica e fenótipo	Biovar 2A	Biovar 2A	Biovar 2T
	Todos os continentes	Chile, Colômbia	Brasil, Peru
Substrato			
Inositol	-	+	+
Trealose	+	-	+

Estudos baseados na homologia DNA-DNA revelaram que *R. solanacearum* não é uma espécie única e, devido a sua heterogeneidade (Palleroni & Douderoff, 1971), foi classificada como um complexo específico. Essa classificação foi adotada inicialmente por Gillings & Fahy (1994) para refletir a variação genotípica e fenotípica dentro da espécie. O complexo é definido como um grupo de isolados proximamente aparentados cujos membros individualmente podem ser mais de uma espécie.

Vários trabalhos confirmam certa dicotomia dentro da espécie *R. solanacearum*. Análises de PCR-RFLP mostraram que isolados africanos da biovar 1 não se agruparam com outros isolados da mesma biovar (Poussier et al., 1999). Estudos posteriores, também baseados em PCR-RFLP da região do gene *hrp* e AFLP, confirmaram a separação de *R. solanacearum* em 2 grupos maiores. A primeira divisão foi chamada de “americana”, incluindo as biovars 1 e 2 e a segunda denominada “asiática” contendo as biovars 3, 4 e 5. Posteriormente, novas análises filogenéticas dos genes da endoglucanase e *hrpB* identificou grupos de isolados originários da África (Poussier et al., 2000).

Diante desses estudos, um novo esquema de classificação baseado em quatro níveis taxonômicos (**Tabela 4**) foi proposto. Os filótipos que designam grupos maiores no nível de subespécie são identificados por PCR multiplex baseado na região ITS (*Intergenic Transcribed Sequence*) do cromossomo, entre os genes de RNA ribossomal 16S e 23S. Os níveis infra subespecíficos são chamados de sequevar e são identificados pela análise de seqüência de genes da endoglucanase, que ocorre em única cópia no genoma e sofre grande pressão seletiva. Essa classificação tem uma maior relevância filogenética, pois é mais estável com o tempo. Cada filótipo é composto por um número de sequevars. Uma sequevar (*Sequence variant*) é definida como um grupo de isolados com seqüência altamente conservada de dentro da região gênica estudada. E por fim os clones, que são identificados através de *fingerprints* genômicos tais como PFGE, AFLP's ou rep-PCR (Fegan & Prior, 2005).

A abordagem da classificação em filótipos mostra certa tendência de divisão em regiões geográficas. O filótipo I seria originário da Ásia, II das Américas e III da África, que parece ser o centro da diversidade. O filótipo I inclui todos isolados pertencentes às biovars 3, 4 e 5. O filótipo II incluiria as biovars 1, 2 e 2T, contem também isolados da Raça 3 de batata e Raça 2 de banana. O filótipo III inclui biovars 1 e 2T. Por fim o filótipo IV engloba isolados da Indonésia biovars 1, 2 e 2T e também encontrado na Austrália e Japão (Fegan & Prior, 2005).

Estudos posteriores realizados por Castillo & Greenberg (2007) concordaram com os estudos de Fegan & Prior (2005) ao revelar que *R. solanacearum* é um microrganismo diversificado, com 4 grupos maiores fortemente separados evolutivamente (filótipos I a IV) e uma subdivisão do filótipo II em 2 subgrupos. O IIa formado exclusivamente pela **R3bv2** e o IIb que inclui isolados da Raça 1 da costa Atlântica da América Central e do Sul e alguns isolados da África. Esta subdivisão reflete o isolamento geográfico, onde a distância espacial desempenhou importante papel, resultado de diferentes forças de seleção.

TABELA 4 - Esquema de classificação hierárquica de *Ralstonia solanacearum* segundo Fegan & Prior (2005).

Nível taxonômico	Equivalente Taxonômico	Nomenclatura	Modo de identificação
Espécie	Espécie	Complexo <i>Ralstonia solanacearum</i>	PCR (<i>Primers</i>)
Filótipo	Subespécie	Filótipos I, II, III e IV	PCR multiplex baseado na região ITS
Sequevar	Grupo Infra subespecífico	Sequevares 1-23	Seqüenciamento do gene da endoglucanase
Clone	Linhagens clonais	-	Métodos de <i>Fingerprinting</i> genômicos (rep-PCR, RAPD, AFLP)

Epidemiologia

A murcha bacteriana, causada por estirpes tipicamente tropicais, é favorecida por alta temperatura e umidade do solo, dessa forma ocorre com maior intensidade durante o verão chuvoso. Ocorre em terrenos recém-cultivados, desmatados ou após vários anos de rotação de culturas consideradas não hospedeiras. Os focos podem ocorrer em locais

de crescimento de plantas daninhas que funcionam como mantenedoras da bactéria no solo. A partir daí a bactéria se espalha por meio da água, aderida a maquinário e implementos agrícolas ou até mesmo aderido a calçados (Lopes, 2009).

Dispersão por insetos, tais como abelhas, vespas, mosca das frutas, tem sido relatada na murcha em banana. Este é provavelmente o único caso de disseminação por insetos em murchas causadas por *R. solanacearum* e não está inteiramente esclarecido (Bunndenhagen & Kelman, 1964).

A penetração do patógeno se dá por meio de ferimentos no sistema radicular e locais de emergência de raízes secundárias. Em seguida, a bactéria coloniza os espaços intercelulares do córtex da raiz e parênquima vascular, desestruturando a parede das células o que facilita também sua translocação pelo sistema vascular (Vasse et al., 1995). As células atingem 10^9 UFC (unidades formadoras de colônias)/g de haste (Tans-Kersten et al., 2004), levando a uma alta produção de polissacarídeos de grande viscosidade que obstruí os vasos (González & Allen, 2003). Swanson et al. (2005), observaram uma população bacteriana média $4,8 \times 10^8$ UFC/g em tecido de gerânio assintomático.

Estudos de Vasse et al. (1995) mostraram que após colonizar sítios de exudação, tais como extremidades de raízes, a bactéria infecta intercelularmente o córtex e o parênquima vascular. Em seguida, o patógeno invade os vasos de protoxilema degradando a parede celular. Existem, em tomate, dois sítios de colonização nas raízes chamados de zona de alongação e emergência de raízes secundárias, resultado de tropismo químico. O processo de infecção do córtex é intercelular. A invasão do protoxilema é um estágio seguinte a infecção dos tecidos e ocorre via degradação da parede celular. Foi observado também que a colonização de poucos vasos do xilema é suficiente para induzir a murcha.

Uma vez que invade os vasos do xilema atinge rapidamente a parte aérea (Tans-kersten et al., 2004). Após a morte das plantas a bactéria retorna ao solo, vivendo saprofiticamente até a infecção de novos hospedeiros (Vasse et al., 1995). A longas distâncias, a bactéria dissemina-se por meio de material propagativo com infecção latente (Gutarra et al., 1995); a curtas distâncias por utensílios, ferramentas, insetos etc. (Supriadi et al., 2001).

A dispersão por meio de material propagativo ocorreu entre vários países, por exemplo, através de rizomas de helicônia (Havaí para Austrália), de banana (América Central para as Filipinas) e por meio de tubérculos de batata (Mediterrâneo para

Suécia). No caso da **R3bv2**, da batata, sem dúvidas foi disseminada internacionalmente em tubérculos em infecção latente (Hayward, 1991). Segundo Salazar (2007), a dispersão de *R. solanacearum* por batata semente continua a ser uma preocupação com ocorrência mais grave na África.

Diagnóstico

A diagnose pode ser feita pela observação de sinais do patógeno como a exsudação de pus bacteriano (“teste do copo”); por características culturais: isolamento da bactéria em meio de cultura diferencial (Kelman, 1954), meios seletivos (Nesmith & Jenkins Jr., 1979). Para a murcha bacteriana do eucalipto realiza-se a reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de fumo e testes de patogenicidade em plântulas de eucalipto e tomate (Alfenas et al., 2009).

Métodos baseados no DNA, tais como oligonucleotídeos específicos para espécie e biovar para PCR (Fegan et al., 1998; Pastrik & Maiss, 2000) e imunofluorescência seguida de PCR (van der Wolf et al., 2000) e também anticorpos policlonais em testes sorológicos (Machmud & Suryadi, 2008), também são utilizados corroborando os demais testes.

Interações ambientais

O incremento da temperatura aumenta a incidência e início de murcha em geral, mas não para todos os isolados do patógeno. Plantas que apresentam resistência em temperaturas moderadas podem se tornar suscetíveis em condições de altas temperaturas. A resistência é temperatura-sensível e isolado-específico (Hayward, 1991).

Influência da umidade do solo na murcha bacteriana

Segundo Bunndenhagen & Kelman (1964), a umidade afeta a murcha de quatro formas: **a)** aumenta a sobrevivência; **b)** aumenta a infecção; **c)** aumenta o desenvolvimento da doença após a infecção e **d)** ajuda na saída do hospedeiro e

dispersão através do solo.

De uma forma geral, alta umidade favorece a murcha bacteriana. A sobrevivência do patógeno é grande em solos molhados e drenados, mas não em solos afetados pela dissecação ou inundação (Hayward, 1991).

Interação com nematóides

A interação sinérgica entre *Meloidogyne* spp. e *R. solanacearum* é reconhecida mundialmente. A formação das galhas pelo nematóide na raiz serve como porta de ingresso do patógeno, além de modificar o tecido da planta tornando-o mais apropriado para colonização bacteriana (Hayward, 1991).

Em tomate, por exemplo, Deberdt et al. (1999) avaliaram o aumento da suscetibilidade à murcha bacteriana utilizando infecção cruzada com os nematóides *Meloidogyne incognita* e *Rotylenchulus reniformis*. Em temperaturas baixas (22-27 °C), a bactéria foi ligeiramente patogênica a todas as linhagens de tomate. Em temperaturas altas (27-32 °C), o nematóide das galhas aumentou a severidade da murcha, mas o nematóide reniforme não teve tal efeito considerando a combinação temperatura versus cultivar.

Existem poucos relatos da interação entre nematóides e o eucalipto. Por outro lado, vários nematóides fitoparasitas são comuns em áreas florestais (Keane et al., 2000). *Xiphinema italiae* ocorre em eucalipto na região mediterrânea (Luc & Aubert, 1985). Em Portugal, *Xiphinema brevisicum* já foi descrito nessa cultura (Lambert et al., 1994).

No Brasil, *Pratylenchus brachyurus* foi observado causando lesões e fissuras no tecido cortical do eucalipto (Ruehle, 1973). Cruz et al. (2003) fizeram um levantamento da ocorrência de nematóides em genótipos de *Eucalyptus* spp. e *Pinus caribaea* (Morelet.), pois como dito anteriormente dentre os fitoparasitas existem poucas informações sobre o ataque destes em espécies florestais, notadamente em espécies de eucalipto. Eles observaram que nematóides importantes foram detectados, principalmente *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp. e *Mesocriconema* sp.

Outro estudo, realizado na região do cerrado por Mattos et al. (2008) mostrou que nos sistemas de cultivo com eucalipto prevaleceu fortemente o gênero *Xiphinema*, ocorrendo também: *Helicotylenchus*, *Tylenchus*, *Trophotylenchulus* etc.

Impacto da murcha bacteriana na cultura do eucalipto

A murcha bacteriana é considerada uma das mais importantes doenças em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Hayward, 1991), apesar de ser emergente na eucaliptocultura brasileira (Alfenas & Ferreira, 2008). É uma das doenças mais conhecidas nessa cultura na China (Zhou et al. 2008). Tem sido cogitada como um potencial agente de bioterrorismo nos EUA e praga quarentenária União Européia (Lambert, 2002).

Os danos variam de 30-40% em áreas recém-desmatadas e menos de 5% em áreas previamente usadas para pastagem ou plantios de grandes culturas (Ferreira, 2002). No ano de 2005 no Brasil, a murcha causou um prejuízo de aproximadamente seis milhões de reais, devido o descarte de mudas pela elevada incidência da murcha em viveiros (Alfenas et al., 2009).

Distribuição geográfica da murcha bacteriana do eucalipto

O primeiro relato da doença em eucalipto no Brasil foi em 1980, por Sudo et al. (1983) no Estado de Minas Gerais. Logo em seguida, no ano de 1984, foi observada em Tucuruí - Pará e na Bahia (Robbs et al., 1988). Dianese & Takatsu (1985) também a relataram no Pará. Auer et al. (2008) descreveram a bacteriose em plantios de um ano, no Estado de Santa Catarina. Todas as ocorrências da doença foram relacionadas ao biovar 1. Mais recentemente Marques et al. (2009) relataram a Raça 3 biovar 2 em plantio jovem no município de Alexania - GO.

Devido a biovar 3, a bacteriose ocorre nas principais regiões produtoras de eucalipto do mundo, tais como: China (Wu & Liang, 1988); Indonésia (Muchmud, 1985); Taiwan (Wang, 1992); Austrália (Akiew et al., 1994); Venezuela (Ciesla et al., 1996), África do Sul (Coutinho et al., 2000); Tailândia (Pongpanich, 2000); Uganda (Roux et al, 2000) e Vietnã (Thu et al., 2000).

Sobrevivência

Considerando que a infecção por *R. solanacearum* resulta na morte da planta, a colonização da rizosfera de seus hospedeiros é provavelmente um evento temporário. Dessa forma, na ausência de hospedeiro a bactéria é capaz de sobreviver no solo por longos períodos por meio da associação com matéria orgânica, restos de culturas ou plantas daninhas (Buddenhagen & Kelman, 1964).

Existe a evidência de uma fase epifítica no ciclo de vida da bactéria, que pode contribuir na sobrevivência e como fonte de inóculo (Hayward, 1991). A grande capacidade de sobrevivência deste patógeno pode estar associada ao fato de a bactéria utilizar uma variedade de compostos orgânicos como fonte de energia e também por sua habilidade de permanecer em uma fase dormente, estágio viável, mas não cultivável assim como outros microrganismos de solo (Grey & Steck, 2001). Além do uso de carboidratos e ácidos graxos, também pode utilizar compostos aromáticos derivados da degradação de lignina, o que possibilita a sua permanência no solo mesmo após a morte do hospedeiro (Genin & Boucher, 2002).

Grahan et al. (1979) avaliaram a sobrevivência de *R. solanacearum* em restos culturais e em infecção latente em tubérculos de batata, na Austrália. Esses materiais foram coletados de um campo abandonado por quase 2 anos. A bactéria permaneceu por mais de 233 dias neles, mostrando que esses materiais servem como fonte de sobrevivência da bactéria por longos períodos no campo.

Granada & Sequeira (1983) estudaram a sobrevivência do patógeno no solo, na rizosfera e em raízes. Observou-se que a bactéria não foi capaz de sobreviver na rizosfera. Por outro lado, altas populações estavam localizadas em infecções nas raízes, levando a conclusão de que a sobrevivência, a longo prazo, pode estar associada a habilidade de infectar raízes.

Shekawat & Perombelon (1991) avaliaram fatores que afetam a sobrevivência e virulência de estirpes da **R3bv2** e **R1bv3**. A **R3bv2** perdeu virulência a alto pH, mas manteve sua maior virulência no solo a 10 °C e umidade variando entre 20-40%.

van Elsas et al. (2000), ao monitorar a bactéria em campos de batata dos Países Baixos, observaram que sua população diminuiu progressivamente com o passar do tempo. Entretanto, a bactéria persistiu por períodos de 10 a 12 meses. Em outro estudo, a dinâmica populacional e fisiologia da R3bv2 na água foram avaliadas. Na água estéril foi observado um forte declínio dependente da temperatura, a 4 e 44 °C. Parte das

células não detectadas poderiam estar no estágio viável, mas não cultivável o que torna a detecção um problema para métodos baseados em cultivo (van Elsas et al., 2001).

Com o intuito de investigar os efeitos da temperatura na viabilidade do patógeno em gerânio, tomate, batata e em água estéril, Scherf et al. (2010) utilizaram uma estirpe adaptada a baixas temperaturas. A população bacteriana decresceu rapidamente, em dois dias sob 5 °C seguido por dois dias a -10 °C, nos três hospedeiros e em água estéril. Os resultados mostraram que as flutuações de temperatura desempenharam um papel crítico na perda de viabilidade bacteriana.

Em água pura, Wakimoto et al. (1982) observaram que células de *R. solanacearum* foram capazes de se multiplicar a 20 °C. Até o 60º dia a concentração se manteve e nenhuma alteração no tamanho das células foi observada.

Na Espanha e em outros países da Europa existe uma crescente população de R3bv2 contaminando cursos d'água, o que aumenta a preocupação sob o ponto de vista epidemiológico, já que plantas suscetíveis irrigadas a partir dessas fontes são infectadas pelo patógeno (Caruso et al., 2005).

A sobrevivência de estirpes de *R. solanacearum*, filótipo II bv 2 em água foi estudada por Álvarez e colaboradores (2008). Por um período de 4 anos as estirpes foram mantidas a 24 °C. No primeiro ano, as células mantiveram os números iniciais, depois disso a população perdeu progressivamente a habilidade de formar colônias cultiváveis, entretanto eram metabolicamente ativas. Durante esse período, as bactérias permaneceram patogênicas, mas sofreram uma transição na sua forma de bacilo a cocos que tendiam a se agregar, já outras células se tornaram filamentosas e formaram brotações.

Fase viável, mas não cultivável – VMNC

Em 1976, Novitsky & Morita observaram a diminuição do tamanho e mudança na forma de espécies de *Vibrio* para cocos, em função da escassez de alimento. Microscopia eletrônica revelou que suas estruturas internas eram normais, exceto pelo aumento do espaço periplasmático.

De fato os microrganismos podem recorrer a diversos mecanismos quando confrontados à privação de alimento, mantendo seus números com o passar do tempo, em um estágio não cultivável (Morita, 1997). Sobre prolongada oligotrofia, ocorre

redução no tamanho e forma das células bacterianas. Essas modificações são consideradas estratégias de sobrevivência no ambiente, assim como a indução de um estágio chamado de viável, mas não cultivável – VMNC (Novitskay & Morita, 1976).

Outras mudanças nas células no estágio VMNC envolvem a estabilização da membrana e parede celular, decréscimo em 60% de ácidos graxos, a redução do tamanho e número de RNA e condensação do citoplasma. Acredita-se que assim como no *quorum sensing* existam sinais extracelulares para as células reverterem esse estágio (McDougald et al., 1998).

Sugere-se o que o estágio de VMNC seja parte do ciclo de vida de bactérias, induzido por estresse ambiental, sendo uma resposta geneticamente programada da célula que reforça a sobrevivência durante períodos de estresse. Essas células em estágio VMNC devem ser capazes de sair deste estágio e retornar a um estágio metabólico ativo quando em condições favoráveis. Além da escassez de alimento, salinidade e luz também podem ser responsáveis por indução desse estágio. Existem relatos de reativação *in vitro* através de adição de nutrientes, transferência para meio fresco ou mesmo choque de temperatura. *Pseudomonas syringae* e *Rhizobium meliloti* tem como métodos de reversão apenas a adição de nutrientes. Para verificar se existe a viabilidade das células é necessária a demonstração da atividade metabólica e manutenção das estruturas celulares (McDougald et al., 1998).

Grey & Steck (2001) mostraram *R. solanacearum* entrar em estágio VMNC em resposta a sulfato de cobre, solução salina e quando cultivadas na presença de solo autoclavado. Células nesse estágio também foram observadas em 2004, por van Overbeek et al. em resposta a baixas temperaturas, através de um sistema de detecção por fluorescência. Os autores avaliaram a fisiologia e virulência de um isolado da **R3bv2** mantido em água a 4 e 20 °C por 132 dias. A 24 °C o número de células permaneceu constante até o 133º dia, entretanto a 4°C o número de UFC diminuiu até o 125º dia, onde não foram mais observadas. Isolados presentes no estágio de VMNC a 4 °C até o 100º dia foram inoculados em plantas e não causaram sintomas de murcha. Este trabalho também reportou a reversão das células neste estágio em solo próximo a raízes de plantas de tomate.

Conversão fenotípica

Sob certas condições de crescimento, como cultivo prolongado em meio *R. solanacearum* também sofre espontaneamente conversão fenotípica, que se caracteriza pelo aspecto da cultura mudando de uma colônia de morfologia mucóide para não mucóides, dificultando os trabalhos de rotina. Isolados bacterianos que passaram por essa conversão são incapazes de provocar murcha (Kelman, 1954), mas ainda crescem nas plantas e podem causar necrose de vasos e formação de raízes adventícias (Denny & Baek, 1991). Essa mudança é acompanhada da perda de produção de EPS (polissacarídeos extracelulares), redução da atividade da EG (endoglucanase), virulência e aumento da atividade da endopoligalacturonase e motilidade.

Estudos mostraram que este estágio está ligado a mutações no gene *phcA* (Brumbley & Denny, 1990) e poder ser atribuída a diferentes inserções dentro deste loco, que também está associado a fatores de virulência (Brumbley et al., 1993). Poussier et al. (2003) através de várias alterações em *phcA* reverteram a conversão fenotípica em mutantes de *R. solanacearum*.

***Ralstonia solanacearum* em culturas florestais**

Existem relatos da murcha bacteriana causada por *R. solanacearum* em outras espécies florestais. Supriadi et al. (2001) reuniu trabalhos que descrevem a ocorrência da bacteriose em essências florestais, entretanto algumas informações são incompletas (**Tabela 5**).

TABELA 5 - Espécies arbóreas hospedeiras de *Ralstonia solanacearum* (Modificado de Mafia, 2006).

Hospedeiro	Família Botânica	Biovar	País da Descrição
Palmeira-real-da-Austrália (<i>Archontophoenix alexandre</i> H.)	Arecaceae	3	Queensland (Austrália)
Cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	Anacardiaceae	3	Indonésia
Pinha (<i>Annona squamosa</i> L.)	Annonaceae	3	Queensland (Austrália)
Casuarina (<i>Cassuarina equisetifolia</i> L.)	Casuarinaceae	3,4	China
Moringa (<i>Moringa oleífera</i> Lam.)	Moringaceae	?	Índia
Amoreira (<i>Morus alba</i> L.)	Moraceae	3,5	China, Índia
Neem (<i>Azadirachta indica</i> Juss.)	Meliaceae	3	Queensland (Austrália)
Noz-moscada (<i>Myristica fragrans</i> L.)	Myristicaceae	?	Kerala (Índia)
Oliveira (<i>Olea europea</i> L.)	Oleaceae	3,4	China
Teca (<i>Tectona grandis</i> L.)	Verbenaceae	3	Malásia, Índia, Filipinas
Cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)	Myrtaceae	?	Indonésia
Jambo rosa (<i>Eugenia javanica</i> Lam.)	Myrtaceae	?	Taiwan
Eucalipto (<i>Eucalyptus</i> spp.)	Myrtaceae	1,1,3,3,3	Brasil, Venezuela, Ásia, África, Austrália

Gama de hospedeiras da Raça 3 biovar 2

A Raça 3 biovar 2 (**R3bv2**), conhecida como “raça da batata”: é encontrada em batata e, ocasionalmente, em tomate, berinjela e pimentão. Prevalece nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Não obstante, ocorre também em áreas com temperaturas amenas de regiões mais quentes, como na região Nordeste do Brasil (Lopes, 2009). Atualmente encontra-se disseminada mundialmente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, por exemplo: Bélgica, França, Suécia, Espanha e o Reino Unido (Janse, 1988; Elphinstone et al. 1996). Aparece também em toda a Ásia, África, México, Caribe e América do Sul. Além de ter sido registrada em estados da Austrália, exceto Tasmânia e Austrália Ocidental (Stansbury et al., 2001). A disseminação através de tubérculos, água, solo e ervas daninhas pode ter contribuído para estabelecimento do organismo nessas áreas (Janse, 1998; Elphinstone et al. 1996).

A gama de hospedeiras dessa biovar permanece confusa. Entretanto, trabalhos descrevem inúmeras espécies afetadas. Além das plantas citadas anteriormente foi descrita em gerânio nos EUA (Strider et al., 1981; Hudelson et al., 2002), Brasil (Almeida et al., 2003) e Europa. Além de infecção latente em *Petunia x hybrida* (Janse et al., 2004).

Só em 2005 a doença foi relatada nas Ilhas Maurício, em campos de batata e nas ervas daninhas *Solanum americanum*, *Lycopersicon pimpinellifolium* e *Oxalis latifolia*, que não apresentavam sintomas, mas formaram fluxo bacteriano. Embora a origem não seja conhecida a bactéria foi caracterizada como **R3bv2A** (Khoodoo et al., 2007).

Estudando a gama de hospedeiros dessa biovar, Álvarez et al. (2008) observaram que, após inocular a bactéria no solo, repolho (*Brassica oleracea*), kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) e dulcamara (*Solanum dulcamara*) foram colonizadas pela bactéria. Entretanto, cevada (*Hordeum vulgare*), rutabaga (*Brassica napus nappobrassicus*), “colocynth” (*Citullus colocynthis*), alfafa (*Medicago sativa*), rabanete (*Raphanus sativus*), cenoura (*Daucus carota*), aipo (*Apium graveolens*), funcho (*Foeniculum vulgare*), ervilha (*Pisum* spp.), linho (*Linum* spp.), field bean (*Vicia* spp.) e rábano silvestre (*Armoracia rusticana*) foram considerados não hospedeiros.

Segundo um guia realizado pelo USDA, os hospedeiros cultivados da **R3bv2** seriam: gerânio (*Pelargonium* spp.); tomate (*Solanum esculentum*); pimentão (*Capsicum*

spp.); berinjela (*Solanum melongena*); batata (*Solanum tuberosum*); feijão (*Phaseolus vulgaris*); melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) e beterraba (*Beta vulgaris*) (Floyd, 2008). Por outro lado, mais de 60 plantas entre solanáceas e não solanáceas já foram relatadas como hospedeiras, seja naturalmente ou por infecção artificial (Janse et al., 2004).

Pradhanang e colaboradores (2000) avaliaram a possibilidade de ervas daninhas e espécies agrícolas comuns do Nepal agir como hospedeiras a R3bv2. Populações da bactéria foram recuperadas de extratos de raízes das ervas daninhas de verão: *Drymaria cordata* e *Polygonum capitata*, quando amostradas em campos cultivados anteriormente com murcha bacteriana da batata. Mostarda (*Brassica juncea*) desenvolveu sintomas típicos de murcha depois da inoculação artificial em condições de estufa, mas não em condições de campo.

Segundo Miranda et al. (2004), as espécies mentruz (*Lepidium virginicum*); joá-de-capote (*Nicandra physaloides*); maria-pretinha (*Solanum americanum*); beldroega (*Portulaca oleracea*); camapú (*Physalis angulata*); caruru (*Amaranthus* spp.); amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*); chocalho-de-cascavel (*Crotalaria spectabilis*) e picão-preto (*Bidens pilosa*) permitiram colonização pelas biovars, 1, 2 e 3 da bactéria. Janse et al. (2004) também observou a doença em beldroega também através de inoculações artificiais da R3bv2.

O guia do USDA aponta erva moura (*Solanum nigrum*); dulcamara (*Solanum dulcamara*); beladona-bola (*Solanum carolinense*); figueira-do-inferno (*Datura stramonium*); beldroega (*Portulaca oleracea*); mostarda (*Brassica* spp.) e erva-de-santa-maria (*Chenopodium album*) como ervas daninhas hospedeiras de *R. solanacearum* **R3bv2** (Floyd, 2008).

A interação de *R. solanacearum* com o sistema radicular de plantas daninhas é pouco conhecida. Há plantas que exibem sintomas típicos de murcha, mas também as que permanecem assintomáticas (Hayward, 1994; Tussime, 1997). Segundo Olson (1976), as espécies *Solanum cinereum* e *Solanum dulcamara* funcionam como fonte de sobrevivência da biovar 2 de batata em países da Europa.

Medidas gerais de controle da murcha bacteriana

Várias estratégias de controle têm sido desenvolvidas, mas muitas são de aplicação limitada nas plantas acometidas pela doença. Não existem soluções universais e sim princípios que podem ser aplicados e adaptados a situações particulares (Hayward, 1991). Uma vez estabelecido no campo, o controle do patógeno é dificultado. O mais indicado é adotar o controle integrado, baseado em várias medidas preventivas e complementares (Lopes, 2009).

No caso do eucalipto o sistema de produção de mudas, é basicamente, clonal e altamente favorável à multiplicação de *R. solanacearum* (Alfenas et al., 2006). Segundo Cunha et al. (2006), doenças causadas por bactérias constituem um novo desafio à cultura do *Eucalyptus* spp., podendo, inclusive, limitar o uso de clones suscetíveis. Nas duas últimas décadas grandes esforços foram feitos no intuito de se controlar a murcha bacteriana do eucalipto (Ran et al., 2005). O controle da doença é dificultado devido a sua natureza sistêmica, pela alta capacidade de sobrevivência do patógeno e fácil disseminação (Mafia, 2006).

Controle Químico

Como dito anteriormente o patógeno é de difícil controle devido à sua ampla gama de hospedeiros, variação entre isolados e falta de tratamento químico adequado. Produtos químicos já testados para determinadas culturas precisam ser validados em maior escala e para demais cultivos (Champoiseau et al. 2010).

Sabe-se que a bactéria pode estar presente em camadas de até 1 m de profundidade (Hayward, 1991). Dessa forma, a fumigação do solo é de eficácia e utilidade limitadas (Champoiseau et al., 2010).

O ácido fosfórico surgiu como uma forma alternativa e eficiente de controle de *R. solanacearum*. O composto, já considerado como um biopesticida tem sido estudado na proteção das plantas. Avaliações realizadas por Norman et al. (2006) mostraram diminuição da doença em gerânio, sendo que a proteção contra a infecção provavelmente se dá por uma

ação bacteriostática.

No controle de pragas e doenças do eucalipto normalmente não se aplicam defensivos agrícolas de forma preventiva. As intervenções químicas, quando necessárias, são feitas preferencialmente com o uso de produtos de baixa toxicidade e geralmente em fase de viveiro (Aracruz, 2008). Não existem produtos registrados para o controle da murcha bacteriana do eucalipto no Brasil, segundo informação obtida no AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do Ministério da Agropecuária e Abastecimento – (http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons).

O tratamento da água de irrigação pode ser efetivo com baixas doses de cloro (Champoiseau et al. 2010).

Controle Cultural

A certificação de origem é a forma mais efetiva de se obter mudas isentas de qualquer fitopatógeno, procedendo-se a indexação, ou seja, certificação da ausência do patógeno na planta-matriz. Como já citado anteriormente, no caso do eucalipto em que a produção de mudas é basicamente clonal, as estacas comprovadamente sadias devem ser adquiridas de viveiros que garantam a certificação de origem (Alfenas et al., 2009).

A rotação de culturas é também uma prática recomendável, pois dependendo da planta utilizada ocorre uma grande redução do patógeno no terreno. Obviamente que varia de acordo com o grau de infestação da área (Lopes, 2009). Em outros casos a rotação é capaz ao menos de reduzir a transmissão raiz-raiz. Para batata a rotação com feijão ou milho mostrou redução na incidência da doença (Hayward, 1991).

O consórcio com caupi dentro da linha de plantio de tomate levou a uma redução significativa da murcha, segundo Michel et al. (1997). Outra planta que mostrou supressão quando consorciada com tomate, na China, foi a cebolinha (*Allium fistulosum*). Extratos radiculares da planta também inibiram *in vitro* *R. solanacearum* (Yu, 1999).

No Suriname concha triturada (42% CaO) diminuiu a incidência da doença (Hayward, 1991).

Avaliando a incidência da murcha bacteriana do tomate, em Taiwan, Michel et al.

(1997) observaram que a aplicação de 200 kg/ha de uréia e 5000 kg/ha de óxido de cálcio reduziram significativamente a população do patógeno e a incidência de murcha.

O uso de fertilizante à base de silício foi estudado por Ayana et al. (2010) no controle da murcha no campo, em tomate. A aplicação de 15 kg/m² reduziu significativamente a população bacteriana e a média de incidência de murcha em uma cultivar moderadamente resistente.

A eliminação de plantas doentes, assim como daninhas, irrigação bem manejada, controle do movimento de máquinas (evita dispersão de focos) e declividade do terreno também são fatores a serem considerados no manejo da murcha bacteriana. No caso de pequenos focos as plantas devem ser arrancadas e eliminadas (incineradas ou enterradas e cobertas por uma camada fina de cal), uma camada de cal também pode ser utilizada na cova da planta erradicada, evitando-se assim a contaminação de plantas vizinhas (Lopes, 2009).

O uso de areia livre de inóculo também é imprescindível no caso de minijardins clonais de eucalipto. Deve-se realizar o replantio através de mudas com sistema radicular bem-formado e sem injúrias nas raízes e colo e evitar dobrar ou compactar a ponta das raízes durante o plantio (Alfenas et al., 2009).

Indução de resistência

A indução de resistência tem sido estudada no controle de bacterioses, tanto por indutores bióticos quanto abióticos (Silva et al., 2007).

Extratos de cogumelos mostraram alto potencial na indução de resistência em tomate (Silva et al., 2007) e berinjela (Silva et al., 2008), contra a murcha bacteriana causada por *R. solanacearum*.

Araujo et al. (2005) e Barretti et al. (2010) no Brasil e Pradhanang et al. (2005) na Flórida EUA estudaram o efeito do acibenzolar-*S*-metil na murcha bacteriana do tomate e observaram que a resistência foi significativamente realçada por este produto.

Teng e colaboradores (2006) avaliaram o efeito de uma estirpe de *Streptomyces* sp. e observaram que a severidade da murcha do tomateiro foi significativamente reduzida

quando as folhas superiores das mudas foram infiltradas ou a raiz irrigada com a suspensão bacteriana. Contudo, a resistência persistiu somente por alguns dias.

A indução de resistência sistêmica contra a murcha bacteriana do eucalipto foi estudada através do uso de rizobactérias por Ran et al. (2005). Os isolados de *Pseudomonas* spp. que produziam ácido salicílico *in vitro* não induziram resistência sistêmica contra a murcha em eucalipto quando aplicados via solo, mas sim quando inoculados nas folhas.

Evasão

Como altas temperaturas e umidade do solo são condições favoráveis à maioria dos isolados do patógeno, perdas podem ser minimizadas pela manipulação da data de plantio. Recomenda-se o plantio no inverno onde seria menos sujeito a ocorrência da doença (Lopes, 2009).

A escolha da área de plantio também é fundamental. Terrenos de baixada ou argilosos, sujeitos ao encharcamento (Hayward, 1991), assim como os com histórico da doença ou cultivados com outras hospedeiras da bactéria devem ser evitados nos patossistemas em geral (Lopes, 2009).

Controle Físico

A solarização é uma técnica desenvolvida para a desinfestação de solos e substratos antes do plantio (Katan et al., 1976) e já foi estudada para vários patógenos de solo. Na Flórida EUA observou-se inicialmente que a técnica reduziu a população de *R. solanacearum* apenas nas camadas mais superficiais do solo, mostrando resultados pouco consistentes para a murcha (Chelemi & Olson, 1994; Chelemi et al., 1997)

No Brasil a solarização foi estudada por Patrício et al. (2005) no controle da murcha bacteriana e se mostrou promissora nas profundidades de 0-10 e 0-20 cm. Segundo Lopes (2009), a técnica utilizada por dois a três meses, embora não elimine a bactéria, reduz significativamente a fonte de inoculo no solo.

Formas alternativas de controle da murcha

Formas alternativas de controle da murcha de *R. solanacearum* em tomate, tais como óleos voláteis de plantas foram testados por Ji et al. (2005) em biofumigação. Os óleos extraídos de *Thymus* spp. e *Cymbopogon martinii* foram capazes de reduzir a incidência da doença.

Também em tomate, Cardoso et al. (2006) avaliaram o efeito de matéria orgânica na melhoria das características físicas, químicas e biológicas do solo, ou seja, como indutora de supressividade da murcha. A incorporação e incubação por 30 dias com guandu e crotalária promoveu 100% de controle da murcha, em todas as concentrações avaliadas.

A biofumigação através da adição de cama de frango (20 t/ha) associada com solarização e brometo de metila possibilitou uma produção significativamente maior de tubérculos de batata em relação à testemunha, segundo Baptista et al. (2006).

O efeito de certos açúcares e aminoácidos, selecionadas com base na habilidade de utilização pelo patógeno, foi estudado por Posas et al. (2007) na inibição da murcha em tomate, quando aplicados no solo juntamente com a bactéria. Glucose, prolina, glutamina, serina, arginina e lisina foram compostos que mostraram efeito supressivo sobre a murcha. O mesmo foi observado posteriormente quando se analisou o efeito da adição de lisina e serina. A menor incidência de doença pode ser explicada devido ao desenvolvimento de uma comunidade bacteriana específica no rizoplane do tomate com a adição do aminoácido (Posas & Toyota, 2010).

A atividade antimicrobiana do óleo de cravo (*Syzygium aromaticum* L.) foi investigada contra fitobactérias, incluindo *R. solanacearum*, que foi a mais sensível *in vitro*. A aplicação de 5 mL/kg do óleo na fumigação do solo reduziu o patógeno a níveis indetectáveis (Huang & Lakshman, 2010).

Na Etiópia Ayana et al. (2010) estudaram o efeito do bagaço de cana (*Saccharum officinarum* L.) como uma estratégia de controle da murcha em tomateiro no campo. A aplicação de 1 t/ha uma semana antes do transplante resultou numa redução significativa da murcha e severidade da doença, mostrando ter potencial no manejo alternativo.

Ainda na Etiópia o manejo da murcha do tomate com composto de coco (*Cocos nucifera* L.), estrume de vaca e adubo verde foi avaliado. Supressão completa de *R.*

solanacearum foi observada com tramentos de 5 e 10% de esterco, 1% composto verde e 10% (v/v) de composto de côco (Yadessa et al., 2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF (2011) Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. Informativo 224. <http://www.abraflor.org.br/informativo/ABRAF224.pdf>

ABRAF (2009) Anuário Estatístico: ano base 2009. <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF10-BR.pdf>

ABRAF (2008) Anuário Estatístico: ano base 2008. <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF09-BR.pdf>

Agenda Silvicultura (2009). http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Florestas_plantadas/9_reuniao/Agenda_Sivicultura.pdf

Akiew E, Tevorow PR (1994) Management of bacterial wilt of tobacco. In: Hayward A, Hartman GL (Eds.) Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford UK. CAB International. pp. 179-198.

Alfenas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF de (2009) Clonagem e doenças do eucalipto. 2ª Ed. Viçosa MG. Editora UFV.

Alfenas AC, Ferreira EM (2008) Emerging diseases in eucalyptus plantations. *Tropical Plant Pathology* 33 (Supl.):S25.

Alfenas AC, Mafia RG, Sartório RC, Binoti DHB, Silva RR, Lau D, Vanetti CA (2006) *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*

31:357-366.

Alfenas AC, Mafia RG (2003) Controle integrado de doenças em viveiros clonais e aspectos relativos a ferrugem (*Puccinia psidii*) do eucalipto. Fitopatologia Brasileira 28:156-163.

Almeida IMG, Destefano SAL, Rodrigues Neto J, Malavolta Jr. VA (2003) Murcha bacteriana do gerânio causada por *Ralstonia solanacearum* biovar 2/raça 3 no Brasil. Revista de Agricultura 78:49-56.

Álvarez B, López MM, Biosca GE (2008) Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. Microbiology 154:3590-3598.

Aracruz (2008) Eucalipto & Meio Ambiente em tempos de aquecimento global. http://www.aracruz.com.br/eucalipto/pt/download/eucalipto_meioAmbiente.pdf

Araujo JS de P, Gonçalves K da S, Oliveira BC de, Ribeiro R de LD, Polidoro JC (2005) Efeito do acibenzolar-S-methyl sobre murcha-bacteriana do tomateiro. Horticultura Brasileira 23:5-8.

Auer CG, Santos AF, Rodrigues Neto J (2008) Ocorrência de murcha bacteriana em plantios de *Eucalyptus grandis* no estado de Santa Catarina. Tropical Plant Pathology 3 (Supl.):370.

Ayana G, Fininsa C, Ahmed S, Wydra K (2010) Effects of soil amendment on bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and tomato yields in Ethiopia. Journal of Plant Protection Research 51:72-76.

Baptista MJ, Lopes CA, Souza RB, Furumoto O (2006) Efeito da solarização e biofumigação, durante o outono, na incidência de murcha bacteriana e produtividade da

batata. Horticultura Brasileira 24:99-102.

Barretti PB, Souza RM, Pozza EA, Resende MLV (2010) Aplicação e doses de acibenzolar-S-metil na proteção contra a murcha bacteriana, população do patógeno e crescimento do tomateiro. Tropical Plant Pathology 35:229-235.

BRACELPA (2009) Relatório Anual.
http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/public/RA02-RelatorioFlorestal_2009.pdf

BRACELPA (2007) O mito sobre o eucalipto.
<http://www.bracelpa.org.br/bra/saibamais/eucalipto/index.htm>

Brumbley SM, Carney BF, Denny TP (1993) Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of *phcA*, a putative *lysr* transcriptional regulator. Journal of Bacteriology 157:5477-5487.

Brumbley S, Denny T (1990) Cloning of wild-type *Pseudomonas solanacearum phcA*, a gene that when mutated alters expression of multiple traits that contribute to virulence. Journal of Bacteriology 172:5677-5685.

Buddenhagen I, Kelman A (1964) Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 2:203-230.

Buddenhagen I, Sequeira L, Kelman A (1962) Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 52:726.

Cardoso SC, Soares ACF, Brito A dos S, Laranjeira FF, Ledo CS, Santos AP (2006) Controle da murcha bacteriana do tomateiro pela incorporação da parte aérea de guandu e crotalária no solo. Summa Phytopathologica 32:27-33.

Caruso P, Palomo JL, Bertolini E, Álvarez B, López M, Biosca EG (2005) Seasonal

variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: recovery of stressed cells at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 71:140-148.

Castillo JA, Greenberg JT (2007) Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:1225-1238.

Champoiseau PG, Jones JB, Momol TM, Ji P, Allen C, Norman DJ, Harmon C, Miller A, Schubert T, Bell D, Floyd JP, Kaplan D, Bulluck R (2010) *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causing brown rot of potato, bacterial wilt of tomato, and southern wilt of geranium. <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/00000000/opmp/Rs3-2RecoveryPlan-v-Oct112006.pdf>

Chelemi DO, Olson SM, Mitchell DJ, Secker I, McSorley R (1997) Adaptation of soil solarization to the integrated management of soilborne pests of tomato under humid conditions. *Phytopathology* 87:250-258.

Chelemi DO, Olson SM (1994) Effects of soil solarization and fumigation on survival of soilborne pathogens of tomato in Northern Florida. *Plant Disease* 78:1167-1172.

Ciesla WM, Diekmann M, Putter CA (1996) *Eucalyptus* spp. Rome Italy. Technical Guidelines for the safe movement of germplasm 17.

Coutinho TA, Roux J, Riedel KH, Terblanche J, Wingfield MJ (2000) First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. *Forest Pathology* 30:205-210.

Crestana MSM, Moreira R (2009) Plantio de Eucalipto. http://www.infobibos.com/Artigos/2009_3/eucalipto/index.htm

Cruz MC, Otoboni CE de M, Ferreira RV, Goulart SL (2003) Ocorrência de nematóides em genótipos de *Eucalyptus* e *Pinus caribaea*. Revista científica eletrônica Agronomia 4. <http://www.revista.inf.br/agro04/artigos/artigo10.pdf>

Cunha J de F, Picoli EA de T, Alfenas AC, Gonçalves RC (2006) Efeito *in vitro* de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. Revista Árvore 30:871-876.

Deberdt P, Queneherve P, Darrasse A, Prior P (1999) Increased susceptibility to bacterial wilt in tomatoes by nematode galling and the role of the *Mi* gene in resistance to nematóides and bacterial wilt. Plant Pathology 48:408-414.

Denny TP, Hayward AC (2001) *Ralstonia*. In: Schaad NW et al. (Eds.) Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. Minnesota. APS Press. pp. 151-174.

Denny TP, Baek SR (1991) Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. Molecular Plant-Microbe Interactions 4:198-206.

Dianese JC, Takatsu A (1985) *Pseudomonas solanacearum* biovar 1 isolada de eucalipto em Monte Dourado, Estado do Pará. Fitopatologia Brasileira 10 (Supl.):362.

Dossa D (2003) Cultivo do Eucalipto - Importância socioeconômica e ambiental. http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto/01_01_historico.htm

Elphinstone JG, Hannessy J, Wilson JK, Stead DE (1996) Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers extracts. Bulletin OEPP 26:663-678.

EPPO (2004) European and Mediterranean Plant Protection Organization. Diagnostic

protocols for regulated pests. Bulletin 34:155-157.

Fegan M, Prior P (2005) How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? In: Allen P, Prior P, Hayward AC (Eds.) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. St Paul MN. APS Press. pp. 449-461.

Fegan M, Holoway G, Hayward AC, Timmis J (1998) Development of a diagnostic test based upon the polymerase chain reaction (PCR) to identify strains of *Ralstonia solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype. In: Prior P, Allen C, Elphistone J (Eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Paris. INRA Editions. pp. 34-43.

Floyd J (2008) *New Pest Response Guidelines: Ralstonia solanacearum race 3 biovar 2*. USDA-APHIS-PPQ-Emergency and Domestic Programs, Riverdale, Maryland. http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/index.shtml

Ferreira FA (2002) Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. Mogi Guaçu SP. International Paper.

Ferreira FA (1989) Patologia Florestal. Viçosa MG. Sociedade de Investigações Florestais.

Garrity GM, Staley JT, Boone DR, Brenner DJ, De Vos P, Goodfellow M, Krieg NR, Rainey FA, Schleifer K-H (2005) Proteobacteria. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Michigan State University. pp. 575-623.

Genin S, Boucher C (2002) *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. Molecular Plant Pathology 3:111-118.

Gillings MR, Fahy P (1994) Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In Hayward AC (Ed.) Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford UK. CAB

International. pp. 952-112.

Gonçalves RC (2003) Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil. Tese de Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa.

González ET, Allen C (2003) Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:536-544.

Grahan JDA, Jones A, Lloyd AB (1979) Survival of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in plants debris and in infected potato tubers. *Phytopathology* 69:1100-1103.

Granada GA, Sequeira L (1983) Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere and plant roots. *Canadian Journal of Microbiology* 29:433-440.

Grey BE, Steck TR (2001) The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3866-3872.

Gutarra ERFL, Aley P, Elphinstone J (1995) Methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato crops. In: Hardy B, French ER (Eds.). *Integrated management of bacterial wilt*. India. Proceedings of an international workshop held in New Delih.

Hayward AC (1994) The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward AC, Hartman GL (Eds.) *Bacterial wilt: The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Willingford UK. CAB International. pp. 25-34.

Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29:65-87.

Hayward AC (1964) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied*

Bacteriology 27:265-277.

Higa RCV, Mora AL, Higa AR (2000) Plantio de eucalipto na pequena propriedade rural. Colombo PR. Embrapa Florestas. Documentos, 54.

Huang Q, Lakshman DK (2010) Effect of clove oil on plant pathogenic bacteria and bacterial wilt of tomato and geranium. Journal of Plant Pathology 92:701-707.

Hudelson BD, Williamson L, Nakaho K, Allen C (2002) *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 strains isolated from geranium are pathogenic on potato. White River. In: Proceedings 3rd International Symposium on Bacterial Wilt.

Janse JD, van den Beld HE, Elphistone J, Simpkins S, Tjou-Tam NNA, Vaerenbergh J (2004) Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. Journal of Plant Pathology 86:147-155.

Janse JD (1998) Potato brown rot in Western Europe - history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. Bulletin OEPP 26:679-695.

Janse JD (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. Bulletin OEPP/EPPO. Bulletin 18:343-351.

Ji P, Momol MT, Olson SM, Pradhanang PM, Jones JB (2005) Evaluation of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. Plant Disease 89:497-500.

Katan J, Greenberger A, Alon H, Grinstein A (1976) Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil-borne pathogens. Phytopathology 66:683-688.

Keane PJ, Kile GA, Podger FD (2000) Diseases and pathogens of eucalypts. In: Keane PJ, Kile GA, Podger FD, Brown BN (Eds.) Diseases associated with nematodes. Australia. CSIRO. pp. 346-348.

Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.

Khoodoo MHR, Ganoo ES, Saumtally S (2007) First report of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2A infecting potato and weeds in Mauritius. *Plant Disease - Disease Notes* 91:1200. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-91-9-1200B>

Krugner TL, Auer GC (2005) Doenças do eucaliptos. In: Kimati H, Amorin L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) *Manual de Fitopatologia*. São Paulo. Editora Agronômica Ceres Ltda. pp. 319-332.

Lambert CD (2002) Agricultural Bioterrorism Protection Act of 2002: Possession, use and transfer of biological; agents and toxins; interim and final rule. (7 CFR Part 331). *Federal Register* 67:76908-76938.

Lambert F, Bravo MA, Agostinello A, Lemos RM (1994) The *Xiphinema americanum* - group in Portugal with descriptions of four new species (Nematoda, Dorylaimida) *Nematologia Mediterranea* 22:189-218.

Lapage SP, Sneath PHA, Lessel EF, Skerman VBD, Seelinger HPR, Clark WA (1992) *International Code of Nomenclature of Bacteria*. Washington. American Society of Microbiology.

Lopes CA (2009) Murcha bacteriana ou murchadeira - Uma inimiga do tomateiro em climas quentes. Brasília DF. Comunicado Técnico Embrapa 67.

Luc M, Aubert V (1985) Notes brevès on the distribution of *Xiphinema italiae* Meyl, 1953 and *X. savanicola* Luc & Southey, 1980 (Nematoda: Longidoridae). *Revue Nematologie* 8:85-92.

Machmud M, Suryadi Y (2008) Detection and identification of *Ralstonia solanacearum* strains using the indirect ELISA technique. *Indonesian Journal of Agriculture* 1:13-21.

Mafia RG (2006) Sintomatologia, etiologia e controle da murcha bacteriana do eucalipto. Tese de Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa.

Marques E, Rezende DV, Uesugi CH (2009) Primeiro relato da biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* em eucalipto no Brasil. *Tropical Plant Pathology* 34 (Supl.):12.

Mattos JKA, Andrade EP, Teixeira MA, Castro APG, Huang SP (2008) Gêneros-chaves de onze diferentes comunidades de nematóides do solo na região dos cerrados do Brasil central. *Nematologia Brasileira* 32:142-149.

McDougald D, Rice SA, Weichart D, Stajan K (1998) MiniReview Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology* 25:1-9.

Michel VV, Wang JF, Midmore DF, Hartman GL (1997) Effects of intercropping and soil amendment with urea and calcium oxide on the incidence of bacterial wilt of tomato and survival of soil-born *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. *Plant Pathology* 46:600-610.

Miranda EFO, Takatsu TA, Uesugi CH (2004) Colonização de raízes de plantas daninhas cultivadas *in vitro* e em vasos por *Ralstonia solanacearum* biovars 1, 2 e 3. *Fitopatologia Brasileira* 29:121-127.

Morita RY (1997) Bacteria in oligotrophic environments: starvation-survival lifestyle. *Limnology & Oceanography* 43:1021-1022.

Muchmud M (1985) Bacterial wilt in Indonesia. In: Crashwell ET, Pushperajah E (Eds.) Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Canberra. ACIAR Proceedings 13. pp. 30-34.

Nesmith WC, Jenkins SF (1979) A selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum* from soil. *Phytopathology* 69:182-185.

Norman DJ, Chen J, Yuen JMF, Mangravita-Novo A, Byrne D, Walsh L (2006) Control of bacterial wilt of geranium with phosphorous acid. *Plant Disease* 90:798-802.

Novitsky JA, Morita RY (1976) Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine vibrio. *Applied and Environmental Microbiology* 32:617-622.

Olson K (1976) Experience of brown rot caused by *Pseudomonas solanacearum* (Smith) in Sweden. *EPPO Bulletin* 6:199-207.

Palleroni NJ, Douderoff M (1971) Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 107:690-696.

Pastrik KH, Maiss E (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology* 48:619-626.

Patrício FRA, Almeida IMG, Santos AS, Cabral O, Tessarioli Neto J, Sinigaglia C, Beriam LOS, Rodrigues Neto J (2005) Avaliação da solarização do solo para o controle de *Ralstonia solanacearum*. *Fitopatologia Brasileira* 30:475-481.

Posas MB, Toyota K (2010) Mechanism of tomato bacterial wilt suppression in soil amended with lysine. *Microbes and Environments* 25:83-94.

Posas MB, Toyota K, Islam TMD (2007) Inhibition of bacterial wilt of tomato caused by

Ralstonia solanacearum by sugars and amino acids. *Microbes and Environments* 22:290-296.

Pongpanich K (2000) *Eucalyptus* pathology in Thailand. In: *Eucalyptus* diseases and their management. Kasetsart University Bangkok. ACIAR 9441 Final Report. pp. 6-8.

Poussier S, Thouquet P, Trigateli-Demery D, Barthet S, Meyer D, Arlat M, Trigalet A (2003) Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Molecular Microbiology* 49:991-1003.

Poussier S, Trigalet-Demery D, Vandewalle P, Goffinet B, Luisetti J, Trigalet A (2000) Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* 146:1679-1692.

Poussier S, Vandewalle P, Luisetti J (1999) Genetic diversity of African and worldwide estirpes of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2184-2194.

Pradhanang PM, Ji P, Momol MT, Olson SM, Mayfield JL, Jones JB (2005) Application of acibenzolar-*S*-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease* 89:989-993.

Pradhanang PM, Elphinstone JG, Fox RTV (2000) Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. *Plant Pathology* 49:403-413.

Ran LX, Li ZN, Wu GJ, Van Loon LC, Bakker PAHM (2005) Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. *European Journal of Plant Pathology* 113:59-70

Robbs CF, Cruz AP, Neto JR (1988) Algumas estratégias de controle à murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em eucaliptos. Jaguariúna SP. Comunicado Técnico Embrapa 3.

Rocha ME do N, Santos CL dos (2007) O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill – Myrtaceae. Saúde & Ambiente em revista Universidade Unigranrio 2:23-34.

Roux J, Coutinho TA, Majuni BD, Wingfield MJ (2000) Diseases of plantation *Eucalyptus* in Uganda. South Africa Journal of Science 97:16-18.

Ruehle JL (1973) Nematodes and forest trees-types of damage to tree roots. Annual Review of Phytopathology 11:99-118.

Salazar LF (2007) Situacion mundial de la sanidad de la semilla de Papa. Fitopatologia Brasileira 32 (Supl.):S83.

Santos AF do, Auer CG, Grigoletti Jr. A (2001) Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Colombo PR. Circular Técnica Embrapa 45.

SBS – Sociedade Brasileira de Silvicultura (2008) Fatos e números do Brasil florestal. <http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>

Scherf JM, Milling A, Allen C (2010) Moderate temperature fluctuations rapidly reduce viability of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 in infected geranium, tomato, and potato. Applied and Environmental Microbiology Accepts, published online ahead of print on 17 September 2010. <http://aem.asm.org/cgi/reprint/AEM.01580-10v1>

Shekawat GS, Perombelon MCM (1991) Factors affecting survival in soil and virulence of *Pseudomonas solanacearum*. Zeitschrift Fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz

98:258-267.

Silva RF, Pascholati SF, Bedendo IP (2008) Indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*: aspectos bioquímicos e biomassa vegetal. *Summa Phytopathologica* 34:137-144.

Silva RF, Pascholati SF, Bedendo IP (2007) Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. *Fitopatologia Brasileira* 32:189-196.

Silva KR, Minetti LJ, Fiedler NC, Venturoli F, Machado EGB, Souza AP de (2004) Custos e rendimentos operacionais de um plantio de eucalipto em região de cerrado. *Revista Árvore* 28:361-366.

Silveira JRP, Duarte V, Moraes MG, Oliveira AMR, Barni V, Maciel LN (2005) Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana, por PCR-Rep e RAPD. *Fitopatologia Brasileira* 30:615-622.

Smith EF (1986) A bacterial disease of tomato, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* sp. nov.). Department of Agriculture Division of Vegetable Physiology and Pathology. *Bulletin* 12:21-28.

Stansbury C, McKirdy S, Mackie A, Power G (2001) Bacterial wilt *Ralstonia solanacearum* - race 3 exotic threat to Western Australia. ISSN 1443-7783. http://www.agric.wa.gov.au/objtwr/imported_assets/content/pw/ph/dis/veg/fs00701.pdf

Strider DL, Jones RK, Haygood RA (1981) Southern bacterial wilt of geranium caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Disease* 65:52-53.

Sudo S, Oliveira GHN, Pereira AC (1983) Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e bracatinga (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith.

Fitopatologia Brasileira 8 (Supl.):631.

Supriadi D, Karden M, Sitepu D (2001) Bacterial wilt disease of woody trees caused by *Pseudomonas solanacearum*: a review. Jurnal Litbang Pertanian Local 20:106-112.

Swanson JK, Yao J, Tans-Kersten J, Allen C (2005) Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. Phytopathology 95:136-143.

Tans-Kersten J, Brown D, Allen C (2004) Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by *FlhDC* and the plant host environment. Molecular Plant-Microbe Interactions 17:686-695.

Teng YC, Tzeng KC, Hsu ST (2006) Induction of systemic resistance in tomato against bacterial wilt by a plant growth-promoting rhizobacterium *Streptomyces* sp. RS70. Plant Pathology Bulletin 15:107-116

Thu PQ, Old KM, Dudzinski MJ, Gibbs RJ (2000) Results of eucalyptus disease surveys in Vietnam. In: *Eucalyptus* diseases and their management. Kasetsart University Bangkok. ACIAR 9441 Final Report. pp. 6-8.

Tussime G, Adipala E, Opiyo F, Bhagsari AS (1997) Weeds as latent hosts of *Ralstonia solanacearum* in highland Uganda: Implication for lowland potato bacterial wilt control. In: Sond International Wilt Symposium Guadeloupe-Antilles Françaises.

van der Wolf JM, Vriend SGC, Kastelein P, Nijhuis EH, van Bekkum PJ, van Vuurde JW (2000) Immunofluorescence colony-staining (IFC) for detection and quantification of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* biovar 2 (race 3) in soil and verification of positive results by PCR and dilution plating. European Journal of Plant Pathology 106:123-133.

van Elsas JD, Kastelein P, Vries PM de, van Overbeek LS (2001) Effects of ecological

factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. Canadian Journal of Microbiology 47:842-854.

van Elsas JD, Kastelein P, van Bekkum P, van der Wolf JM, de Vries PM, van Overbeek LS (2000) Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. Phytopathology 90:1358-1366.

van Overbeek LS, Bergervoet JHW, Jacobs FHH, van Elsas JD (2004) The low-temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2. Phytopathology 94:463-469.

Vasse J, Frey P, Trigalet A (1995) Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. Molecular Plant-Microbe Interaction 8:241-251.

Wakimoto S, Utatsu I, Matsuo N, Hayashi N (1982) Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in pure water. Annals of the Phytopathological Society of Japan 48:620-627.

Wang WY (1992) Survey of *Eucalyptus* disease in Taiwan. Bulletin Taiwan Forest Research Institute 7:179-194.

Wu QP, Liang ZC (1988) Identification and pathogenic tests of the causal organism of the bacterial wilt of *Eucalyptus*. Journal of South China Agriculture University 9:59-67.

Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiology and Immunology 39:897-904.

Yadessa GB, van Bruggen AHC, Ocho FL (2010) Effects of different soil amendments on bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and on the yield of tomato. *Journal of Plant Pathology* 92:439-450

Yu JQ (1999) Allelopathic suppression of *Pseudomonas solanacearum* infection of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in a tomato-chinese chive (*Allium tuberosum*) intercropping system. *Journal of Chemical Ecology* 25:2409-2417.

Zhou XD, Xie YJ, Chen SF, Wingfield MJ (2008) Diseases of eucalypt plantations in China: challenges and opportunities. *Reviews, Critiques and New Technologies: Fungal Diversity* 32:1-7.

OBJETIVOS

- (1) Caracterizar isolados da biovar 2 de *Ralstonia solanacearum*, relatados pela primeira vez causando murcha em cultivo de campo do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, no município de Alexânia - Goiás;
- (2) Realizar a prospecção de bactérias “extremófilas facultativas”, em cinco diferentes tipos de solos da Fazenda Água Limpa, da Universidade de Brasília, com potencial no controle da **R3bv2T** de *Ralstonia solanacearum*,
- (3) Estudar a interação entre *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T** e cinco diferentes tipos de solos no desenvolvimento de miniestacas do híbrido “urograndis”;
- (4) Avaliar a suscetibilidade de dezessete espécies de *Eucalyptus* a **R3bv2T** de *Ralstonia solanacearum*, através de testes de microbiolização *in vitro* de sementes;
- (5) Avaliar bactérias “extremófilas facultativas” na promoção de crescimento do híbrido “urograndis” a partir de sementes.

CAPÍTULO 1

Caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* da biovar 2 relatados em *Eucalyptus* “urograndis”

RESUMO

A murcha bacteriana do eucalipto em infecção natural ocorre devido à biovar 1 (Brasil) e 3 (demais países). Entretanto, a biovar 2 foi descrita em 2009 causando murcha em um plantio jovem do híbrido “urograndis” no município de Alexânia - GO. A caracterização dos sete isolados obtidos envolveu o uso de testes bioquímicos, além da avaliação da gama de hospedeiras e identificação por PCR com oligonucleotídeos iniciadores para espécie, biovar e filótipo. Os testes de utilização de carboidratos indicaram tratar-se da biovar 2T. A partir das inoculações artificiais foi possível a reprodução de sintomas e recuperação da bactéria nas seguintes espécies: eucalipto, batata, berinjela, tomate, datura, nabo, gerânio, girassol, beterraba, capuchinha, feijão, mostarda, cravo-de-defunto, moringa e caju. O DNA de todos os isolados foi amplificado pela PCR, exceto os oligonucleotídeos iniciadores para biovar 2 que geraram amplicons para cinco dos oito isolados da biovar 2. As PCRs para identificação do filótipo geraram produtos de 372 pb, correspondendo ao filótipo II. A identificação de uma terceira biovar infectando naturalmente eucalipto confirma a adaptabilidade de *R. solanacearum* a novas hospedeiras.

Palavras-chave: murcha bacteriana, hospedeiras, biovar 2T, filótipo II.

Characterization of isolates of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 reported in *Eucalyptus* “urograndis”

ABSTRACT

Natural infection of bacterial wilt takes place due to biovar 1 (Brazil) and 3 (other countries). However, biovar 2 was described in Brazil in 2009 causing wilt in young plants in the country of Alexânia, State of Goiás. The characterization of seven isolates involved the use of biochemical tests, as well as evaluation of various host range and identification by PCR with primers to species, biovar and phylotype. Carbohydrate utilization testes revealed that the isolates belonged to biovar 2T. From artificial inoculations it was possible to reproduce symptoms and recover the bacterium from: eucalyptus, potato, tomato, eggplant, datura, geranium, turnip, mustard, nasturtium, beetroot, sunflower, bean, French marigold, horseradish tree, and cashew. Specific primers amplified DNA of all isolates except for those specific to the biovar 2 which generated amplicons with five of the eight tested isolates from biovar 2. PCR assays for identification of the phylotype generated 372 bp products, corresponding to phylotype II. The Identification of a third biovar naturally infecting eucalyptus confirms that *R. solanacearum* is highly adaptable to new hosts.

Keywords: bacterial wilt, hosts, biovar 2T, phylotype II.

INTRODUÇÃO

O cultivo de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) no Brasil tem se intensificado nos últimos anos e a produção tem sido capaz de suprir a demanda por matéria-prima do país. Do total absoluto de florestas brasileiras plantadas, 63% é com eucalipto (SBS, 2008). O plantio se concentra nas regiões Sul e Sudeste, sendo o Estado de Minas Gerais o que participa com maior parte da área cultivada (ABRAF, 2009).

A murcha bacteriana do eucalipto tem como agente causal *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896); (Yabuuchi et al., 1995). A bactéria é classificada em cinco raças, de acordo com a gama de hospedeiros (Buddenhagen & Kelman, 1964) e em cinco biovars, através de testes bioquímicos de acordo com a utilização de determinados carboidratos (Hayward, 1964). Raças e biovars são grupos informais ao nível infra subespecífico não governados pelo Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (Lapage et al., 1992).

Fegan & Prior (2005) propuseram uma classificação baseada em novos níveis taxonômicos: o filótipo é um grupo monofilético identificado por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) multiplex baseado na variação existente na região ITS (*Internal Transcribed Spacer*); os níveis infra subespecíficos são chamados de *sequevar* identificados pela análise da seqüência de genes da endoglucanase. Essa classificação tem uma maior relevância filogenética, pois é mais estável com o tempo. A abordagem da classificação em filótipos mostra certa tendência de divisão em regiões geográficas. O filótipo II inclui as biovars 1 e 2T (América).

Ralstonia solanacearum afeta mais de 200 espécies distribuídas em 50 famílias botânicas (Hayward, 1994). Sua gama de hospedeiras tem sido estudada com base na observação dos sintomas no campo, posterior isolamento e cumprimento dos Postulados de Koch (Álvarez et al., 2008). Este tipo de estudo é importante para programas de controle que envolve a rotação de culturas e eliminação de plantas daninhas (Miranda et al., 2004).

A Raça 3 biovar 2 (**R3bv2**), conhecida como “raça da batata” apresenta uma gama de hospedeiras naturais limitada, encontrada em batata (*Solanum tuberosum* L.) e ocasionalmente em tomate (*Solanum lycopersicum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). Prevalece nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Não obstante, ocorre também em áreas com temperaturas amenas de regiões mais quentes, como na região Nordeste do Brasil (Lopes, 2009).

A gama de hospedeiras da **R3bv2** permanece confusa, entretanto mais de 60 plantas entre solanáceas e não solanáceas, cultivadas ou não, já foram relatadas como hospedeiras, seja naturalmente ou por infecção artificial (Janse et al., 2004). A interação de *R. solanacearum* com o sistema radicular de plantas daninhas é pouco conhecida. Há plantas que exibem sintomas típicos de murcha, mas também há as que permanecem assintomáticas (Hayward, 1994; Tussime et al., 1997).

Relatos de murcha bacteriana em espécies arbóreas são limitados ou mal esclarecidos. Plantas tais como: neem (*Azadirachta indica* A. Juss.), casuarina (*Casuarina equisetifolia* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), pinha (*Annona squamosa* L.), teca (*Tectona grandis* L.), jambo (*Eugenia javanica* L.), foram descritos em vários países, com sintomas incitados por diferentes biovars de *R. solanacearum* (Supriadi et al., 2001).

O primeiro relato da doença em eucalipto no Brasil foi em 1980, por Sudo et al. (1983) no Estado de Minas Gerais, ocorrendo também nos Estados da Bahia, Pará e Santa Catarina. Todos os relatos pertenciam a biovar 1 na América e 3 na Ásia, Oceania e África, sendo que mais recentemente Marques et al. (2009) relataram a biovar 2 em plantios jovens, do híbrido “urograndis”, no município de Alexânia - GO.

A doença, causada pela biovar 1, foi responsável por elevadas perdas principalmente em viveiros dos Estados da Bahia, Minas Gerais e do Pará, devido ao descarte de mudas contaminadas. Como o sistema de produção de clones de eucalipto é altamente favorável à multiplicação bacteriana e diante da falta de conhecimento sobre a resistência genética e de estratégias de controle da doença, é essencial evitar a introdução do patógeno em viveiros (Alfenas et al., 2006).

Diante do exposto, foi objetivo deste trabalho: caracterizar diferentes isolados de *R. solanacearum* da biovar 2 obtidos de plantas do híbrido “urograndis” de eucalipto, coletados no município de Alexânia - Goiás, em fevereiro de 2009.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das amostras vegetais: local de coleta e isolados bacterianos

A área, localizada no município de Alexânia – Goiás (latitude 16,00’ S e longitude 48,26’ O, aproximado), apresentava aproximadamente dezessete hectares com

eucalipto. Originalmente de cerrado nativo a área foi recém-desmatada, possuindo relevo montanhoso e solo do tipo latossolo amarelo, argilo-arenoso intemperizado, mas ainda com grande quantidade de cascalho. A plantação, oriunda de estaquia, do híbrido de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake x *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden (“urograndis”) exibia falta de uniformidade no crescimento e altura média de aproximadamente 70 cm, sendo que grande parte das plantas já mostravam sintoma de murcha avançada e em alguns casos, morte.

Desta área, foram coletadas amostras de ramos com sintomas de murcha bacteriana, no mês de fevereiro de 2009. No Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, procedeu-se à análise das amostras.

Isolamento – Cultivo e preservação

Segmentos do caule das plantas foram imersas em álcool 70% (30 s), hipoclorito de sódio a 1% (3 min) e lavadas duas vezes com água destilada estéril. Em seguida, em condições assépticas, foram triturados com almofariz e pistilo. Com uma alça de platina realizou-se o plaqueamento em meio 523 (Kado & Heskett, 1970). Após 48 h de incubação, colônias individualizadas foram transferidas para meio Kelman (1954), contendo tetrazólio e posteriormente preservadas em água destilada esterilizada, em tubos (10 mL) de tampa rosqueada.

Caracterização bioquímica

Colônias puras, provenientes de colônias isoladas, foram submetidas aos seguintes testes: Gram, catalase, O/F (oxidação e fermentação da glicose), produção de pigmentos fluorescentes em meio B de King e determinação da biovar: maltose, lactose, celobiose, dulcitol, manitol, sorbitol, trealose e inositol, para caracterização da biovar. Como padrão para biovar foram utilizadas as estirpes UnB 575 (R1bv1), UnB 1018 (R3bv2) e UnB 1173 (R1bv1) de *R. solanacearum* (**Tabela 1**).

Reação de hipersensibilidade e teste de patogenicidade

Reação de hipersensibilidade (RH) foi realizada em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* L. ‘Havana 425’) e o teste de patogenicidade foi realizado em mudas de batata (cv. Achat) e miniestacas de “urograndis”, com todos os sete isolados obtidos e com a estirpe UnB 1173, pertencente a R1bv1(**Tabela 1**).

Para reação de hipersensibilidade todos os isolados foram inicialmente crescidos em meio Kelman (Kelman, 1954). Após incubação a 28 °C, por 48 h selecionou-se as colônias virulentas. Posteriormente foi preparada uma suspensão bacteriana de aproximadamente 10×10^8 UFC/mL (Escala 7 de McFarland). Com o auxílio de uma seringa hipodérmica, sem agulha, as folhas de fumo foram infiltradas na parte abaxial. Necrose localizada na área infiltrada foi observada 12-24 h após a inoculação.

No teste de patogenicidade em mudas de batata e em miniestacas de eucalipto empregou-se o mesmo crescimento bacteriano anterior para tocar agulhas de seringa hipodérmica, que foram utilizadas para ferir a axila do primeiro par de folhas das plantas. Foram utilizadas 15 repetições de cada espécie de planta, sendo 10 inoculadas com a bactéria e 5 como testemunha. Teste via solo foi realizado para eucalipto, onde 50 mL da suspensão bacteriana de 10^9 UFC/mL foi distribuída no solo, logo após ferimentos serem provocados nas raízes, utilizando uma faca de mesa pontiaguda. Miniestacas, também com ferimentos provocados nas raízes e inoculadas apenas com água destilada esterilizada, foram utilizadas como controle. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a 28 °C. Em seguida, foram observados os sintomas de infecção pela bactéria, tais como: amarelecimento, clorose, arroxamento e lesões aquosas nas folhas, escurecimento de vasos e tecidos e murcha, em seguida, procedeu-se o reisolamento em meio de cultivo 523 (Kado & Heskett, 1970).

Identificação por PCR

Extração e quantificação do DNA genômico

A purificação do DNA total do genoma bacteriano foi realizada com o auxílio do kit Wizard[®] Genomic DNA Purifications (Promega Madison, WI).

A quantificação foi realizada com base na análise comparativa da intensidade das bandas das amostras com o marcador High DNA Mass Ladder (GIBCO – BRL),

por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8 % preparado em tampão 0,5 X TBE (5,4 g de Trisbase, 2,75 g de ácido bórico e 0,375 g de EDTA para 1000 ml), onde 5 µl do DNA genômico foram misturados a 1 µl do tampão de carregamento 10 X (50 % de glicerol, 1 mM EDTA; 0,4 % Bromophenol blue e 0,4 % de Xylene cyanol). As amostras foram submetidas a uma corrente de 80 V por 1 h, seguido da coloração com brometo de etídio (0,5 µg/ml), descoloração em água destilada e posterior fotodocumentação em sistema LPix, Loccus[®]. Após a quantificação foram preparadas alíquotas de trabalho em uma concentração final de 10 ng/µl de DNA.

Identificação com oligonucleotídeos iniciadores para espécie

A partir do DNA purificado amplificou-se um fragmento do rDNA da região 16S por PCR, utilizando os oligos iniciadores: **PS-1** (5' AGT CGA ACG GCA GCG GGG G 3') e **PS-2** (5' GGG GAT TTC ACA TCG GTC TTG CA 3'), que se anelam com sequências específicas para *R. solanacearum* (Patrik & Maiss, 2000). As reações foram realizadas para um volume final de 25 µL; contendo: 1 X tampão da *Taq* polimerase (100 mM Tris-HCL pH 8,5; 500 mM de KCl); 1,5 mM MgCl₂; 0,1 mM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 0,2 µM de cada um dos oligonucleotídeos; 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase; 30 ng do DNA alvo e água destilada passada através de um sistema de água Milli-Q (Milli-poro, Bedford, MS). As amostras foram submetidas à amplificação em termociclador PT – 100TM (MJ Research, Watertown, Mass), sendo inicialmente aquecidas a 95 °C por 5 min, posteriormente submetidas a 35 ciclos de 95 °C por 30 s para desnaturação, 30 s a 68 °C para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72 °C por 45 s para extensão e extensão final a 72 °C por 5 min. Como controles positivos foram utilizados o DNA purificado das estirpes UnB 575 (R1bv1), UnB 1018 (R3bv2) e UnB 1173 (R1bv1) de *R. solanaceraum* (**Tabela 1**), como controle negativo água esterelizada. Os produtos da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose a 2%. A eletroforese foi realizada a 85 V durante 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml), descorado em água destilada, descorado e fotografado em sistema LPix, Loccus[®]. O marcador utilizado foi o 100 pb DNA – Ladder[®] (Promega Madison, WI).

Identificação com oligonucleotídeos iniciadores para Raça 3 biovar 2

Foram utilizados os oligos **630** (5' ATA CAG AAT TCG ACC GGC AC 3') e **631** (5' ATA CAG AAT TCG ACC GGC AC 3') baseados em sequência de um fago, a partir do DNA genômico (Fegan et al., 1998). A reação foi realizada para um volume final de 25 µL, contendo: 1 X tampão da *Taq* polimerase (100 mM Tris-HCL pH 8,5, 500 mM de KCl); 1,5 mM MgCl₂; 0,25 mM de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 6 µM de cada um dos oligonucleotídeos; 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase; 30 ng do DNA alvo e água Milli-Q (Milli-poro, Bedford, MS). As amostras foram submetidas à amplificação em termociclador PT – 100TM (MJ Research, Watertown, Mass). A temperatura de desnaturação inicial foi de 96 °C por 10 min, seguida de 30 ciclos de: 94 °C por 15 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, com extensão final a 72 °C durante 10 min. Como controle positivo foi utilizada a estirpe UnB 1018 (R3bv2) e como controles negativos foram utilizados o DNA purificado das estirpes da R1bv1 UnB 575, UnB 1173 (**Tabela 1**) e água estéril. Os produtos da PCR foram observados da mesma forma descrita anteriormente e fotodocumentados.

Identificação do filótipo dos isolados de *Ralstonia solanacearum*

Os *primers* específicos para cada filótipo utilizados foram: I: **Nmult:21:1F** (5' CGT TGA TGA GGC GCG CAA TTT 3'); II: **Nmult:21:2F** (5' AAG TTA TGG ACG GTG GAA GTC 3'); III: **Nmult:23:AF** (5' ATT ACC AGA GCA ATC GAA AGA TT 3'); IV: **Nmult:22:InF** (5' ATT GCC AAG ACG AGA GAA GTA 3') e o oligo reverso conservado: **Nmult:22:RR** (5' TCG CTT GAC CCT ATA ACG AGT A 3') que tem como região alvo a região espaçadora intergênica (ITS) entre as sequências 16S e 23S (Fegan & Prior, 2005). A PCR multiplex continha: tampão 1 X da *Taq* polimerase (100 mM Tris-HCL pH 8,5, 500 mM de KCl); 1,25 mM MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 0,4 µM de cada um dos oligonucleotídeos; 2 U da enzima *Taq* DNA polimerase; 30 ng de DNA molde e água Milli-Q (Milli-poro, Bedford, MS). As amostras foram submetidas à amplificação em termociclador PT – 100TM (MJ Research, Watertown, Mass). A temperatura de desnaturação inicial foi de 96 °C por 5 min, 30 ciclos de: 95 °C por 15 s, 59 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, seguido de uma extensão final a 72 °C por 10 min. Como controle negativo foi utilizada água estéril. Os produtos da PCR foram

observados da mesma forma descrita anteriormente e fotodocumentados.

Teste de hospedeiras

Vinte e cinco espécies de plantas (**Tabela 2**) foram selecionadas para o teste de suscetibilidade, a três dos sete isolados (UnB 1359, UnB 1360 e UnB 1364), de modo que representassem hospedeiras já relatadas da bactéria entre espécies cultivadas, arbóreas e plantas daninhas. A forma de realização do teste foi a mesma descrita anteriormente para o teste de patogenicidade em batata e eucalipto, por picada de agulha no primeiro par de folhas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a 28 °C. Em seguida, procedeu-se a avaliação dos sintomas e reisolamento em meio de cultivo.

RESULTADOS

Testes bioquímicos e de patogenicidade

As plantas de eucalipto, do campo de onde foram retiradas as amostras, apresentavam sintomas de murcha, (**Figura 1A**) e mostraram intenso fluxo bacteriano no “teste de copo” (**Figura 1B**). Dos ramos de diferentes plantas foram obtidos 7 isolados bacterianos, que apresentaram colônias brancas, lisas, fluidas, irregularmente arredondadas e opacas. Em meio Kelman (1954), contendo tetrazólio, as colônias virulentas apresentaram centro avermelhado e bordas brancas, enquanto as avirulentas foram totalmente vermelhas (**Figura 1C**). Reação de Gram foi negativa, não houve produção de pigmentos fluorescentes e todos os isolados foram catalase positivos. No teste de oxidação ou fermentação da glicose, todos mostraram-se oxidativos. Não produziram álcool a partir de dulcitol, sorbitol e manitol, entretanto utilizaram celobiose, maltose, lactose, trealose e inositol, indicando que os sete isolados são pertencentes ao fenótipo 2T da biovar (**Tabela 1**).

A reação de hipersensibilidade em folhas de fumo (**Figura 1D**) ocorreu a partir de 12 h da infiltração e a murcha em batata (**Figura 1E**) após 5 dias da inoculação, onde também foi possível observar intenso fluxo bacteriano do caule (**Figura 1F**).

No teste de patogenicidade em eucalipto, através da inoculação de suspensão bacteriana via solo, o aparecimento de sintomas foi lento, uma vez que as miniestacas eram mais velhas, medindo aproximadamente 20 cm, mas ainda assim, foi possível observar sintomas de desfolha, arroxamento das folhas (**Figura 1G**), sintoma em “V” invertido (**Figura 1H**), escurecimento do lenho (**Figura 1I**) e após nove meses foi possível reisolar a bactéria em meio de cultura. No método de picada com agulha os sintomas apareceram mais precocemente, sendo que após o vigésimo oitavo dia já foram observados sintomas de mancha em “V” invertido e após dois meses perda de turgidez nas folhas e arroxamento de copa. A estirpe UnB 1173 de tomate (**Tabela 1**), também foi capaz de induzir sintomas em plantas de eucalipto. Entretanto, após as inoculações artificiais não foi possível observar fluxo bacteriano a partir dos ramos de eucalipto.

TABELA 1 - Caracterização bioquímica e molecular dos isolados de *Ralstonia solanacearum* utilizados neste estudo.

Estirpe	Hospedeira	Origem	Ano de Coleta	Raça	Biovar	RH fumo	TP	PCR PS1/PS2	PCR 630/630	PCR Filótipo
UnB 1359	“urograndis”	Alexânia-GO	2009	3	2T	+	+	+	+	II
UnB 1360	“urograndis”	Alexânia-GO	2009	3	2T	+	+	+	-	II
UnB 1361	“urograndis”	Alexânia-GO	2009	3	2T	+	+	+	-	II
UnB 1362	“urograndis”	Alexânia-GO	2009	3	2T	+	+	+	-	II
UnB 1363	“urograndis”	Alexânia-GO	2009	3	2T	+	+	+	+	II
UnB 1364	“urograndis”	Alexânia-GO	2009	3	2T	+	+	+	+	II
UnB 1365	“urograndis”	Alexânia-GO	2009	3	2T	+	+	+	+	II
UnB 1018	<i>Solanum tuberosum</i>	Araucária-PR	1978	3	2	+	ND	+	+	II
UnB 575	<i>E. urophylla</i>	Monte Dourado-PA	1985	1	1	+	+	+	-	II
UnB 1173	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pipiripau-DF	1998	1	1	+	+	+	-	II

RH: reação de hipersensibilidade; TP: Teste de patogenicidade ao híbrido de eucalipto “urograndis”; PCR: reação em cadeia da polimerase; PS1/PS2: Oligos para espécie; 630/631: oligos para biovar 2; ND: Não determinado e (+) resultados positivos, (-) resultados negativos, nos respectivos testes.

TABELA 2 - Suscetibilidade de diferentes espécies de plantas à Raça 3 biovar 2T de *Ralstonia solanacearum*, oriunda de eucalipto

Espécies de Plantas Testadas	Família	TP
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	Solanaceae	+
Berinjela (<i>Solanum melongena</i> L.)	Solanaceae	+
Datura (<i>Datura stramonium</i> L.)	Solanaceae	+
Gerânio (<i>Pelargonium hortorum</i> L.)	Geraniaceae	+
Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Leguminosae	+
Leucena (<i>Leucaena glauca</i> Benth.)	Leguminosae	-
Beterraba (<i>Beta vulgaris</i> L.)	Chenopodiaceae	+
Beldroega (<i>Portulaca oleracea</i> L.)	Portulacaceae	-
Abobrinha (<i>Cucurbita pepo</i> L.)	Cucurbitaceae	-
Capuchinha (<i>Trapaolum majus</i> L.)	Trapaeolaceae	+
Nabo (<i>Raphanus sativus</i> L.)	Brassicaceae	+
Mostarda (<i>Brassica juncea</i> L.)	Brassicaceae	+
Batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i> L.)	Convolvulaceae	-
Sálvia (<i>Salvia officinalis</i> L.)	Lamiaceae	-
Cravo-de-defunto (<i>Tagetes patula</i> L.)	Asteraceae	+
Girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	Asteraceae	+
Jambo-roxo (<i>Eugenia javanica</i> Lam.)	Myrtaceae	-
Goiaba (<i>Psidium guajava</i> L.)	Myrtaceae	-
Cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)	Myrtaceae	-
Neem (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.)	Meliaceae	-
Amora (<i>Morus alba</i> L.)	Moraceae	-
Cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	Anacardiaceae	+
Pinha (<i>Annona squamosa</i> L.)	Annonaceae	-
Moringa (<i>Moringa oleifera</i> Lam.)	Moringaceae	+
Teca (<i>Tectona grandis</i> L.)	Verbenaceae	-

TP: Reação da hospedeira após inculação dos isolados da **R3bv2T**, por picada de agulha no primeiro par de folhas das plantas, observação dos sintomas e reisolamento em meio de cultivo. (+) resultado positivo e (-) resultado negativo no teste.

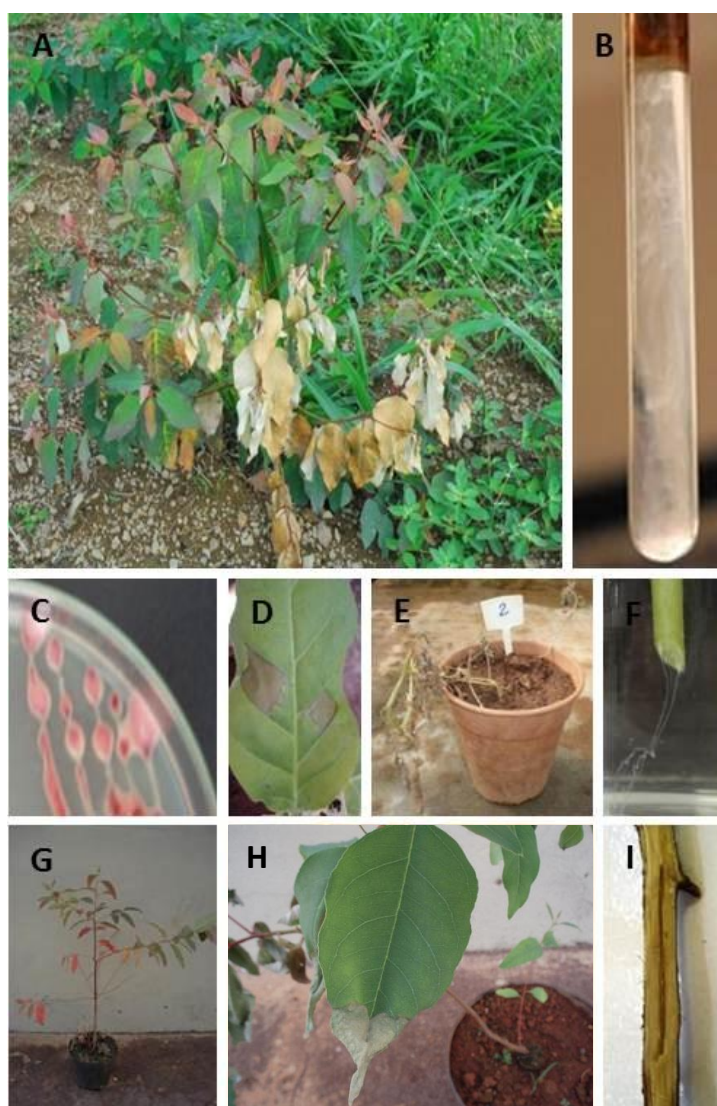


FIGURA 1 - **A.** Planta de “urograndis” com sintoma de murcha no campo do qual foram coletadas amostras utilizadas neste trabalho; **B.** fluxo bacteriano observado logo após a coleta das amostras; **C.** colônias virulentas, com bordos brancas e centro avermelhado de *Raltonia solanacearum*, obtidas a partir dos isolamentos, em meio Kelman com tetrazólio. **D.** reação de hipersensibilidade em folhas de fumo 12 h após a inoculação, com a estirpe UnB 1364. **E.** teste de patogenicidade em planta de batata (cv. Achat) inoculada com a estirpe UnB 1359, mostrando murcha severa; **F.** fluxo bacteriano em batata. **G.** planta de “urograndis” nove meses após início do teste de patogenicidade (via solo) exibindo desfolha e arroxejamento das folhas; **H.** sintoma de mancha em “V” invertido e **I.** corte longitudinal do ramo de eucalipto, mostrando escurecimento do lenho.

Identificação dos isolados de Ralstonia solanacearum por PCR

A amplificação com os oligos para a espécie *R. solanacearum* (**Figura 2**) baseados no gene 16S rRNA gerou um fragmento de aproximadamente 553 pb para todos os isolados testados.

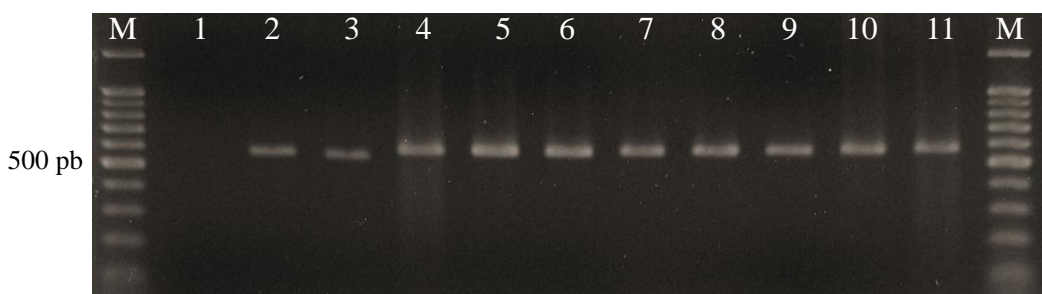


FIGURA 2 - Amplificação de fragmentos de aproximadamente 553 pb gerados pelos oligos **PS-1/PS-2** referentes ao gene da região 16S do rRNA, a partir do DNA purificado dos isolados de *Ralstonia solanacearum*: **M.** Marcador de 100 pb (Promega®); **1.** Controle negativo (água estéril); **2.** UnB 575 (R1bv1, eucalipto); **3.** UnB 1018 (R3bv2, batata); **4.** UnB 1173 (R1bv1, tomate). Estirpes deste estudo da R3bv2T: **5.** UnB 1359, **6.** UnB 1360, **7.** UnB 1361, **8.** UnB 1362, **9.** UnB 1363, **10.** UnB 1364 e **11.** UnB 1365.

Inicialmente, nas PCRs realizadas com os oligos para a biovar 2 da bactéria, os isolados UnB 1359, UnB 1361, UnB 1363, UnB 1364 e 1365 da R3bv2T de eucalipto e o isolado UnB 1018 R3bv2 de batata, amplificaram um fragmento de aproximadamente 308 pb nas condições especificadas por Fegan & Prior (2005). Além das condições citadas, foram realizados ajustes na temperatura de anelamento na tentativa de amplificação dos isolados que tiveram resultados negativos da R3bv2T (UnB 1360, UnB 1361 e UnB 1362), testando-se 55, 50 e 45 °C e também com 1U da enzima *Taq* DNA polimerase. Entretanto, não foi observado o fragmento esperado nestes isolados, somente bandas inespecíficas (dados não mostrados).

Nas ampliações para determinação do filótipo (**Figura 3**) foram observados fragmentos de aproximadamente 372 pb para todos os isolados testados, que correspondem ao filótipo II.

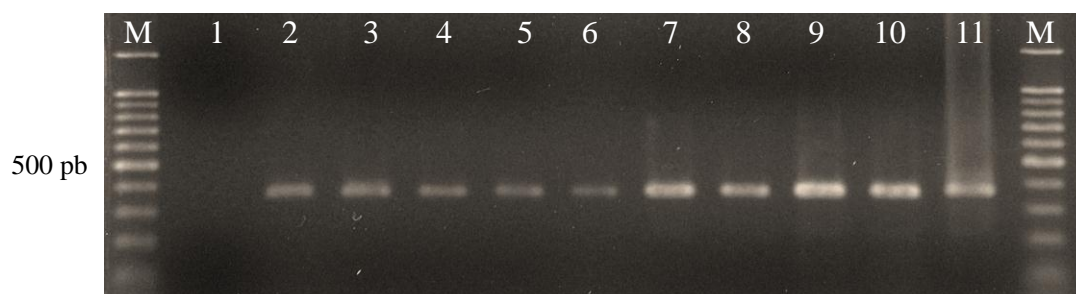


FIGURA 3 - Perfis da amplificação da PCR multiplex mostrando fragmentos de aproximadamente 372 pb gerados pelos oligos para filótipo a partir do DNA purificado dos isolados de *Ralstonia solanacearum*: **M.** Marcador de 100 pb (Promega®); **1.** Controle negativo (água estéril); **2.** UnB 575 (R1bv1, eucalipto); **3.** UnB 1018 (R3bv2, batata); **4.** UnB 1173 (R1bv1, tomate). Estirpes deste estudo da R3bv2T: **5.** UnB 1359, **6.** UnB 1360, **7.** UnB 1361, **8.** UnB 1362, **9.** UnB 1363, **10.** UnB 1364 e **11.** UnB 1365.

Teste de hospedeiras

No teste de hospedeiras, 13 das 25 espécies testadas mostraram algum sintoma de infecção pela bactéria, sendo possível reisolá-la dos ramos infectados, em meio de cultivo 523 (Kado & Heskett, 1970). Foram elas: tomate, berinjela, datura, gerânio, girassol, beterraba, feijão, capuchinha, nabo, mostarda, moringa, cajueiro e cravo-de-defunto (**Tabela 2**).

As três espécies pertencentes à família Solanaceae murcharam rapidamente entre o terceiro e décimo nono dias após a inoculação e exibiram forte fluxo bacteriano a partir dos ramos, exceto datura que não produziu fluxo. Plantas de tomate exibiram forte murcha, supercrescimento (**Figura 4A**), fluxo bacteriano (**Figura 4B**) e formação de raízes adventícias (**Figura 4C**), após terceiro dia de inoculadas. As mudas de berinjela também exibiram murcha (**Figura 4D**) e fluxo (**Figura 4E**), após

o décimo nono dia. As plantas de datura murcharam (**Figura 4F**) e exibiram necrose nas folhas (**Figura 4G**) e necrose apical (**Figura 4H**) após o vigésimo segundo dia de inoculadas.

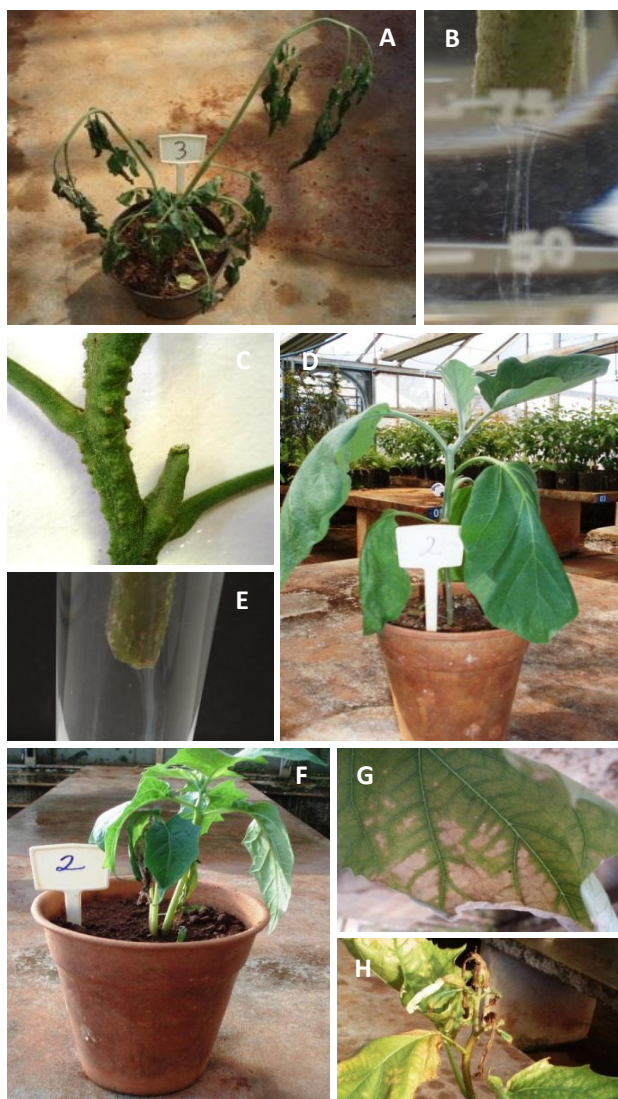


FIGURA 4 - Patogenicidade de *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, isolada de eucalipto, em tomate (A-C), berinjela (D e E) e datura (F-H). **A.** inoculação com a estirpe UnB 1360, induzindo murcha e superbrotamento, **B.** fluxo bacteriano e **C.** formação de raíz adventícia; **D.** plantas de berinjela mostrando murcha e **E.** fluxo; **F.** murcha em planta inoculada com isolado UnB 1359, **G.** necrose nas bordas e limbo foliar e **H.** necrose apical.

Plantas de gerânio também mostraram sintoma típico de murcha, amarelecimento e necrose das folhas (**Figura 5A**), além de sinais de forte exsudação

de pus bacteriano (**Figura 5B**) e escurecimento dos vasos e tecidos (**Figura 5C**) quando observado o corte longitudinal dos ramos, após o vigésimo dia de inoculadas. Em plantas de feijão foi possível observar clorose nas folhas junto às nervuras (**Figura 5D**), amarelecimento generalizado da planta (**Figura 5E**) e quando realizado o isolamento das hastes inoculadas, foi possível recuperar altas concentrações da bactéria (**Figura 5F**), após o trigésimo quinto dia da inoculação.

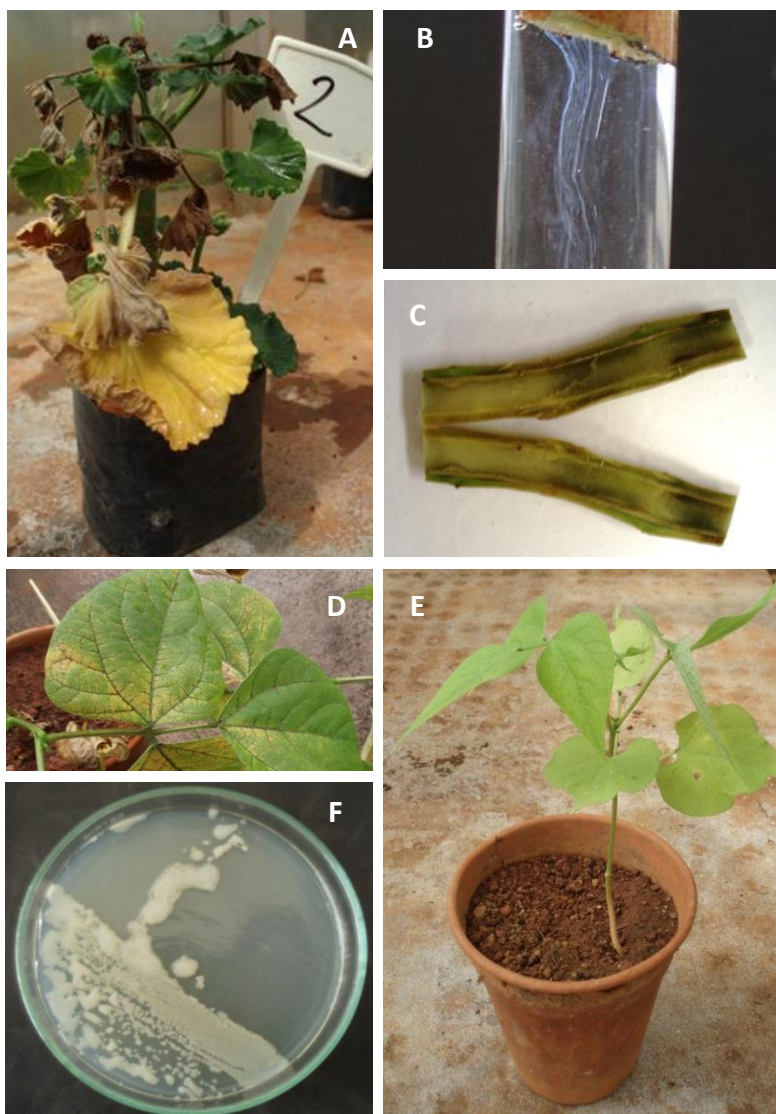


FIGURA 5 - Patogenicidade de *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, isolada de eucalipto, em gerânio (A-D) e feijão (E-F). **A.** sintomas de necrose, amarelecimento e murcha incitados pela estirpes UnB 1359, **B.** fluxo bacteriano, **C.** corte longitudinal do caule mostrando escurecimento de vasos e tecidos; **D.** clorose internerval nas folhas, **E.** sintoma de amarelecimento e **F.** crescimento bacteriano recuperado de plantas inoculadas.

Girassol apresentou amarelecimento, superbrotamento de ramos laterais, redução do crescimento (**Figura 6A**), murcha (**Figura 6B**) e necrose nos bordos das folhas (**Figura 6C**), sendo que após a floração (quinquagésimo dia aproximadamente) foi realizado o reisolamento. Plantas de beterraba apresentaram arroxamento, necrose e murcha das folhas (**Figura 6D**) e morte após forte necrose dos tecidos (**Figura 6E**), após o décimo quinto de inoculada, após o trigésimo dia observou-se murcha e foi realizado o reisolamento.



FIGURA 6 - Patogenicidade de *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, isolada de eucalipto, em girassol (A-C) e beterraba (D e E). **A.** plantas de girassol exibindo redução no crescimento (planta inoculada a esquerda) e planta controle (a direita) e superbrotamento de ramos laterais; **B.** perda de turgidez e **C.** lesões encharcadas nas folhas e amarelecimento. **D.** planta controle (à esquerda) e planta inoculada exibindo murcha avançada e arroxamento das folhas e **E.** murcha severa em beterraba.

A partir da inoculação de plantas de nabo também foi possível observar fluxo bacteriano, amarelecimento, murcha permanente, (**Figura 7A**) e escurecimento no lenho quando a raiz foi cortada longitudinalmente (**Figura 7B**), além disso, a bactéria foi reisolada em meio de cultivo (**Figura 7C**). Mostarda lisa pertencente à mesma família do nabo (*Brassicaceae*) e exibiu diminuição do crescimento e murcha (**Figura 7D**), lesões nos bordos e limbo foliar (**Figura 7E**), escurecimento vascular e podridão do caule (**Figura 7F**). Em ambas as brássicas, o reisolamento se deu após o trigésimo quinto dia de inoculação da bactéria nas plantas.



FIGURA 7 - Patogenicidade de *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, isolada de eucalipto, em nabo (A-C) e mostarda lisa (D-F). **A.** murcha avançada em planta inoculada de nabo (direita) e controle (esquerda); **B.** corte longitudinal em raiz de nabo mostrando escurecimento dos tecidos; **C.** bactéria reisolada em meio 523. **D.** planta controle de mostarda a esquerda e inoculada com isolado UnB 1359 a direita, exibindo diminuição do crescimento e murcha; **E.** detalhe da folha de planta inoculada com lesões nos bordos e limbo foliar e **F.** corte longitudinal do caule com escurecimento dos vasos e tecidos.

As mudas de cravo-de-defunto perderam a turgidez nas folhas já no segundo dia de inoculadas. Posteriormente, mostraram redução de crescimento quando comparada ao controle (**Figura 8A**) e necrose apical por onde foi feita a inoculação da bactéria (**Figura 8B**). A planta de flores comestíveis, capuchinha (**Figura 8C**) também mostrou diminuição do crescimento (dado não mostrado), amarelecimento (**Figura 8D**), lesões no limbo foliar (**Figura 8E**), murcha (**Figura 8F**) e morte o vigésimo segundo dia de inoculadas.

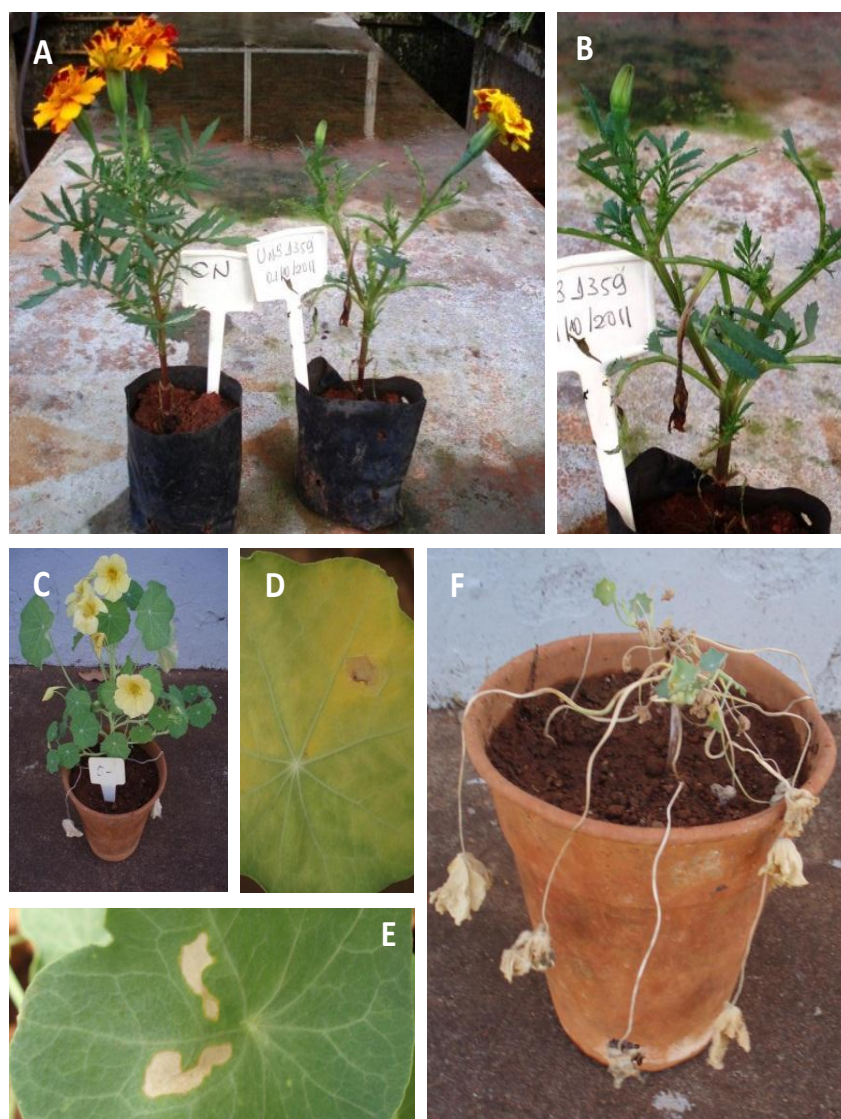


FIGURA 8 - Patogenicidade de *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, isolada de eucalipto, em cravo-de-defunto (A e B) e capuchinha (C-F). **A.** planta controle à esquerda e planta inoculada a direita exibindo redução no crescimento e desfolha e **B.** detalhe da necrose em ramo. **C.** planta controle de capuchinha; **D.** folha de planta inoculada exibindo amarelecimento; **E.** lesões no limbo foliar e **F.** murcha avançada.

Dentre as espécies arbóreas, moringa exibiu diminuição do crescimento (**Figura 9A**), amarelecimento e murcha (**Figura 9B**), além de necrose do ramo inoculado após o trigésimo dia da inoculação (**Figura 9C**). Nas plantas de cajú, após vigésimo dia de inoculadas, observou-se além da morte dos ponteiros, sintomas de superbrotamento de folhas (**Figura 9D**) e de ramos (**Figura 9E**) próximos ao local de inoculação.



FIGURA 9 - Patogenicidade de *Ralstonia solanacearum* R3bv2T, isolada de eucalipto, em moringa (A-C) e cajueiro (D e E). **A.** planta controle a direita e planta inoculada com a estirpe UnB 1359 à esquerda, mostrando diminuição do crescimento, **B.** e **C.** detalhes do amarelecimento e murcha dos ponteiros; **D.** cajueiro com superbrotamento das folhas próximas ao local de inoculação e **E.** supercrescimento de ramo.

Entretanto, mudas de goiabeira mostraram murcha após o 6º dia do início do teste (**Figura 10A**), morte dos ponteiros por onde ocorreram as inoculações (**Figura 10B**) e mancha em “V” invertido nas folhas (**Figura 10C**). Tais plantas voltaram às condições normais após o vigésimo segundo dia. Plantas de beldroega apresentaram redução no crescimento (**Figura 10D**), folhas encarquilhadas (**Figura 10E**) e morreram após necrose dos tecidos (**Figura 10F**). Apesar dos sintomas não foi possível recuperar a bactéria inoculada de nenhuma dessas duas espécies.



FIGURA 10 - Sintomas após inoculação de *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, isolada de eucalipto, em goiaba (A-C) e beldroega (D-F). **A.** muda de goiaba inoculada com a estirpe UnB 1361, exibindo murcha, **B.** morte dos ponteiros onde foi inoculada bactéria por picada de agulha, **C.** mancha em “V” invertido em folha; **D.** planta controle a esquerda e planta inoculada com a estirpe UnB 1359 a direita, exibindo redução no crescimento, **E.** encarquilhamento das folhas e **F.** planta morta, com necrose generalizada. A bactéria não foi reisolada destas plantas.

Plantas de pinha, neem, amora, jambo-roxo, cravo-da-índia, leucena, teca, abobrinha, mostarda, sálvia e batata-doce não foram suscetíveis às estirpes bacterianas de *R. solanacearum* da **R3bv2T**, pois não exibiram sintomas ou sinais de infecção e as tentativas de reisolamento da bactéria inoculada não tiveram sucesso.

DISCUSSÃO

A espécie *Ralstonia solanacearum* é cosmopolita, ocorrendo naturalmente no solo, assim como a murcha do eucalipto que ocorre nos principais países produtores, inclusive na Austrália, Indonésia e ilhas próximas ao centro de origem da planta (Santos et al., 2001). Todos os relatos de *R. solanacearum* nessa arbórea pertencem a biovar 1 na América do Sul e biovar 3 na Ásia, Oceania e África. Entretanto, foi observada recentemente pela primeira vez a infecção natural no campo por estirpes pertencentes à biovar 2, no município de Alexânia - Goiás (Marques et al., 2009). A origem do material propagativo utilizado na propriedade é incerta. As estacas podem ter sido obtidas de viveiros do Estado de Minas Gerais, de forma que não se pode afirmar se a fonte de inóculo foi contaminação da origem ou a ocorrência natural do patógeno no solo da região, pois a área era de cerrado recém-desmatado. Segundo Ferreira (2002), os danos causados pela murcha em eucalipto variam de 30-40% em áreas recém-desmatadas e na área em questão, não foram adotadas medidas de controle levando a quase 80% de morte das plantas.

Os testes bioquímicos mostraram que os isolados de *R. solanacearum*, de eucalipto, foram pertencentes ao fenótipo 2T. Tal fenótipo da biovar ocorre no Brasil e Peru (Hayward, 1994), além da África e Indonésia (Prior & Fegan, 2005; Champoiseae & Jones, 2009). A biovar 2 é predominante em climas amenos nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (Reifschneider & Takatsu, 1985). No Quênia essa biovar causa murcha em tomate e batata em altitudes variando entre 1200 e 2400 m (French, 1965). A temperatura e altitude médias de Alexânia - GO, local onde foram encontradas as plantas com a bacteriose relatada neste estudo, é de 21,3 °C e 1100 m, sendo, portanto, uma região com características propícias ao desenvolvimento da biovar de clima ameno.

Segundo Silveira & Higashi (2003), a evolução de doenças na eucaliptocultura

varia em função do material genético, qualidade do sítio, idade da planta e das condições climáticas da época do ano; está ligada a adaptação genética do patógeno ao material plantado com aumento gradativo do inóculo na região. Soma-se ao fato de que a ocorrência de mudanças na sistemática agrícola e no comércio global de mudas e sementes têm levado ao aparecimento de novas hospedeiras para isolados evasivos de patógenos (Tsuchiya, 2004).

Nos testes de patogenicidade ao eucalipto, tanto na inoculação via picada de agulha, quanto na infecção via ferimento de raízes das miniestacas pelo solo foi possível recuperar a bactéria e observar sintomas típicos da doença. Entretanto, não houve murcha permanente. A natureza lenhosa da planta pode explicar a baixa frequência de murcha, que ocorre em geral em mudas pequenas com sistema radicular afetado. Além disso, a doença apresenta um progresso lento e somente sob determinadas condições ambientais e de predisposição do hospedeiro haveria um aumento da colonização dos tecidos e expressão de sintomas severos (Alfenas et al., 2006). Existe uma diferença de sintomas em minicepas e plantas no campo. Nas minicepas ocorre perda de turgidez foliar, mas raramente ocorre o ponto de murcha permanente, como ocorre com plantas jovens suscetíveis no campo (Mafia, 2006). Isso pode explicar o fato de que miniestacas mais velhas inoculadas via raiz, levaram quase nove meses para expressar sintomas em casa de vegetação e para ser possível reisolar a bactéria. Além disso, segundo Supriadi et al. (2001), existem dois tipos da enfermidade: a aguda que leva de 2-4 semanas para morte das plantas após surgimento dos sintomas e a crônica que progride mais lentamente de 2-6 meses.

O isolado UnB 1173 (biovar 1, de tomate) também foi capaz de induzir sintomas da doença em plantas de eucalipto nos testes de patogenicidade. Já foi observado experimentalmente que estirpes pertencentes à biovars de várias hospedeiras foram mais virulentas a *E. grandis* do que as próprias estirpes pertencentes a estas plantas (Dianese & Dristig, 1993).

Os testes de suscetibilidade de diferentes espécies de plantas apresentaram resultados positivos para maior parte delas, principalmente com as solanáceas, confirmando o critério de raças de Buddenhagen & Kelman (1964). A colonização das plantas foi considerada como um processo de multiplicação e sobrevivência bacteriana dentro da planta, após inoculação com os isolados de *R. solanacearum* onde, foi possível recuperar a bactéria, indicando a infecção sistêmica (Pradhanang et al., 2000). Segundo compilação de literatura realizada por Janse et al. (2004), a

R3bv2 possui mais de 65 hospedeiras incluindo solanáceas cultivadas e daninhas, além de não solanáceas. Plantas de nabo, gerânio, girassol, feijão, beterraba e capuchinha já eram consideradas hospedeiras dessa biovar, apenas confirmando os relatos da literatura (Janse et al., 2004). Além dessas plantas, foi observado que as estirpes da biovar 2T de eucalipto também afetaram as espécies arbóreas: moringa e o cajueiro descritas como suscetíveis a outras biovars na Índia e Indonésia (Supriadi et al., 2001). Já o restante das plantas que já foram descritas como suscetíveis, não mostraram sinais de infecção pelas estirpes da **R3bv2T** de eucalipto. A reação goiabeira e da beldroega foi distinta, essa planta pertencente à mesma família do eucalipto (Myrtaceae) nunca foi descrita como hospedeira do patógeno. Enquanto na beldroega, a bacteriose já foi descrita por Janse et al. (2004), mostrando sintomas típicos de murcha. Como não foi possível reisolar a bactéria inoculada em plantas dessas espécies, o resultado foi considerado negativo.

Para uma identificação sem equívocos torna-se necessário agregar aos testes bioquímicos um método baseado em DNA (Champoiseau & Jones, 2009). Dessa forma, a utilização de oligonucleotídeos iniciadores em PCR corroborou os testes bioquímicos, a não ser pelos oligos de biovar 2 que amplificou o DNA de somente cinco dos oito isolados dessa biovar, inclusive a estirpe 1018 (**R3bv2** de batata). Esses oligos descritos por Fegan et al. (1998), foram desenhados a partir de sequências de um profago ou remanescente do mesmo presentes em muitas ou todas as estirpes da **R3bv2** (Gabriel et al., 2006). Segundo Guidot et al. (2009), talvez a longo prazo tais genes não seriam tão confiáveis para identificação, pois eles têm capacidade de se deslocar de uma bactéria para outra. Por outro lado, Stevens & van Elsas (2010) utilizaram os esses oligos que ajudaram na detecção da **R3bv2** em plantas de *Solanum dulcamara*, água e sedimentos, reforçando a sua utilidade.

O resultado observado com os oligos para filótipo foi o esperado, uma vez que vários trabalhos mostraram que isolados de batata da biovar 2T pertencem ao filótipo II. Ji et al. (2007) estudaram a diversidade genética de *R. solanacearum* e revelaram que isolados de batata do Brasil, Países Baixos, Ilhas Reunião, Austrália e Peru e de gerânio do Quênia da **R3bv2** pertenciam ao filótipo II. Posteriormente, Castillo & Greenberg (2007) estudando isolados de várias partes do mundo e Xu et al. (2009), com isolados da China, observaram o mesmo.

CONCLUSÕES

Esse trabalho descreveu pela primeira vez, em condições de cultivo de campo, a murcha bacteriana causada pela Raça 3 biovar 2 em eucalipto. Ficou claro, pelos testes bioquímicos, de ciclo de hospedeiras e moleculares, que tais isolados são pertencentes a **R3bv2T**. Esses resultados se somam aos relatos da alta adaptabilidade, versatilidade e vasta gama de hospedeiras de *Ralstonia solanacearum* e alerta para a possibilidade de novas infecções em campo e em viveiros de eucalipto pela biovar 2T. A transmissão da bactéria, de ocorrência natural nos solos brasileiros, é favorecida pelo sistema de produção clonal de mudas. Além disso, ficou comprovado experimentalmente, através das inoculações artificiais, que a **R3bv2T** também pode infectar *Moringa oleífera* (moringa) e *Anacardium occidentale* (cajueiro), espécies suscetíveis a murcha bacteriana incitada por outras biovars de *Ralstonia solanacearum*, em outros países.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF (2009) Anuário Estatístico: ano base 2009.
<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF10-BR.pdf>

Alfenas AC, Mafia RG, Sartório RC, Binoti DHB, Silva RR, Lau D, Vanetti CA (2006) *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. Fitopatologia Brasileira 31:357-366.

Álvarez B, Vasse J, Le-Courtois V, Trigalet-Démery D, López MM, Trigalet A (2008) Comparative behavior of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in diverse plant species. Phytopathology 98:59-68.

Buddenhagen I, Kelman A (1964) Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 2:203-230.

Castillo JA, Greenberg JT (2007) Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*.

Applied and Environmental Microbiology 73:1225-1238.

Champoiseau PG, Jones JB (2009) *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. Plant Health Progress. <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/pages/ralstonia.aspx>

Dianese JC, Dristig MCG (1993) Screening *Eucalyptus* selections for resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. In: Hartman GL, Hayward AC (Eds.) Kaohsiung Taiwan. Bacterial Wilt Proceedings of an International Conference. pp. 206-210.

Fegan M, Prior P (2005) How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? In: Allen P, Prior P, Hayward AC (Eds.) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. St Paul MN. APS Press. pp. 449-461.

Fegan M, Taghavi M, Sly LI, Hayward AC (1998) Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. In Prior P, Allen C, Elphinstone JG (Eds.) Bacterial wilt disease – molecular and ecological aspects. Berlin Germany. Springer-Verlag. pp. 19-33.

French ER (1965) Interaction between strains of *Ralstonia solanacearum*, its hosts and the environment. Los Banos Philippines. Proceedings of an international workshop held at PCARRD. pp. 94-104.

Gabriel DW, Allen C, Schell M et al. (2006) Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. Molecular Plant Microbe Interactions 19:69-79.

Guidot A, Elbaz M, Carrère S, Siri MI, Pianzola MJ, Prior P, Boucher C (2009) Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. Phytopathology 99:1105-1112.

Hayward AC (1994) The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward AC, Hartman GL (Eds.) Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas*

solanacearum. Willingford UK. CAB International. pp. 25-34.

Hayward AC (1964) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27:265-277.

Janse JD, van den Beld HE, Elphinstone J, Simpkins S, Tjou-Tam NNA, Vaerenbergh J (2004) Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. Journal of Plant Pathology 86:147-155.

Ji P, Allen C, Sanchez-Perez A, Yao J, Elphinstone JG, Jones JB, Momol MT (2007) New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. Plant Disease 91:195-203.

Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969-976.

Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44:693.

Lapage SP, Sneath PHA, Lessel EF, Skerman VBD, Seelinger HPR, Clark WA (1992) International Code of Nomenclature of Bacteria. Washington. American Society of Microbiology. 189p.

Lopes CA (2009) Murcha bacteriana ou murchadeira - uma inimiga do tomateiro em climas quentes. Brasília DF. Comunicado Técnico Embrapa 67.

Mafia RG (2006) Sintomatologia, etiologia e controle da murcha bacteriana do eucalipto. Tese de Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa.

Marques E, Rezende DV, Uesugi CH (2009) Primeiro relato da biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* em eucalipto no Brasil. Tropical Plant Pathology 34 (Supl.):12.

Miranda EFO, Takatsu TA, Uesugi CH (2004) Colonização de raízes de plantas

daninhas cultivadas *in vitro* e em vasos por *Ralstonia solanacearum* biovars 1, 2 e 3. Fitopatologia Brasileira 29:121-127.

Pastrik KH, Maiss E (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. Journal of Phytopathology 48:619-626.

Pradhanang PM, Elphinstone JG, Fox RTV (2000) Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. Plant Pathology 49:403-413.

Reifschneider FJB, Takatsu A (1985) *Pseudomonas solanacearum* no Brasil - aspectos macroepidemiológicos. Fitopatologia Brasileira 10 (Supl.):213.

Santos AF do, Auer CG, Grigoletti Jr. A (2001) Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Colombo PR. Circular Técnica Embrapa 45.

SBS (2008) Sociedade Brasileira de Silvicultura – Fatos e números do Brasil florestal. <http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>

Silveira RLV da A, Higashi EN (2003) Aspectos nutricionais envolvidos na ocorrência de doenças com ênfase para o eucalipto. Circular Técnica IPEF 200. Piracicaba SP.

Smith EF (1986) A bacterial disease of tomato, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* sp. nov.) Department of Agriculture Division of Vegetable Physiology and Pathology. Bulletin 12:21-28.

Stevens P, van Elsas JD (2010) Genetic and phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 strains obtained from Dutch waterways. Antonie van Leeuwenhoek 97:171-188.

Sudo S, Oliveira GHN, Pereira AC (1983) Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e bracatinga (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. Fitopatologia Brasileira 8 (Supl.):631.

Supriadi D, Karden M, Sitepu D (2001) Bacterial wilt disease of woody trees caused by *Pseudomonas solanacearum*: a review. *Jurnal Litbang Pertanian Local* 20:106-112.

Tsuchiya K (2004) Molecular biological studies of *Ralstonia solanacearum* and related plant pathogenic bacteria. *Journal of General Plant Pathology* 70:385-387.

Tussime G, Adipala E, Opio F, Bhagsari AS (1997) Weeds as latent hosts of *Ralstonia solanacearum* in highland Uganda: implications for lowland potato bacterial wilt control. *Guadeloupe-Antilles Françaises. Second International Bacterial Wilt Symposium*.

Xu J, Pan ZC, Prior P, Xu JS, Zhang Z, Zhang H, Zhang LQ, He LY, Feng J (2009) Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *European Journal of Plant Pathology* 125:641-653.

Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb.nov. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology* 39:897-904.

CAPÍTULO 2

Avaliação de bactérias extremófilas facultativas no controle de *Ralstonia solanacearum* R3bv2T de eucalipto

RESUMO

A murcha bacteriana do eucalipto é de difícil controle, levando em consideração sua infecção sistêmica e a eficiente sobrevivência e dispersão do patógeno através de material propagativo. Além disso, pouco se conhece a cerca da ecologia, evolução, resistência genética e de fontes de controle da doença. Diante dos fatos, cresce o interesse por bactérias benéficas, tais como as agentes de biocontrole. Este trabalho teve como objetivo a prospecção de bactérias, isoladas em condições extremas de temperatura, pH e salinidade, a partir de cinco diferentes tipos de solo, com potencial no controle *in vitro* e *in vivo* de *Ralstonia solanacearum* R3bv2T, em eucalipto. Sementes do híbrido “urograndis” de eucalipto foram microbiolizadas com uma suspensão de 10×10^8 UFC/mL de 10 estirpes bacterianas antagonistas selecionadas dos testes *in vitro* (difusão em dupla camada), através da agitação a 150 rpm em incubador rotativo, a 28 °C por 24 h. Em seguida, foram plantadas em sementeiras e mantidas em casa de vegetação. Após 69 dias avaliou-se a germinação das sementes e o peso seco total das plantas. Foram obtidos 61 isolados bacterianos, sendo que 30 deles apresentaram antagonismo *in vitro* contra a *R. solanacearum*. As 10 estirpes selecionadas pertencem aos gêneros *Bacillus* sp. e *Enterobacter* sp. e dentre elas a UnB 1370 (*Enterobacter* sp.) se destacou ao mostrar uma maior atividade contra a bactéria no solo, permitindo maior desenvolvimentos das plantas.

Palavras-chave: microbiolização de sementes, murcha bacteriana, germinação, produção de mudas, biocontrole.

Evaluation of facultative extremophile bacteria in the control of *Ralstonia solanacearum* R3bv2T of eucalyptus

ABSTRACT

Bacterial wilt of eucalyptus is difficult to control because of the infection's systemic nature and the pathogen's ability to survive and disperse by means of propagative material. Moreover, little is known about the ecology, evolution, genetic resistance and sources of control of this disease. To this end, interest has grown in beneficial bacteria that may be used as biocontrol agents. This work aimed to prospect for bacteria isolated in extreme temperature, pH and salinity conditions, from five different types of soil, with potential for use for *in vitro* and *in vivo* control of *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T** of eucalyptus. Seeds from the hybrid "urograndis" were microbiolized with a suspension of 10×10^8 UFC/mL of the antagonistic bacterial strains, by means of shaking at 150 rpm in a rotating incubator, at 28 °C for 24 h. Next, they were planted in seed-trays and kept in the greenhouse. After 69 days seed germination and total dry weight of the plants were evaluated. From the soils collected 61 bacterial isolates were obtained, and of these 30 presented *in vitro* (double layer diffusion) action against the plant bacterium. The 10 strains selected belonged to the genera *Bacillus* sp. and *Enterobacter* sp.; among them UnB 1370 (*Enterobacter* sp.) stood out by showing a higher activity against the bacteria in the soil, allowing for greater plants development.

Key words: seed microbiolization, bacterial wilt, germination, seedling production, biocontrol.

INTRODUÇÃO

Várias estratégias de controle da murcha bacteriana do eucalipto vêm sendo desenvolvidas, mas com aplicação limitada (Ran et al., 2005a). Esses esforços, no intuito de se controlar o patógeno, são dificultados devido à sua natureza sistêmica, pela alta capacidade de sobrevivência e por sua fácil disseminação (Mafia, 2006). Além disso, o sistema de produção de mudas de eucalipto é basicamente clonal, altamente favorável à multiplicação da bactéria e pouco se conhece a cerca da ecologia, evolução (Lopes, 2009), resistência genética e de fontes de controle da doença (Alfenas et al., 2006). Doenças causadas por bactérias constituem um novo desafio à cultura de *Eucalyptus* spp. podendo, inclusive, limitar o uso de clones suscetíveis (Cunha et al., 2006).

Dentre as medidas de controle disponíveis, o controle biológico tem surgido como uma alternativa promissora para o manejo da murcha. Entretanto, para dar início a um programa de controle biológico, é necessário que se faça seleção de microrganismos antagonistas, *in vitro* ou *in vivo*, sendo o primeiro mais utilizado quando se testam grande número de isolados (Mariano, 1993).

Os microrganismos que habitam o solo desempenham diversas funções, tais como: decomposição de matéria orgânica, agregação do solo, além do controle biológico de pragas e doenças (Siqueira, 1993; Moreira & Siqueira, 2006). Dentre estes organismos, as bactérias constituem o grupo mais numeroso, podendo variar de acordo com o tipo de solo, manejo e métodos de isolamento empregados (Brandão, 1992). Estima-se que menos de 10% da vida existente no solo seja conhecida, sem mencionar a falta de conhecimento do potencial desses organismos (Mendes & Reis Jr., 2010).

Os solos do cerrado são caracterizados por apresentarem baixa fertilidade e pH, devido às altas concentrações de alumínio, ferro, manganês e baixos teores de fósforo, cálcio e magnésio (Oliveira et al., 2005). Além disso, são considerados aluminotóxicos para a maioria das espécies agrícolas (Morais-Costa et al., 2009), e provavelmente é um ambiente complexo para sobrevivência dos microrganismos que tiveram que se adaptar a tais padrões físico-químicos ou que mantiveram tais adaptações de seus ancestrais.

A capacidade de adaptação a alterações ambientais é uma das características mais intrigantes da vida na Terra (Santos et al., 2001). Microrganismos extremófilos são adaptados a sobreviver em nichos ecológicos particulares, tais como altas temperaturas,

extremos de pH, altas concentrações de sal, pressão, alta radiação gama ou ultravioleta (Niehaus et al., 1999). Habitam desde águas frias da Antártida até fontes hidrotermais superaquecidas (Nath & Bharathi, 2011). Quando se fala de extremofilia a primeira associação seria com procariotos, entretanto organismos extremófilos aparecem nos três domínios, não constituindo uma característica filogenética, apesar de todos os hipertermófilos serem membros de Archaea e Bacteria. Entre os eucariotos são comuns os psicrofílos, acidófilos (Rothschild & Mancinelli, 2001).

Por outro lado, membros não termofílicos pertencentes a Archaea também habitam outros nichos terrestres (Nicol & Schleper, 2006; Simon et al., 2000), tais como as raízes de plantas. Em estudo pioneiro da diversidade microbiana em solos da Amazônia sem necessidade de cultivo, Berneman & Triplett (1997) observaram membros de Archaea filo Crenarchaeota. Em estudo semelhante, Simon et al. (2000) observaram membros do mesmo filo colonizando tanto raízes jovens quanto senescentes de plantas.

Microrganismos extremófilos, no Domínio Bacteria, também são encontrados em lugares não considerados extremos. Beffa et al. (1996) isolaram bactérias pertencentes ao gênero *Thermus* sp. proximamente relacionadas a espécie *Thermus thermophilus* HB8, apresentando crescimento ótimo entre 65-75 °C e que teriam papel importante na degradação da matéria orgânica durante a fase termogênica (65-80 °C) do processo de compostagem. Em um lugar similar, um reator de compostagem no Japão, bactérias gram-negativas, formadoras de esporos e moderadamente termófilas, com crescimento ótimo a 50 °C foram encontradas. O relacionamento filogenético mais próximo com o gênero *Thermobacillus* e a espécie proposta foi *Thermobacillus composti* sp. nov. (Watanabe et al., 2007). Venugopalan et al. (2008), na Nova Deli (Índia), conseguiram isolar várias espécies de *Bacillus* diretamente de amostras de resíduos domésticos em fermentação, com crescimento ótimo a 60 °C.

No Brasil, em trabalho objetivando descrever a diversidade bacteriana de solos da Mata Atlântica através de métodos moleculares independentes de cultivo, Faoro (2006) observou uma predominância do filo Acidobacteria, criado para englobar bactérias acidófilas no Domínio Bacteria, o segundo filo com mais representantes foi Proteobacteria. Na região semiárida do Cariri (Paraíba), Gorchach-Lira & Coutinho (2007) isolaram bactérias mesófilas e termófilas do solo e da rizosfera associada à gramínea *Aristida adscensionis* L., sendo observados alguns isolados crescendo a até 70 °C.

Alguns trabalhos científicos têm relatado o controle da murcha bacteriana em diversas famílias botânicas e espécies hospedeiras, com uso de diferentes grupos de agentes biocontroladores, tais como: actinomicetos (Moura & Romeiro, 1999; Teng et al., 2006); rizobactérias (Trigalet et al., 1993; Shekhawat et al., 1993; Frey et al., 1994; Peixoto, 2007; Kurabachew & Wydra, 2008; Lemessa & Zeller, 2007); bactérias endofíticas (Paz, 2009); bactérias extremófilas facultativas (Rezende, 2010).

Trabalhos abordando o biocontrole são escassos na cultura do eucalipto. Com o objetivo de avaliar a eficiência das rizobactérias na inibição do crescimento *in vitro* de isolados de bactérias fitopatogênicas a *Eucalyptus* spp., Cunha et al. (2006) observaram que a rizobactéria S1 (*Bacillus subtilis*) destacou-se quanto à inibição do crescimento do isolado IP1-05 de *Pseudomonas cichorii*, que provoca manchas foliares e desfolha em mudas de eucalipto.

Na China, a aplicação de *P. fluorescens* do tipo RPCPs (rizobactérias promotoras de crescimento de plantas), tem mostrado eficácia no controle de *Ralstonia solanacearum* (van Loon et al., 1998). Ran e colaboradores (2005a, b) estudando atividade antagônica de *Pseudomonas* spp. *in vitro* e o biocontrole da murcha do eucalipto *in vivo*, observaram que os isolados estudados só suprimiram a doença quando as mudas tiveram suas raízes imersas em uma suspensão bacteriana, antes de ser transplantadas para o solo infestado, a doença diminuiu significativamente.

Neste trabalho utilizou-se o termo “extremófilos facultativos” para designar bactérias capazes de crescer tanto em condições mais extremas, quanto em condições próximas da neutralidade (mesófilos). Como foi anteriormente mencionado, existem poucos estudos do potencial biotecnológico desses organismos (Madigan, 2000) e diante disso, foi objetivo deste trabalho: isolar e identificar bactérias extremófilas facultativas que possuam potencial de biocontrole da murcha bacteriana do eucalipto, causada pela Raça 3 biovar 2T de *Ralstonia solanacearum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos isolados bacterianos

No mês de março do ano de 2010 foram coletados cinco diferentes tipos de solos na profundidade de 0-20 cm, previamente georreferenciados (Lacerda et al., 2007), na Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília (Núcleo Rural Vargem Bonita, DF). Foram eles: Latossolo Vermelho Amarelo (LVA, cultivado com cítricos), Latossolo Vermelho (LV, não cultivado), Cambissolo (CAMB, não cultivado), Gleissolo Melânico (GLEI, cultivado com pastagem) e Organossolo (ORGA, cultivado com pastagem).

Em 50 mL do meio 523 (Kado & Heskett, 1970) líquido foi inoculado 1 g de cada amostra de solo coletada nas seguintes condições extremas: pH 3,0; pH 5,0; pH 7,0 e pH 9,0; a 5, 10 e 15% de NaCl e à 50 °C e 60 °C. O meio foi agitado a 150 rpm em incubador rotativo, a 28 °C por 24 h nas duas primeiras condições e a 50 e 60 °C, para extremos de temperatura. Após esse período, 1 mL foi plaqueado em meio 523 sólido e incubado por 48 h, a 28 °C, 50 °C e 60 °C. As bactérias crescidas foram isoladas individualmente, apenas segundo suas características culturais, preservadas em água estéril e glicerol a -20 °C, para estudos posteriores.

Testes in vitro – Prospecção da antibiose por difusão em dupla camada

Inicialmente os isolados foram cultivados por 48 h, a 28 °C em meio 523. Em seguida, foram transferidos quatro isolados (em pontos equidistantes) com possível atividade antagonista, por placa de Petri contendo meio 523 sólido. As placas foram incubadas nas condições citadas anteriormente, até que apresentassem crescimento evidente. Em câmara de fluxo laminar as placas foram invertidas e cada tampa foi forrada com discos de papel filtro de 90 mm. Com auxílio de uma micropipeta foram adicionados 1 mL de clorofórmio aos discos de papel. Após 20 min os discos de papel foram removidos e as placas entreabertas durante 30 min, para eliminação de resíduos do clorofórmio (**Figura 1**). Concomitantemente, foi preparada uma suspensão de *R. solanacearum* de eucalipto (estirpe UnB 1359, biovar 2T) numa concentração de

aproximadamente 10×10^8 UFC/mL (equivalente a Escala 7 de McFarland) de onde retirou-se 25 μ L que foram adicionados a 5 mL de meio 523 semi-sólido (0,8%) fundente (48 °C). Retornadas a posição normal, cobriu-se as placas com o meio semi-sólido fundente, previamente inoculado com *R. solanacearum*, com o cuidado de formar uma camada homogênea sobre toda a superfície. Após dois dias de incubação, foi observada, apenas visualmente sem medição, a formação ou não de halos de inibição (Romeiro, 2007; com modificações). Os ensaios foram realizados em triplicata.

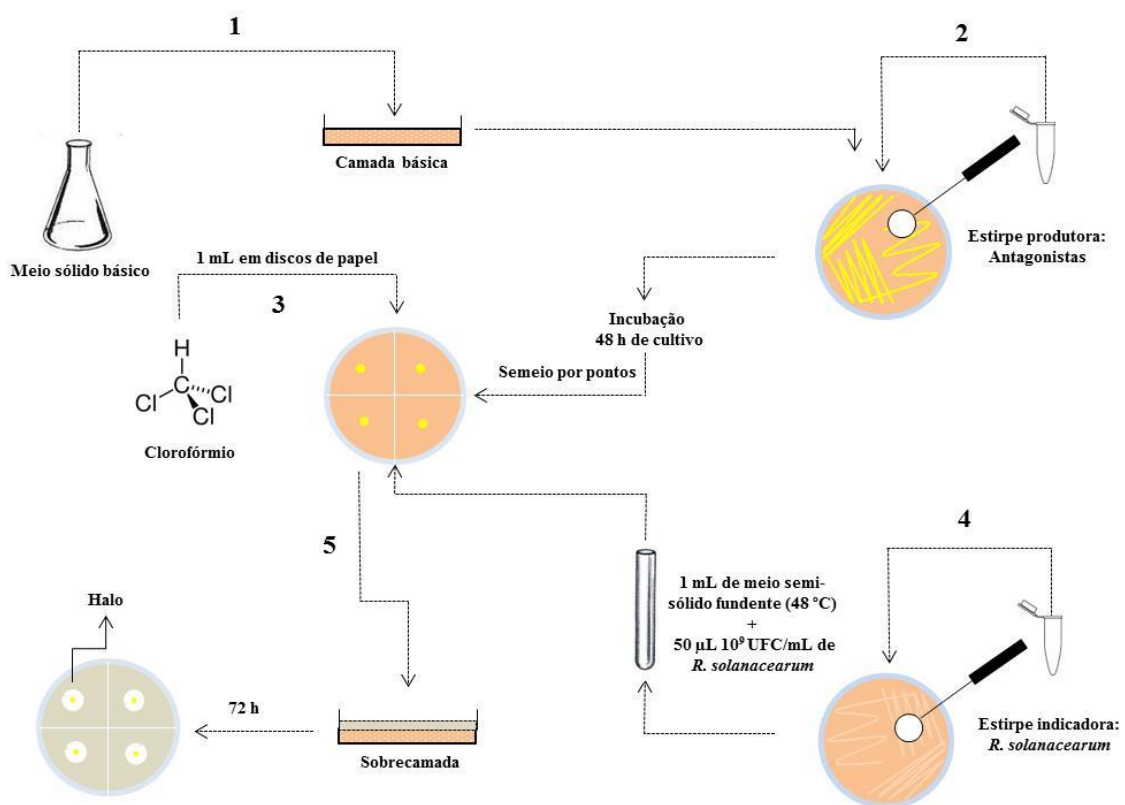


FIGURA 1 - Etapas do teste *in vitro*, de antibiose por difusão em dupla camada, para seleção de microrganismos extremófilos facultativos antagonistas a *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T**, segundo Romeiro (2007, com modificações).

Seleção dos isolados

Caracterização bioquímica, morfológica e cultural

Dos testes *in vitro* para prospecção da antibiose foram selecionados dez isolados, a partir da observação visual dos maiores halos de inibição formados, para os experimentos *in vivo*. Eles foram submetidos aos seguintes testes bioquímicos: oxidação/fermentação da glicose, catalase, teste para produção de pigmento fluorescente (meio B de King) e teste de utilização de asparagina como fonte de carbono e nitrogênio. Todos os testes foram realizados segundo as metodologias descritas por Mariano et al. (2005). Também foram observadas as características morfológicas e culturais, quanto à pigmentação, juntamente com a coloração de Gram e visualização ao microscópio ótico.

Identificação dos isolados através do sequenciamento do gene do 16S rDNA

Os 10 isolados selecionados, foram enviados a empresa In Vitro Palm Consultoria, Estudo e Desenvolvimento Biológico – LTDA, situada em Piracicaba - SP, para identificação no nível de gênero, feita por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rDNA.

Após a identificação, os isolados foram depositados na Coleção de Bactérias Fitopatogênicas, do Departamento de Fitopatologia, da Universidade de Brasília.

Testes *in vivo* – via microbiolização de sementes

Inicialmente uma suspensão de aproximadamente 10×10^8 UFC/mL (Escala 7 de McFarland) foi preparada com a estirpe UnB 1359 de *R. solanacearum* Raça 3 biovar 2T de eucalipto e 25 mL foram distribuídos em 11 bandejas de isopor com 72 células, contendo o substrato Bioplant[®]. Tais bandejas foram mantidas em casa de vegetação, da Estação Experimental de Biologia – Universidade de Brasília (UnB).

Após 3 dias foi realizada a microbiolização das sementes, com metodologia

adaptada de Rodrigues (2010), utilizando-se sementes do híbrido “urograndis” de eucalipto doadas pelo IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais). Foram utilizadas as 10 estirpes bacterianas selecionadas como citado anteriormente (**Tabela 2**). A desinfestação superficial das sementes de eucalipto foi efetuada por imersão em álcool 70% (30 s), seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% (3 min) e lavagem em água destilada esterilizada, por duas vezes consecutivas. A partir de então as sementes foram imersas nas suspensões bacterianas dos isolados antagonistas, na concentração de 10×10^8 UFC/mL (Escala 7 de McFarland), agitadas a 150 rpm em incubador rotativo, a 28 °C por 24 h, com exceção das sementes testemunhas que foram mantidas nas mesmas condições, porém em água destilada estéril. Após esse período, as sementes microbiolizadas foram semeadas nas bandejas com substrato previamente inoculado com *R. solanacearum* e mantidas sobre estrados plásticos para evitar possível contaminação entre os tratamentos. Como as sementes de “urograndis” são muito pequenas e não se consegue plantar apenas uma, foi realizado o raleio após a germinação.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 10 tratamentos (isolados bacterianos antagonistas + estirpe UnB 1359 de *R. solanacearum*) constituídos de 72 repetições (parcelas experimentais), com duas testemunhas: uma sem bactéria e outra apenas com a estirpe UnB 1359. Após 90 dias, avaliou-se o efeito de *R. solanacearum* na germinação das sementes (relação entre o total semeado/total germinado) e no desenvolvimento das plântulas (peso seco total = raiz + parte aérea). Após a lavagem, para retirada do substrato das raízes, as plântulas foram embaladas em sacos de papel, individualmente, levados a estufa por 24 h, a 70 °C e pesados em balança digital.

Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o programa Assistat 7.6 beta (Silva & Azevedo, 2009). Os valores médios de peso seco total da parte aérea e raízes foram comparados pelo teste de **T**, ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Isolados obtidos

A partir das amostras de solos coletadas foi obtido um total de 61 isolados bacterianos nas condições ambientais extremas, anteriormente descritas. Na faixa de pH 9 no organossolo e gleissolo não foram obtidos isolados bacterianos, assim como em pH 10 e a 15% de NaCl, no latossolo vermelho. Nas faixas de pH 3 e a 10% de NaCl foram obtidos o maior número de isolados, 10 isolados; seguido pelo pH 7 com 8 isolados; 5% de NaCl 6 isolados; pH 5, pH 10, a 50 e 60 °C com 5 isolados; a 15% de NaCl 4 isolados e em pH 9 com o menor número, 3 (Tabela 1).

TABELA 1 - Isolados bacterianos obtidos dos cinco diferentes tipos de solos, nas respectivas condições ambientais extremas.

Tipo de solo Condição	ORGA*	GLEI	CAMB	LVA	LV	Total
	Número de isolados obtidos					
pH 3	3	2	1	3	1	10
pH 5	1	1	1	1	1	5
pH 7	2	3	1	1	1	8
pH 9	-	-	1	1	1	3
pH 10	1	1	1	1	-	5
50 °C	1	1	1	1	1	5
60 °C	1	1	2	1	1	5
5% NaCl	1	1	1	1	1	6
10% NaCl	1	1	2	1	1	10
15% NaCl	1	1	1	1	-	4
Total						61

*ORGA: organossolo; GLEI: gleissolo; CAMB: cambissolo; LVA: latossolo vermelho amarelo; LV: latossolo vermelho.

Caracterização bioquímica, morfológica e cultural

Dentre os 10 isolados bacterianos selecionados, os testes bioquímicos revelaram que seis foram Gram positivos e quatro Gram negativos, nenhum produziu pigmento fluorescente, quatro foram oxidativos e seis fermentativos, todos foram catalase positivos. Quanto às características morfológicas e culturais (**Figura 2**), todas as células foram bastonetiformes, a cor das colônias apresentaram coloração creme ou brancas e de consistência mucóide ou seca (**Tabela 2**)

Testes in vitro

Do total de 61 isolados bacterianos obtidos, 30 exibiram atividade inibitória (**Figura 2**). Porém, nenhum isolado de altas temperaturas foi capaz de inibir o crescimento de *R. solanacearum*.

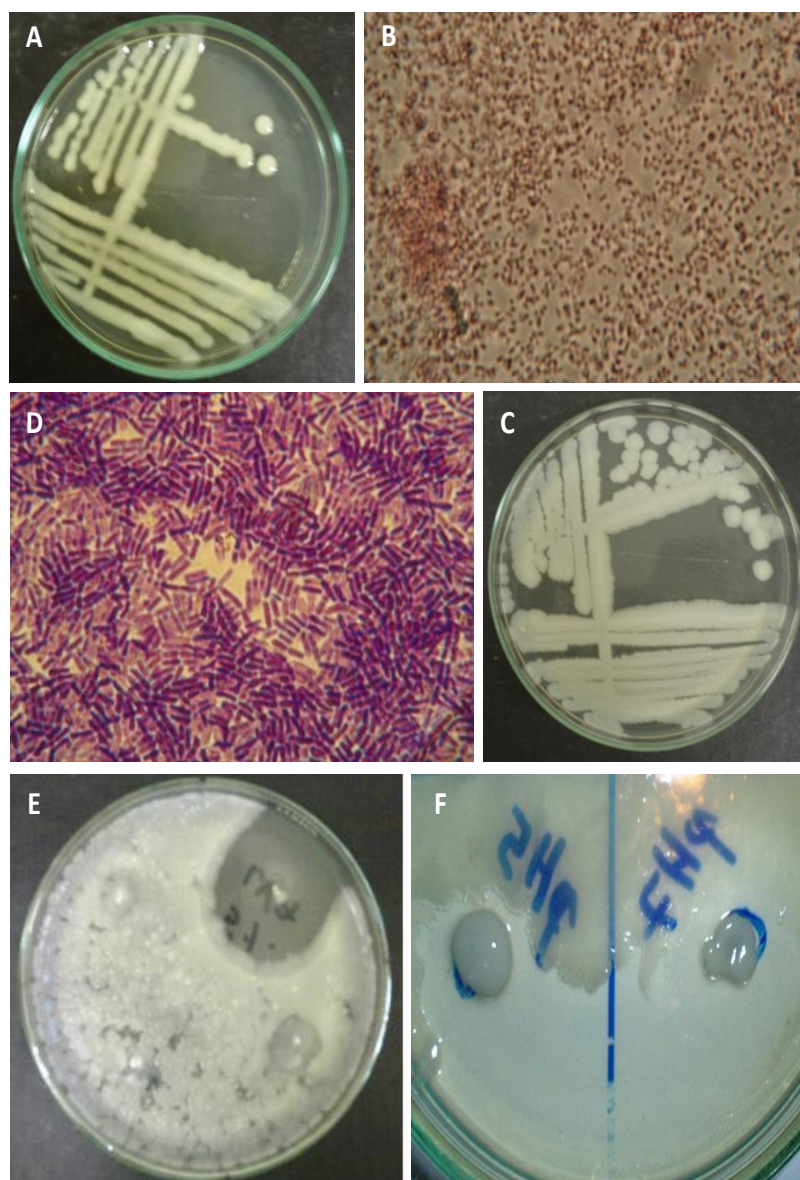


FIGURA 2 - Caracterização morfológica, cultural (A-D) e teste *in vitro* (E e F) de bactérias extremófilas facultativas isoladas de diferentes solos. **A.** colônias mucóides de coloração creme brilhante do isolado pH 7 ORGA (2) e **B.** células Gram positivas pequenas, em forma de bacilos, do isolado 15% GLEI (2) isolado 15% GLEI (2); **C.** colônias de aspecto seco, brancas e opacas do isolado 15% GLEI (2) e **D.** bastonetes Gram negativos, do isolado 15% GLEI (2). Teste *in vitro*, através da antibiose por difusão em dupla camada contra *Ralstonia solanacearum* **R3bv2T** de eucalipto, halos de inibição formados por **E.** isolado 15% GLEI (2) e **F.** a direita isolado pH 7 CAMB e à esquerda pH 5 ORGA.

TABELA 2 - Isolados obtidos de condições ambientais extremas, selecionados dos testes *in vitro* contra *Ralstonia solanacearum*.

Isolados	Estirpes	Testes bioquímicos					Características morfológicas e culturais		
		Gram	King B	O/F ¹	Catalase	Asparagina	Células	Cor/Brilho	Consistência
pH 3 GLEI (2)	UnB 1366	+ ³	-	O	+	-	B ¹	Branca/Opaca	Seca
pH 5 ORGA	UnB 1367	-	-	F	+	-	B	Creme/Opaca	Mucóide
pH 5 LV	UnB 1368	+	-	O	+	-	B	Branca	Mucóide
pH 7 ORGA (2)	UnB 1369	-	-	F	+	+	B	Creme/Brilhante	Mucóide
pH 7 CAMB	UnB 1370	-	-	F	+	+	B	Creme/Brilhante	Mucóide
pH 7 LV	UnB 1371	-	-	F	+	+	B	Creme/Brilhante	Mucóide
pH 9 LVA	UnB 1372	+	-	O	+	-	B	Branca/Opaca	Seca
pH 10 GLEI	UnB 1373	+	-	F	+	-	B	Branca/Opaca	Seca
10% LVA	UnB 1374	+	-	F	+	+	B	Branca/Opaca	Mucóide
15% GLEI (2)	UnB 1375	+	-	O	+	-	B	Branca/Opaca	Seca

¹O-Oxidativo; F-Fermentativo

²Bastonetes

³(+) resultados positivos, (-) resultados negativos, nos respectivos testes

Sequenciamento baseado no gene 16S rDNA

A identificação feita com base no sequenciamento parcial do gene 16S rDNA (**Tabela 3**) indicou que os 10 isolados pertenceram a dois gêneros: *Bacillus* e *Enterobacter*, com 99% de similaridade com as sequências comparadas no GenBank.

TABELA 3 - Isolados bacterianos obtidos de solos em condições ambientais extremas e selecionados para testes *in vivo*, de controle de *Ralstonia solanacearum*, através do sequenciamento de parte do gene do 16S rDNA.

Isolados	Estirpes	Gênero
pH 3 GLEI (2)	UnB 1366	<i>Bacillus</i> sp.
pH 5 ORGA	UnB 1367	<i>Enterobacter</i> sp.
pH 5 LV	UnB 1368	<i>Bacillus</i> sp.
pH 7 ORGA (2)	UnB 1369	<i>Enterobacter</i> sp.
pH 7 CAMB	UnB 1370	<i>Enterobacter</i> sp.
pH 7 LV	UnB 1371	<i>Enterobacter</i> sp.
pH 9 LVA	UnB 1372	<i>Bacillus</i> sp.
pH 10 GLEI	UnB 1373	<i>Bacillus</i> sp.
10% LVA	UnB 1374	<i>Bacillus</i> sp.
15% GLEI (2)	UnB 1375	<i>Bacillus</i> sp.

Controle in vivo

Nos testes com sementes de “urograndis” microbiolizadas com estirpes extremófilas facultativas plantadas em solo infestado com *R. solanacearum*, foram observados sintomas da bacteriose tais como: arroxamento de folhas e nervuras (**Figura 3A e 3I**), lesões nas margens das folhas (**Figura 3B, 3D e 3J**), lesões esparsas no limbo foliar (**Figura 3E**), necrose em “V” invertido (**Figura 3J**), mas raramente murcha das plântulas (**Figuras 3F, 3G e 3H**).

Observou-se uma variação da germinação entre os tratamentos com as diferentes bactérias e testemunhas (**Tabela 4**). Ficou evidente que o patógeno afetou a germinação das sementes, já que na maior parte dos tratamentos a germinação foi inferior a da testemunha sem bactérias (75%), exceto no tratamento com o isolado UnB 1369 (*Enterobacter* sp.) em que a percentagem de germinação (76%) foi maior que na testemunha, sem bactérias antagonistas. A percentagem de germinação nos tratamentos com os isolados UnB 1368 (21%), UnB 1370 (40%) e UnB 1371 (42%) foi menor que a das duas testemunhas. Nos demais tratamentos a germinação foi maior que a testemunha com *R. solanacearum*, variando entre 50 e 64%.

Na análise estatística das médias obtidas do peso seco total das plântulas, utilizadas como indicador da ação das estirpes bacterianas antagonistas contra *R. solanacearum* no solo, pode-se observar que a testemunha sem a adição de tais bactérias foi o tratamento que apresentou a menor média de massa seca e não mostrou diferença estatística significativa entre os tratamentos UnB 1367, UnB 1368, UnB 1371 e UnB 1373, considerados aqui como os que menos influenciaram a ação da fitobactéria e que exibiram os menores incrementos de peso seco: 222,1; 168,1; 209,1 e 209,0%, respectivamente. O tratamento com a estirpe UnB 1370 (*Enterobacter* sp.) apresentou a maior média e incremento de peso seco (532,2%), indicando ser o menos afetado pela ação de *R. solanacearum*, somente o UnB 1370, UnB 1366 e UnB 1372, ambos *Bacillus* sp, apresentaram incrementos superiores ao tratamento apenas com a bactéria fitopatogênica de 431,0 e 392,2%, respectivamente. Mesmo assim eles não apresentaram diferença estatística significativa com a testemunha inoculada com *R. solanacearum*.



Figura 3 - Sintomas, incitados por *Ralstonia solanacearum*, em plantas de “urograndis” obtidas a partir de sementes, nos testes de controle *in vivo*. **A.** arroxejamento foliar e de nervuras em tratamento com a estirpe UnB 1370; **B.** sintomas de “V” invertido em folha de planta do tratamento com UnB 1373; **C.** lesão partindo da nervura central em tratamento com UnB 1368; **D.** lesão na margem da folha, **E.** lesões de cor parda dispersas no limbo foliar em tratamento com UnB 1373; **F.** murcha de plântulas em tratamento com UnB 1366; **G.** em tratamento com UnB 1371 e **H.** murcha em tratamento com UnB 1372. **I.** planta com arroxejamento generalizado na testemunha, tratada apenas com *R. solanacearum* e **J.** plântula com necrose nas extremidades das folhas e no limbo foliar, também no tratamento com UnB 1371.

TABELA 4 - Efeito das estirpes bacterianas, oriundas de solo submetido a condições ambientais extremas, no controle de *Ralstonia solanacearum* em plantas do híbrido “urograndis” de eucalipto, obtidas de sementes microbiolizadas e plantadas em solo infestado com a fitobactéria.

Tratamentos	Germinação (%)	PS Total ⁵ (g)	Incremento no PS ⁷ (%)
UnB 1366 + <i>Rs</i> ¹	62	0.31848 ab ⁶	431,0
UnB 1367 + <i>Rs</i>	50	0.19331 abc	222,1
UnB 1368 + <i>Rs</i>	21	0.16089 bc	168,1
UnB 1369 + <i>Rs</i>	76	0.21562 ab	259,2
UnB 1370 + <i>Rs</i>	40	0.37949 a	532,2
UnB 1371 + <i>Rs</i>	42	0.18555 abc	209,1
UnB 1372 + <i>Rs</i>	55	0.29542 ab	392,2
UnB 1373 + <i>Rs</i>	64	0.18549 abc	209,0
UnB 1374 + <i>Rs</i>	55	0.21910 ab	265,0
UnB 1375 + <i>Rs</i>	54	0.21779 ab	263,0
<i>Rs</i>	50	0.25849 ab	331,0
Testemunha	75	0.06002 c	NA
MG ²	NA ⁴	0.20724	NA
CV% ³	NA	97.48	NA

¹Tratamento com bactéria antagonista + *Ralstonia solanacearum*; ²Média geral; ³Coeficiente de variação; ⁴Não se aplica neste caso; ⁵Peso seco; ⁶Valores seguidos da mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem significativamente ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste **T**; ⁷Em relação a testemunha não tratada.

DISCUSSÃO

A identificação molecular dos isolados de solos submetidos a condições ambientais extremas indicou que são pertencentes apenas a dois filos do Domínio Bacteria: Firmicutes e γ -Proterobacteria. O primeiro engloba o gênero *Bacillus*, da família Bacillaceae, que são organismos gram e catalase positivos, com células em forma de bastonete. Suas colônias variam muito, principalmente de acordo com a

composição do meio de cultura utilizado, geralmente são apigmentadas, rizóides, lisas ou ásperas, tendendo a crescer muito em placa. Exibem uma grande diversidade e habilidade fisiológica, que varia entre espécies. São aeróbicos ou aneróbicos facultativos, psicrófilos a termófilicos, crescendo numa faixa de 5 a 65 °C, são acidófilos a alcalófilos variando entre pH 5,7 e 6,8, halófilos moderados a halófilos suportando de 2-10% de NaCl (Garrity et al., 2005). O observado nos testes bioquímicos, de morfologia e características culturais confirma a diversidade relatada neste gênero, as estirpes cresceram em pH 3, pH 5 e pH 9, a 10 e 15% de NaCl. Neste estudo. Duas das estirpes de *Bacillus* se mostraram fermentativas, a UnB 1373 e UnB 1374. Ibrahim et al. (2007) obtiveram isolados de *B. halodurans*, de amostras de solo e água em lago sódico do Egito, com crescimento em meio suplementado com 15% de NaCl e pH variando de 8-11. Bactérias pertencentes a espécies de *Bacillus* foram observadas por Venugopalan et al. (2008) em compostagem com crescimento ótimo a 60 °C. Aqui também isolou-se bactérias de extremos de temperatura, crescendo a 50 e 60 °C, entretanto não apresentaram antagonismo *in vitro* a *R. solanacearum* e por isso não foram identificadas. O habitat principal desses organismos é o solo, mas está amplamente distribuído na natureza, inclusive como patógenos humanos (Rezende-Lago et al., 2004), de animais (Maria et al., 2008), insetos (Polanczyk et al., 2003) e fitopatogênicos (Garrity et al., 2009).

O membro do segundo filo é pertencente ao gênero *Enterobacter*, família Enterobacteriaceae, são gram negativos, células também em forma de bacilos, catalase positivos, anaeróbicos facultativos, com colônias lisas, mucóides ou secas como observado. Seu crescimento ótimo é em 30 °C, mas algumas espécies são aptas a crescerem a 37 e 45 °C. Também encontrado em ambientes naturais incluindo, água, dejetos, vegetais e solo. É um patógeno de importância para humanos em infecções respiratórias (*Enterobacter* spp.), alguns são simbiontes em milho, fixadores de nitrogênio e supressores de fitopatógenos (*E. cloacae*), endófitos em inúmeras plantas (*E. asburiae*) e também há espécies fitopatogênicas tais como: *E. nimipressuralis* (apodrecimento da madeira em elmo), *E. cancerogenus* (causando cancro na papoula) (Garrity et al., 2005). Outras espécies agem na solubilização de fosfato (Stamford et al., 2005), promoção do crescimento vegetal (Oliveira et al., 2003; Assumpção et al., 2009). Curiosamente, dos cinco isolados obtidos deste gênero todos originaram apenas de condições de pH 5 e 7. A enterobactéria *Escherichia*, por exemplo, que é o gênero tipo de Enterobacteriaceae, cresce em pH variando de 5,0 a 9,0 (Garrity et al.,

2005).

Em trabalho semelhante, Rezende (2010) identificou isolados de solos cultivados e não cultivados, com base em grupos de condições extremas e não foram encontrados isolados crescendo em pH 3, ao contrário do observado aqui, em que se obteve dez isolados nessa faixa. Sabe-se, entretanto, que essa diversidade pode variar de acordo com o tipo e manejo do solo (Brandão, 1992). Rezende (2010) descreveu bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Giesbergeria* e *Chryseobacterium*, não sendo nenhum destes relacionados a bactérias extremófilas obrigatórias. O estudo em questão não tinha a finalidade de analisar a comunidade microbiana, nem estabelecer grupos de microrganismos do solo e, sim isolar presumíveis bactérias biocontroladoras em condições extremas.

Existem muitos trabalhos que descrevem a comunidade bacteriana dos solos, que é muito diversificada, com inúmeras funções (Siqueira, 1993; Moreira & Siqueira, 2006) pouco conhecidas, pois grande parte não é cultivável. Diante da falta de estratégias eficientes de controle de bacterioses, já que assim como nas viroses é impossível curar a planta (Romeiro, 2011) e devido a infecção de natureza sistêmica do patógeno que causa a murcha bacteriana (Alfenas et al., 2006), diminuindo a eficácia de produtos protetores, a busca por fontes alternativas de controle é primordial.

A quantificação da doença ou mesmo a avaliação da indução de resistência é um procedimento complexo. Essa avaliação é feita com base na contagem de lesões, utilização de escala de notas, medição da intensidade de esporulação em órgão lesionado ou tempo de incubação (Romeiro, 2007). No caso de *Ralstonia solanacearum*, por exemplo, pode ser investigada a percentagem de plantas murchas (Schaad et al., 2001). Porém, o observado em eucalipto é que por se tratar de uma planta de natureza lenhosa, a frequência de murcha é baixa e o desenvolvimento da doença é lento. Condições ambientais e de predisposição do hospedeiro ideais são necessárias para haver um aumento da colonização dos tecidos e expressão de sintomas severos (Alfenas et al., 2006). O que varia também de acordo com o tipo de enfermidade: aguda que leva de 2-4 semanas para morte das plantas após surgimento dos sintomas e a crônica que progride mais lentamente de 2-6 meses (Supriadi et al., 2001).

No presente trabalho, grande parte dos isolados testados teve ação *in vitro*, mas não foi possível avaliar o controle biológico *in vivo* através de métodos

convencionais, nem observar sintoma de murcha permanente nas plântulas em geral. A avaliação indireta através das medidas do peso seco total do híbrido “urograndis” de eucalipto, com sementes microbiolizadas com bactérias antagonicas expostas a solo infestado com *R. solanacearum*, indicou que o peso da testemunha tratada apenas com *R. solanacearum* foi maior que o da testemunha sem bactéria. Isso provavelmente pode estar associado ao fato de que a bactéria é capaz de induzir a planta a produzir AIA e etileno como citado por Buddenhagen & Kelman (1964) e dessa forma induzir ao maior desenvolvimento das plantas. Os tratamentos com as estirpes UnB 1370 (*Enterobacter* sp.), UnB 1366 (*Bacillus* sp.) e UnB 1372 (*Enterobacter*), apresentaram as maiores médias de massa seca, evidenciando uma maior atividade contra a ação da bactéria fitopatogênica. A análise da germinação das sementes não pôde ser correlacionada com os resultados observados no incremento da matéria seca, sendo 40, 62 e 55%, respectivamente nas estirpes citadas. É possível tais bactérias não foram tão competitivas antes da germinação, não impedindo a morte das sementes, mas após a germinação proporcionaram maior desenvolvimento das plantas pelo antagonismo à fitobactéria e ou promoção do crescimento, pois já é reconhecido que rizobactérias possuem mais de uma característica benéfica, agindo tanto no controle quanto na promoção, simultaneamente.

Os programas de controle biológico de seleção de microrganismos antagonicos envolvem a seleção inicial *in vitro*, testando grande número de isolados e depois *in vivo* (Mariano, 1993), o que não garante correlação positiva entre as duas etapas. Além disso, é necessário entender os mecanismos e como funciona o agente de biocontrole (Romeiro, 2011).

O controle biológico da murcha bacteriana é relatado em vários trabalhos, mas em plantas tais como, batata e tomate, com eucalipto os trabalhos são em menor número. Moura & Romeiro (1999) avaliaram a atividade *in vitro* de actinomicetos como antagonistas a isolados e diferentes plantas, incluindo eucalipto e a maioria apresentou uma atividade intermediária. Cunha et al. (2006), tiveram sucesso no controle *in vitro* com *Bacillus subtilis* contra *Pseudomonas chichorii*, mas não relataram testes *in vivo*. Ran e colaboradores (2005 a) observaram correlação entre controle *in vitro* e *in vivo* utilizando *Pseudomonas* spp. na murcha do eucalipto quando as plantas tiveram suas raízes imersas na suspensão bacteriana. Dessa forma, além da complexidade do patossistema, o método de inoculação também parece influenciar na avaliação do processo de biocontrole. Estudando bactérias endofíticas

do eucalipto para controle de doenças em viveiros florestais, Paz (2009) observou que um isolado de *Bacillus subtilis* se destacou e foi o mais efetivo no controle *in vitro* e *in vivo* da bacteriose foliar causada por *Xanthomonas* sp. Rezende (2010) relatou 100% de controle de *R. solanacearum* em tomate, utilizando bactérias extremófilas facultativas dos gêneros *Enterobacter* sp. e *Klebsiella* sp.

Como visto, os gêneros das estirpes bacterianas descritas neste trabalho não tem parentesco com bactérias extremófilas obrigatórias, mas são conhecidas por crescerem em condições fora da faixa das mesófilas e são associadas e descritas no controle biológico de fitopatógenos (Paz, 2009; Cunha et al., 2006; Duff et al., 2003; Fravel, 1988).

CONCLUSÕES

No estudo de agentes de biocontrole nem sempre existe correlação positiva entre testes *in vitro* e *in vivo*, ainda mais considerando o patossistema peculiar da murcha bacteriana do eucalipto. No presente trabalho, pioneiro na utilização de bactérias isoladas em condições extremas como antagonistas a fitopatógenos, três estirpes (UnB 1370 – *Enterobacter* sp.; UnB 1366 – *Bacillus* sp. e UnB 1372 – *Enterobacter* sp.) mostraram maior correlação da inibição *in vitro* e *in vivo*, levando em consideração o método de avaliação utilizado. Dessa forma, estudos futuros que garantam uma melhor quantificação ou avaliação da doença, nesta planta, devem ser utilizados ou desenvolvidos, já que tais gêneros bacterianos têm potencial conhecido no cenário de controle biológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfenas AC, Mafia RG, Sartório RC, Binoti DHB, Silva RR, Lau D, Vanetti CA (2006) *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31:357-366.

Assumpção LC, Lacava PT, Dias ACF, Azevedo JL de, Menten JOM (2009) Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44:503-510.

Beffa T, Blanc M, Lyon PF, Vogt G, Marchiani M, Fischer JL, Aragno M (1996) Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 °C). *Applied and Environmental Microbiology* 62:1723-1727.

Berneman J, Triplett EW (1997) Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology* 63:2647-2653.

Brandão EM (1992) Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: Cardoso EJB, Tsai SM, Neves MCP (Eds.) *Microbiologia do Solo*. Campinas SP. Sociedade Brasileira de Ciência do solo. pp.1-15.

Buddenhagen I, Kelman A (1964) Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 2:203-230.

Cunha J de F, Picoli EA de T, Alfenas AC, Gonçalves RC (2006) Efeito *in vitro* de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. *Revista Árvore* 30:871-876.

Duff B, Schouten A, Raaijmakers JM (2003) Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 41:501-38

Faoro H (2006) Determinação da biodiversidade de Archaea e Bacteria da mata atlântica paranaense. Curitiba PR. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.

Fravel DR (1988) Role in antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annual Review of Phytopathology 26:75-91.

Frey P, Prior P, Marie C, Kotoujansky A, Trigalet-Demery DY, Trigalet A (1994) Hrp- mutants of *Pseudomonas solanacearum* as potential biocontrol agents of tomato bacterial wilt. Applied and Environmental Microbiology 60:3175-3181.

Garrity GM, Staley JT, Boone DR, Brenner DJ, De Vos P, Goodfellow M, Krieg NR, Rainey FA, Schleifer K-H (2009) The Firmicutes. In: Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Michigan State University.

Garrity GM, Staley JT, Boone DR, Brenner DJ, De Vos P, Goodfellow M, Krieg NR, Rainey FA, Schleifer K-H (2005) Proteobacteria. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Michigan State University. pp. 575-623.

Gorlach-Lira K, Coutinho HDM (2007) Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 38:135-141.

Ibrahim ASS, Ei-Shayeb NMA, Mabrouk SS (2007) Isolation and identification of alkaline protease producing alkaliphilic bacteria from an Egyptian Soda Lake. Journal of Applied Sciences Research 11:1363-1368.

Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969-976.

Kurabachew H, Wydra K (2008) Biochemical characterization of bacterial antagonists

and immunohistochemical changes after resistance induction in tomato against bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. Switzerland. Xth Meeting of the working group biological control of fungal and bacterial plant pathogens.

Lacerda MPC, Barbosa IO, Campos, PM, Papa R de A (2007) Utilização de sensoriamento remoto para o estabelecimento de relações entre vegetação nativa e classes de solos em mapeamento pedológico, Distrito Federal. Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Florianópolis, Brasil. INPE. pp. 3991-3996.

Lemessa F, Zeller W (2007) Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control* 42:336-344.

Lopes CA (2009) Murcha bacteriana ou murchadeira - Uma inimiga do tomateiro em climas quentes. Brasília DF. Comunicado Técnico Embrapa 67.

Madigan MT (2000) Extremophilic bacteria and microbial diversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 87:3-12.

Mafia RG (2006) Sintomatologia, etiologia e controle da murcha bacteriana do eucalipto. Tese de Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa.

Maria SL et al. (2008) Carbúnculo Hemático. *Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária* 10:1-5.

Mariano RLR, Silveira EB, Assis SMP, Gomes AMA (2005) Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: Mariano RLR, Silveira EB (Eds.) *Manual de Práticas em Fitobacteriologia*. 2ª edição. Recife PE. Editora Universitária. pp. 67-111.

Mariano RLR (1993) Métodos de seleção *in vitro* para controle microbiológico. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 1:369-40.

Mendes I de C, Reis Junior FB dos (2010) *Microrganismos do solo e a sustentabilidade dos agroecossistemas*. Planaltina DF. Embrapa Cerrados. UL: <http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/188/>>.

Morais-Costa F, Santana VRS, Cardoso-Filho O, Silva WA (2009) Estrutura física e química do solo do cerrado. X Seminário de Pesquisa e Pós Graduação. <http://www.fepeg.unimontes.br/evento2009/index.php/fepeg/fepeg2009/paper/viewFile/503/194>

Moreira FMS, Siqueira JO (2006) Microbiologia e Bioquímica do solo. 2ª edição. Lavras MG. Editora UFLA.

Moura AB, Romeiro R da S (1999) Avaliação *in vitro* de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896). Ciência e Agrotecnologia 23:281-288.

Nath AIV, Bharathi LPA (2011) Diversity in transcripts and translational pattern of stress proteins in marine extremophiles. Extremophiles 15:129-153.

Nicol GW, Schleper C (2006) Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? TRENDS in Microbiology 14:207-212.

Niehaus F, Bertold C, Kähler M, Antranikian G (1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Applied Microbiology and Biotechnology 51:711-729.

Oliveira IP de, Costa KA de P, Santos KJG dos, Moreira FP (2005) Considerações sobre a acidez dos solos de cerrado. Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos 1:1-12. http://www.fmb.edu.br/revista/edicoes/vol_1_num_1/Consideracoes_sobre_acidez.pdf

Oliveira ALM de, Urquiaga S, Baldani JI (2003) Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica RJ. Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161.

Paz ICP (2009) Bactérias endofíticas de eucalipto e potencial uso no controle de doenças e promoção de crescimento de mudas em viveiros florestais. Tese de

Doutorado. Porto Alegre RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Peixoto AR (1997) Controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro, por *Pseudomonas* spp. fluorescentes. *Ciência Rural* 27:153-160.

Polanczyk RA, Garcia M de O, Alves SB (2003) Potencial de *Bacillus thuringiensis israelenses* Berliner no controle de *Aedes aegypti* Revista Saúde Pública 37:813-6.

Ran LX, Liu CY, Wu GJ, Van Loon LC, Bakker PAHM (2005 a) Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. *Biological Control* 32:111-120.

Ran LX, Li ZN, Wu GJ, Van Loon LC, Bakker PAHM (2005 b) Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. *European Journal of Plant Pathology* 113:59-70

Rezende AM de FA (2010) Bactérias extremófilas facultativas: efeito na promoção de crescimento de tomate e na supressão de *Ralstonia solanacearum*. Brasília DF. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília.

Rezende-Lago NCM, Rossi Jr OD, Vidal-Martins AMC, Amaral LA (2007) Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 59:1563-1569.

Rodrigues LMR (2010) Avaliação da agressividade e caracterização genética de linhagens de *Ralstonia solanacearum* isoladas de diferentes plantas hospedeiras. Tese de Mestrado. Botucatu SP. Universidade Estadual Paulista.

Romeiro R da S (2007) Controle biológico de doenças de plantas. Viçosa MG. Editora UFV.

Romeiro R da S (2011) Bactérias fitopatogênicas. Viçosa MG. Editora UFV.

Rothschild LJ, Mancinelli RL (2001) Life in extreme environments. *Nature* 409:1092-1101.

Santos H, Lamosa P, Costa MS (2001) Extremófilos: microorganismos à prova de agressões ambientais extremas. *Boletim de Biotecnologia* 69:1-10.

Schaad NW, Jones JB, Chun W (Eds.) (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. *Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd Ed. Minnesota USA. APS Press.

Shekhawat GS, Singh R, Chakrabarti SK (1993) Possibility of biological management of potato bacterial wilt with microbial antagonists and latent potato viruses. *Potato Journal* 20:219-222.

Silva F de AS, Azevedo CAV de (2009) Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: World Congress on Computers in Agriculture 7. Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers. <http://www.assistat.com/indexp.html>

Simon HM, Dodsworth JA, Goodman RM (2000) Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. *Environmental Microbiology* 2:495-505.

Siqueira JO (1993) *Biologia do solo*. Lavras MG. ESAL/ FAEPE.

Stamford NP et al. (2005) Microbiota dos Solos Tropicais. In Michereff SJ, Domingos EGTA, Maria M (Eds.) *Ecologia e manejo de patógenos radiculares de solos tropicais*. Recife PE. UFRPE, Imprensa Universitária. pp. 61-92.

Supriadi D, Karden M, Sitepu D (2001) Bacterial wilt disease of woody trees caused by *Pseudomonas solanacearum*: a review. *Jurnal Litbang Pertanian Local* 20:106-112.

Teng YC, Tzeng KC, Hsu ST (2006) Induction of systemic resistance in tomato against bacterial wilt by a plant growth-promoting rhizobacterium *Streptomyces* sp. RS70. *Plant Pathology Bulletin* 15:107-116.

Trigalet A, Frey P, Trigalet-Demery D (1993) Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: state of the art and understanding. In Hayward A, Hartman GL (Eds.) *Bacterial wilt: the disease and its causative agent Pseudomonas*. pp. 225-233.

van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.

Venugopalan V, Singh B, Verma N, Nahar P, Bora TC, Das RH, Gautam HK (2008) Screening of thermophiles from municipal solid waste and their selective antimicrobial profile. *Current Research in Bacteriology* 1:17-22.

Watanabe K, Nagao N, Yamamoto S, Toda T, Kurosawa N (2007) *Thermobacillus composti* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a composting reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:1473-1477.

CAPÍTULO 3

Estudo da interação de *Ralstonia solanacearum* R3bv2T com diferentes tipos de solo, no desenvolvimento do híbrido “urograndis” (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*)

RESUMO

Alguns solos são condutivos e outros supressivos à murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, o que provavelmente envolve características físicas, químicas e biológicas. A interação entre *R. solanacearum* e cinco diferentes tipos de solos (Latosolo Vermelho, Latossolo Vermelho Amarelo, Gleissolo, Cambissolo e Organossolo), no desenvolvimento de miniestacas do híbrido “urograndis”, foi avaliado ao final de quatro meses em casa de vegetação, através da análise da variação da altura e da massa seca da parte aérea e raízes. A presença da bactéria no solo prejudicou o desenvolvimento das plantas ao se comparar os tratamentos e suas respectivas testemunhas, com exceção do peso seco da raiz no cambissolo onde o solo com a bactéria mostrou média maior no desenvolvimento e estatisticamente significativa. O organossolo foi o que mais se destacou no peso seco da parte aérea e raízes. Além deste, o cambissolo também mostrou um bom resultado quanto ao peso seco de raízes, ao garantir melhores condições para as plantas resistirem ao ataque da bactéria. Os latossolos, que são os mais utilizados para plantio de eucalipto no Brasil, foram considerados condutivos ao patógeno.

Palavras-chave: murcha bacteriana do eucalipto, miniestacas, condutividade, supressão.

Study of the interaction between *Ralstonia solanacearum* R3bv2T and various types of soil, in the development of the hybrid “urograndis”

ABSTRACT

Some soils are conducive and others suppressive to bacterial wilt, which probably involves physical, chemical and biological characteristics. Interaction between *Ralstonia solanacearum* and five different types of soils (red latosol, yellow-red latosol, gleysol, cambisol and organosol), in the development of mini-cuttings of the hybrid “urograndis”, was evaluated at the end of four months in a greenhouse, by means of variation analysis of the height and the dry weight of the aerial part and roots. The presence of the bacterium in the soil hampered development of the plants, when the treatments and their respective controls were compared, except for root dry weight in the cambisol, where the soil with the bacterium showed a higher and statistically significant mean. The organosol stood out with regard to dry weight of the aerial part, differing statistically from the others. Moreover, the cambisol also showed a good result regarding root dry weight, in terms of providing better conditions for the plants to resist bacterial attack. The latosols, which are most used for planting eucalyptus in Brazil, were considered conducive to the pathogen.

Key words: bacterial wilt, mini-cuttings, conduciveness, suppression.

INTRODUÇÃO

São frequentes os questionamentos sobre o impacto do eucalipto quanto ao esgotamento da fertilidade ou possível erosão e compactação do solo. Monitoramento realizado pela Aracruz, entre os anos de 1996 e 2002, no Espírito Santo, mostrou que as perdas de solo nas plantações de eucalipto são muito abaixo dos limites de tolerância estimados e menores também que os relatados para algumas das principais culturas agrícolas plantadas na região (Aracruz, 2008).

O solo é o elemento do habitat que mais influencia o crescimento das plantas e, entre seus principais atributos, encontram-se: textura, estrutura, temperatura, pH, fertilidade, umidade e aqueles relacionados com o material de origem (Pritchett & Fisher 1979). O crescimento vegetal está relacionado à densidade do solo além de fatores, tais como: tipo de solo, manejo, exigências, espécies e estágio de desenvolvimento da planta (Borges et al., 1988). Segundo Silva et al. (2006), há aumento da densidade dos solos em resposta à compactação, sendo a manifestação deste efeito intensificada com o aumento da umidade do solo.

Em geral, a atividade florestal é destinada a solos arenosos e de baixa fertilidade, possuindo, muitos deles, níveis de elementos considerados tóxicos para as plantas. Baixo pH combinado com altas concentrações de alumínio em solos pode ser um dos principais fatores de declínio de florestas. A acidificação pode reduzir o crescimento de raízes e a absorção de nutrientes essenciais do solo (Persson & Madji, 1995).

A distribuição dos principais tipos de solos utilizados nos plantios de eucalipto é a seguinte: Latossolos distróficos ou álicos 64%; Podzólicos distróficos ou álicos 16%; Cambissolos e Litossolos 10%; Areia Quartzosa 5%; Terra Roxa, Podzólicos e Latossolos eutróficos 2,5% e outros 2,5%. As características dos Latossolos distróficos ou álicos são: grande intemperização; riqueza em sesquióxidos de Fe e Al; baixo teor de nutrientes e baixa reserva mineral; acidez elevada; altos teores de Mn e Al; elevada capacidade de fixação de P; baixa saturação por bases, elevada permeabilidade e baixa erodibilidade (Silveira et al., 2001).

De uma forma geral, as espécies florestais plantadas no Brasil são tolerantes à acidez do solo (Bellote, 2003). Dessa forma, apesar da elevada acidez dos solos do cerrado algumas espécies do gênero *Eucalyptus* apresentam tolerância às altas concentrações de alumínio na solução do solo, a baixa exigência nutricional e a níveis

críticos de cálcio e magnésio inferiores aos estabelecidos para a maioria das culturas (Barros & Novais, 1999).

Sabe-se que o estágio nutricional da planta pode aumentar ou diminuir a resistência contra pragas e doenças (Auer & Krugner, 1997), variando de acordo com o nutriente, espécie hospedeira e patógeno (Silveira & Higashi, 2003), embora a resistência a doenças seja geneticamente controlada, ela é consideravelmente influenciada por fatores ambientais. A nutrição mineral é um fator ambiental que pode ser facilmente controlado em sistemas agrícolas (Spann & Schumann, 2010).

A insuficiência na quantidade de um determinado elemento químico essencial para a vida da planta, ou combinações que o tornem pouco disponível, provocará distúrbios no metabolismo, que podem ser evidenciados externamente, através da diminuição do crescimento, clorose foliar ou outras anomalias (Epstein, 1975). Geralmente, é difícil determinar se os efeitos adversos, por exemplo, da acidificação do solo no crescimento e desenvolvimento de plantas são atribuídos à alta concentração de alumínio ou de H^+ , porém, hipóteses sugerem que os efeitos da acidificação do solo em essências florestais são relacionados tanto ao baixo pH, como aos metais fitotóxicos dissolvidos, como o alumínio (Basso et al., 2003).

No caso do cancro do eucalipto (*Chrysosporthe cubensis* [Bruner] Hodges), além dos fatores climáticos, fatores edáficos e topográficos também foram apontados como condicionadores da ocorrência dessa doença. Informações generalizadas acerca dos efeitos de nutrientes sobre a suscetibilidade ou resistência à doença devem ser verificadas quanto à sua validade para o patossistema que se está trabalhando (Auer & Krugner, 1997).

Avaliando em cultura *in vitro* o efeito do alumínio no crescimento de brotos de eucalipto, através dos teores de nutrientes e de proteínas solúveis totais no material vegetal, Basso et al. (2003) observaram que houve uma indisponibilização de nutrientes como cálcio, fósforo e potássio, causada pela adição de doses crescentes de alumínio ao meio de cultura. Além de um comprometimento do metabolismo celular, ocasionando alterações morfológicas na parte aérea (escurecimento, formação de calos e brotações pouco friáveis), acúmulo de massa seca e redução de proteínas solúveis totais.

Em trabalho visando o estudo do crescimento de mudas de *E. globulus* subsp. *maidenii* em resposta a diferentes doses de NPK, originadas da combinação de fertilizantes de liberação rápida e lenta, Pezzutti et al. (1999) verificaram que o crescimento das plantas respondeu positivamente à fertilização NPK.

Alguns solos são condutivos e outros supressivos à murcha bacteriana, o que provavelmente envolve características físicas, químicas e biológicas. Segundo Hayward (1991), essas informações ainda não são claras. Via de regra, alta umidade do solo favorece a murcha bacteriana. A sobrevivência do patógeno é grande em solos molhados e drenados, mas não em solos afetados pela dessecação ou inundação. Em geral, solos argilosos ou arenosos provocam distúrbios fisiológicos e predisõem as árvores à ação de patógenos (Appel & Stipes, 1984).

Estudando a sobrevivência de *Ralstonia solanacearum* das biovars 2 e 3 no solo, Moffett et al. (1983) observaram que o declínio da população bacteriana foi maior em solos argilosos do que em arenosos. No Suriname a murcha em tomate não ocorre na planície costeira devido às conchas do mar, que são ricas em cálcio, mas ocorre em terrenos arenosos e argilosos (Power, 1983). Abdullah et al. (1983) mostraram em estudos em casa de vegetação que a incidência da murcha do amendoim foi maior em solos com alto teor de argila. Contrariamente, na China, a murcha nesta mesma planta ocorre principalmente em solos arenosos (He, 1990). Em solos orgânicos (com mais de 65% matéria orgânica) a incidência da doença é normalmente baixa, exceto em áreas altamente infestadas e áreas onde o sistema de drenagem é ineficiente (Abdullah, 1993). Solos com pH 5,2 foram considerados supressivos e solos argilosos condutivos a murcha bacteriana do pimentão, segundo Felix (2009).

Torna-se necessária a descrição detalhada dos solos, suas propriedades química, física e fatores biológicos que possam estar envolvidos na supressão da doença. Em geral, a informação disponível é dispersa, fragmentada e muitas vezes contraditória (Hayward, 1991). Diante disso, foi objetivo deste trabalho: investigar a interação da **R3bv2T** de *R. solanacearum* com cinco diferentes tipos de solos no desenvolvimento do híbrido “urograndis” de eucalipto.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras de solo e análise química

Em março de 2010 foram coletados cinco diferentes tipos de solos previamente georreferenciados (Lacerda et al., 2007), na profundidade de 0-20 cm, na Fazenda Água Limpa, da Universidade de Brasília (Núcleo Rural Vargem Bonita, DF). Foram eles:

Latossolo Vermelho Amarelo (LVA), Latossolo Vermelho (LV), Cambissolo (CAMB), Gleissolo Melânico (GLEI) e Organossolo (ORGA).

Amostras dos solos foram enviadas para análise físico-química e granulométrica na empresa SOLOQUÍMICA – Análises de Solo Ltda (CNPJ – 00.617.340/0001-66).

Local de realização dos ensaios

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, da Estação Experimental de Biologia, da Universidade de Brasília (UnB), no período de junho de 2011 a novembro de 2011.

Delineamento experimental

Aproximadamente 3 kg de cada tipo de solo foram distribuídos em 31 vasos de alumínio e em seguida autoclavados. Os solos foram utilizados da forma que foram coletados, sem adubação ou correção. Miniestacas de eucalipto já enraizadas do clone CG100 (híbrido “urograndis”), obtidas da Fazenda Mirim (Núcleo Rural Sobradinho II Lote 18 Sobradinho – DF, CNPJ 00.437.780/0001-31), foram transplantadas dos tubetes para os respectivos vasos e tipos de solos.

Após sete dias, foram feitos ferimentos (com o uso de uma faca de mesa pontiaguda), nas raízes e em seguida adicionou-se 50 mL de uma suspensão de aproximadamente 10×10^8 UFC/mL (equivalente a Escala 7 de McFarland) da estirpe UnB 1359 de *Ralstonia solanacearum* (Raça 3 biovar 2T, de eucalipto). Durante os 4 meses foram feitas pelo menos 8 aplicações a cada 15 dias da suspensão bacteriana citada, simulando o proposto por Mafia (2006) para manutenção da população bacteriana.

O delineamento utilizado para cada experimento foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos (tipos de solo) constituídos de 31 repetições (parcelas experimentais), das quais 22 foram inoculadas com a bactéria e 9 não inoculadas como testemunhas, totalizando 155 repetições. Após 4 meses da inoculação foram avaliados os parâmetros: variação entre a altura inicial e final e massa seca da parte aérea e raiz. E então, os dados foram relacionados com a análise química dos solos.

Observação dos sintomas e reisolamento

Duas semanas antes do fim do experimento foram plantadas mudas de tomate (cv. ‘St. Cruz’) em cada vaso contendo os tratamentos com a bactéria inoculada, como um comparador suscetível. Ao final do experimento foram amostradas 5 plantas de tomate e 5 plantas de eucalipto por parcela dos quais foram retiradas amostras para tentativa de reisolamento da bactéria.

Análise estatística

Os dados do ensaio foram submetidos a análise de variância (ANOVA), utilizando o programa Assistat 7.6 beta (Silva & Azevedo, 2009). Os valores médios de peso seco da variação na altura e da parte aérea e raízes foram comparados pelo teste de **T** ou **Scott-Knott**, dependendo do caso, ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Análise química dos solos

Em todos os cinco tipos de solos analisados os teores de matéria orgânica estavam nos níveis adequados (LV e LVA) ou foram considerados alto (gleissolo, cambissolo e organossolo). Dentre os micronutrientes analisados, níveis baixos de boro foram observados somente no organossolo; muito baixo de cobre no LV, LVA, gleissolo e organossolo; baixos níveis de ferro no LVA; baixo e muito baixos de manganês no LV, LVA, cambissolo e organossolo; muito baixo de zinco apenas no LVA e cambissolo e níveis médios de enxofre em todos os tipos de solo. Quanto aos macronutrientes, níveis baixos de cálcio, magnésio e fósforo foram observados em todos os solos, exceto organossolo; foram considerados baixos os níveis de sódio em todos os tipos; níveis de potássio foram médios a altos e os níveis de alumínio foram de

média toxidez no LV e organossolo e alta toxidez no LVA, gleissolo e cambissolo (**Tabela 1**).

O pH esteve muito ácido em todos os tipos de solo, exceto no organossolo que apresentou média acidez. A acidez (H + Al) foi considerada de alta toxidez em todos os solos. A soma das bases e a saturação por bases (V) foi muito baixa e baixa, exceto no organossolo que foi média. A CTC foi adequada em LV e LVA e alta no gleissolo, cambissolo e organossolo e o carbono orgânico adequado no LV, LVA e alto no gleissolo, cambissolo e organossolo (**Tabela 1**).

Observação dos sintomas e reisolamento

As plantas, oriundas de miniestacas, não apresentaram sintoma de murcha típico durante os quatro meses de realização do experimento, mas algumas exibiram sintomas de arroxamento e manchas nas margens da folha (**Figuras 1A**) e arroxamento de nervuras (**Figuras 1B**). Entretanto, dessas plantas não foi possível reisolamento da bactéria. Por outro lado, as mudas de tomates plantadas nos vasos, junto às mudas de eucalipto, exibiram sintomas de murcha, amarelecimento e lesões encharcadas nas folhas (**Figuras 1C e D**), sendo que de todas as 25 plântulas amostradas a bactéria foi reisolada em altas concentrações (**Figura 1E**).

TABELA 1 - Características química, física e granulométrica dos solos utilizados neste estudo.

Análise Físico-Química	LV	LVA	GLEI	CAMB	ORGA⁶
TEXTURA					
Argila (g/kg)	325	325	125	525	200
Areia (g/kg)	600	450	675	275	450
Silte (g/kg)	75	225	200	200	350
COMPLEXO SORTIVO					
pH em H₂O	4,8	4,6	4,4	4,9	5,2
P (mg/dm³)	1,6	0,2	3,7	0,9	18,1
Ca (cmol_c/dm³)	0,2	0,2	0,2	0,2	2,5
Mg (cmol_c/dm³)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,6
K (cmol_c/dm³)	0,07	0,08	0,12	0,16	0,22
Na (cmol_c/dm³)	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03
Al (cmol_c/dm³)	1,0	1,4	1,5	2,4	1,0
H + Al (cmol_c/dm³)	8,4	5,8	9,0	9,7	8,4
SB¹ (cmol_c/dm³)	0,38	0,39	0,43	0,48	3,35
CTC (cmol_c/dm³)	8,78	6,19	9,43	10,18	11,75
V² (cmol_c/dm³)	4	6	5	5	29
S Al³ (%)	72,5	78,2	77,7	83,3	23,0
S Na⁴ (%)	2,6	2,6	2,3	4,2	0,9
CO (g/kg)	24,9	25,9	53,6	34,0	43,5
MO⁵ (g/kg)	42,8	44,5	92,2	58,5	74,8
MICRONUTRIENTES					
B (mg/dm³)	0,42	0,47	0,37	0,36	0,27
Cu (mg/dm³)	0,25	0,24	0,25	0,81	0,11
Fe (mg/dm³)	43,2	10,3	22,9	37,5	203
Mn (mg/dm³)	3,04	2,53	5,97	2,3	1,5
Zn (mg/dm³)	0,84	0,4	0,87	0,42	0,56
S (mg/dm³)	6,8	8,4	8,7	5,5	5

¹Soma das bases ²Saturação por bases; ³Saturação por alumínio ⁴Saturação por sódio;

⁵Matéria orgânica; ⁶LV: Latossolo Vermelho, LVA: Latossolo Vermelho Amarelo, GLEI: Gleissolo, CAMB: Cambissolo e ORGA: Organossolo.

Análise estatística

A análise conjunta da altura, dentre testemunhas (controle negativo CN) e respectivos tratamentos com a bactéria, revelou que de maneira geral a presença do patógeno no solo prejudicou o desenvolvimento das plantas, com única exceção no peso seco da raiz do cambissolo, onde o solo com a bactéria mostrou média significativamente maior. Embora no restante dos solos somente o CN da altura e peso seco da parte aérea do LV, LVA e organossolo se diferiram estatisticamente. Dessa forma, os CNs do organossolo e do LVA proporcionaram o melhor desenvolvimento em altura das plantas, sendo estatisticamente iguais. O CN do LVA, por conseguinte foi estatisticamente semelhante ao CN do LV, que foi semelhante ao CN do cambissolo. Este último não mostrou diferença estatística entre o tratamento com a bactéria do organossolo e cambissolo, que foram semelhantes ao CN do gleissolo e por último não mostrou diferença com os demais tratamentos com a bactéria: LVA, gleissolo e LV.

Quanto ao peso seco da parte aérea o CN do organossolo diferiu estatisticamente dos demais, mostrando maiores médias. Seguido do tratamento com a bactéria do mesmo solo, do CN do LVA, CN do gleissolo, CN do LV, dos tratamentos do gleissolo, respectivo e CN cambissolo, do tratamento do LVA, que por fim foi sucessivamente semelhante ao tratamento do LV.

A análise conjunta do peso seco da raiz revelou que o CN do organossolo e os tratamentos do organossolo e cambissolo propiciaram melhores desenvolvimentos das raízes, diferindo-se estatisticamente. Seguidos do CN do LVA, que foi sucessivamente semelhante a todos os demais (**Tabela 2**).

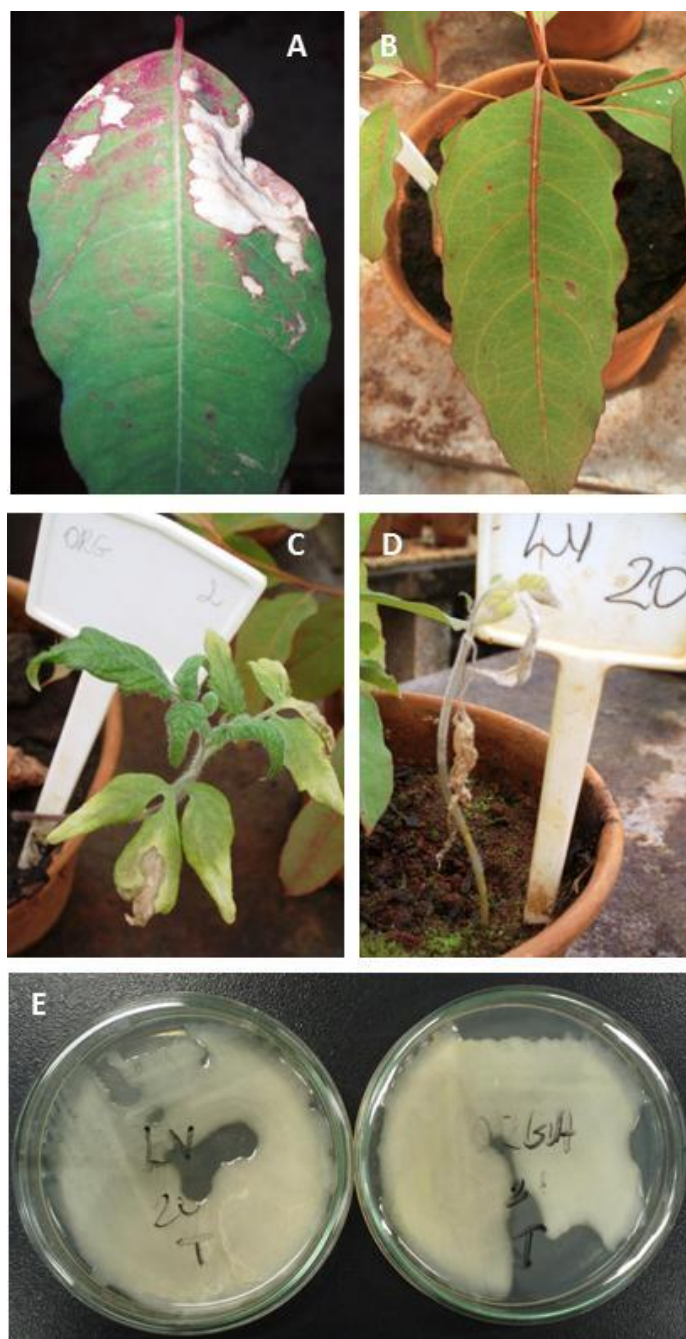


FIGURA 1 - Sintomas incitados pela estirpe UnB 1359 da **R3bv2T** de *Ralstonia solanacearum* em plantas oriundas de miniestacas do híbrido “urograndis” de eucalipto (A, B) e em plântulas de tomate (C-E). **A.** arroxamento esparsos e lesões marginais no limbo foliar e **B.** arroxamento da nervura de folhas. Sintomas de murcha e amarelecimento em plântulas de tomate, plantadas nos vasos junto aos eucaliptos: **C.** lesões encharcadas nos bordos das folhas em tratamento do organossolo; **D.** murcha e amarelecimento em plântula do tratamento do Latossolo Vermelho e **E.** bactéria reisolada das plântulas de tomate em altas concentrações, a esquerda do tratamento do Latossolo Vermelho e a direita do organossolo.

TABELA 2 - Influência da relação tipo de solo *versus* *Ralstonia solanacearum*, sobre a altura e massa seca da parte aérea e raízes do híbrido “urograndis”.

Tratamentos	Variação Altura		PS PA ¹		PS Raiz
	(cm) ³		(g) ³		(g) ³
Cambissolo	17,84	de ⁶	3,57	def	2,86ab
CN cambissolo	19,27	cd	3,69	def	2,02 c
LV	14,84	f	2,85	f	1,98 c
CN² LV³	20,38	bc	4,07	cde	2,15 c
LVA⁴	16,15	f	3,22	ef	2,04 c
CN LVA	22,05	ab	4,94	bc	2,44 bc
Organossolo	18,15	de	5,79	b	3,34a
CN organossolo	23,38	a	7,43	a	3,41a
Gleissolo	15,54	f	3,73	de	1,92 c
CN gleissolo	16,61	ef	4,46	cd	1,99 c
Média (g)	17,62		4,15		2,42
CV⁵ (%)	15,80		28,33		36,72

¹PA: Parte aérea, PS: Peso seco; ²Controle Negativo; ³Latossolo Vermelho; ⁴Latossolo Vermelho Amarelo; ⁵Coefficiente de variação; ⁶Valores seguidos pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem significativamente ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de **T**.

Considerando só os tratamentos com a bactéria (**Tabela 3**) foi possível observar, quanto à altura, que o cambissolo e organossolo formaram um grupo que diferiu estatisticamente dos demais. Analisando agora o peso seco da parte aérea, o organossolo comportou-se melhor, dando mais condições para as plantas resistirem ao ataque da bactéria, formando um grupo isoladamente. Por fim, o observado na altura se repetiu no peso seco de raiz, onde o organossolo e também o cambissolo formaram um único grupo diferindo estatisticamente do restante.

TABELA 3 - Influência da relação tipo de solo versus *Ralstonia solanacearum* sobre a altura e massa seca da parte aérea e raízes do híbrido “urograndis”, comparando-se apenas os tratamentos com a bactéria.

Tratamentos	Varição Altura (cm)	PS PA¹ (g)	PS Raiz (g)
Cambissolo	17,84a ⁵	3,57 b	2,87a
LV²	14,79 b	2,90 b	1,98 b
LVA³	16,15 b	3,24 b	2,04 b
Organossolo	18,15a	5,79a	3,34a
Gleisolo	15,54 b	3,73 b	1,92 b
Média (g)	16,27	3,84	2,43
CV (%)⁴	19,12	32,59	39,15

¹PA: Parte aérea, PS: Peso seco; ²Latossolo Vermelho; ³Latossolo Vermelho Amarelo; ⁴Coefficiente de variação; ⁵Valores seguidos pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de **Scott-Knott**.

Uma análise final somente das testemunhas (CN) permitiu observar que na altura o grupo formado por organossolo, LVA e LV diferiu estatisticamente dos outros dois tratamentos. Já quanto a massa seca da parte aérea e raízes o organossolo destacou se sozinho, diferindo dos demais ao propiciar o melhor desenvolvimento das plantas (**Tabela 4**).

TABELA 4 - Influência do tipo de solo sobre a altura e massa seca da parte aérea e raízes do híbrido “urograndis”.

Tratamentos	Variação Altura (cm)	PS PA¹ (g)	PS Raiz (g)
Cambissolo	19,27 b ⁵	3,69 b	2,02 b
LV²	20,66a	4,07 b	2,15 b
LVA³	22,05a	4,91 b	2,44 b
Organossolo	23,38a	7,41a	3,41a
Gleissolo	16,61 c	4,46 b	1,99 b
Média (g)	16,27	3,84	2,43
CV (%)⁴	19,12	32,59	39,15

¹PA: Parte aérea, PS: Peso seco; ²Latossolo Vermelho; ³Latossolo Vermelho Amarelo; ⁴Coefficiente de variação; ⁵Valores seguidos pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de **Scott-Knott**.

DISCUSSÃO

O presente trabalho baseou-se no modelo proposto por Mafia (2006) ao inocular uma suspensão bacteriana a cada 15 dias no solo, de forma que mantivesse a população do patógeno a níveis que levassem a expressão dos sintomas. Mesmo assim não foi possível recuperar a bactéria das plantas de eucalipto amostradas. Foram observados sintomas da bacteriose em algumas plântulas de eucalipto, tais como: arroxamento das nervuras foliares e lesões no limbo foliar, escuras e irregulares, assim como descrito por Mafia (2006), além de diferenças estatisticamente significativas de matéria seca, indicando a ação da bactéria sobre as plantas. Segundo Janse (1988), a detecção não é eficiente, especialmente quando a densidade populacional do patógeno é baixa ou em condições de infecção latente, estágio de dormência ou estágio de célula viável, mas não cultivável (VMNC). A expressão dos sintomas, aparentemente, depende da colonização, condições ambientais e ou do nível de debilitação da planta (Mafia, 2006), condições

que talvez não tenham sido atingidas no período de realização do experimento, somando-se ao fato de que foi utilizado solo autoclavado nos experimentos o que poderia ter levado a bactéria ao estágio viável, mas não cultivável. Nesse estágio, a bactéria parece não ser capaz de induzir o sintoma de murcha (van Overbeek et al., 2004). A partir das plantas de tomate, utilizadas como um comparador suscetível, assim como descrito por Mafia (2006), foi possível observar sintomas típicos de murcha e reisolar a bactéria em altas concentrações.

Outro fator a ser considerado é a temperatura média que em Brasília - DF variou entre 19 e 22 °C entre os meses de junho e novembro de 2011 (<http://br.weather.com/weather/climatology/BRXX0043>), nos quais foi realizado este estudo. O incremento da temperatura aumenta a incidência e início de murcha em geral, mas não em todos os isolados do patógeno. A resistência é temperatura-sensível e isolado-específico (Hayward, 1991). Para estirpes do patógeno adaptado a regiões tropicais, a temperatura ótima varia entre 25 e 35 °C (Takatsu & Lopes, 1997). Em um isolado da R3bv2 de clima temperado foi observada perda de virulência e indução de um estágio viável, mas não cultivável a 4 °C, mas ele manteve o número de células iniciais a 20 °C (van Overbeek et al., 2004). Segundo estudo realizado por Milling et al. (2009), a R3bv2 de clima temperado é mais virulenta a tomate a 20 °C do que a R3bv1 de clima tropical, mas ambas são altamente virulentas a 28°C. Dessa forma, a não observação de sintomas típicos da **R3bv2T** na murcha do eucalipto também pode estar associada a falta de condições ambientais favoráveis.

Segundo Supriadi et al. (2001), existem dois tipos da enfermidade: a aguda que leva de 2-4 semanas para morte das plantas, após surgimento dos sintomas e a crônica que progride mais lentamente de 2-6 meses. Assim como observado por Mafia (2006), foi possível confirmar a presença da bactéria no solo e recuperá-la de mudas de tomate plantadas junto aos eucaliptos nos vasos, já que são mais suscetíveis a bacteriose, apresentando sintomas típicos de murcha, amarelecimento e intensa colonização bacteriana.

A análise estatística revelou que o organossolo foi o tratamento com melhores médias de peso seco para parte aérea e o organossolo e cambissolo propiciaram melhor desenvolvimento das raízes. Os organossolos são solos hidromórficos com um teor de matéria orgânica superior a 65%. São mais ácidos que os solos minerais, são pouco profundos, mal drenados, de coloração escura, com elevados teores de C orgânico, ácidos, elevada CTC e baixo V % (Embrapa, 2009), concordando com a análise química

realizada. Sabe-se que *Ralstonia solanacearum* tolera a alta umidade, mas não o encharcamento, como esse solo tem como característica o fato de ser mal drenado a sobrevivência da bactéria pode ter sido reduzida, o que explica o maior desenvolvimento das plantas nesse tratamento.

Ao contrário, os cambissolos são bem drenados, constituídos por material mineral, com horizonte B incipiente que pode ser em blocos, granular ou prismática. Entretanto devido à heterogeneidade do material de origem, das formas de relevo e das condições climáticas, as características destes solos variam muito de um local para outro (Embrapa, 2009). Estão entre os solos nos quais são cultivados eucalipto no Brasil.

Como não foram feitas adubações ou correções nos solos utilizados e segundo a análise química, física e granulométrica, todos os tipos provavelmente estiveram abaixo das necessidades nutricionais do cultivo de eucalipto. A adubação nesta cultura visa principalmente o fornecimento de fósforo, cobre e zinco. Analisando os dois tratamentos que se destacaram e avaliando o cobre e zinco, por exemplo, a recomendação para o eucalipto, de acordo com o teor destes micronutrientes no solo (camada de 0-20 cm), seria de 1 kg/ha de cobre para o organossolo, ao contrário do cambissolo que esteve em níveis adequados, não necessitando de adubação com este elemento. Doses de 0,5 e 1 kg/ha de zinco seriam recomendadas para organossolo e cambissolo, respectivamente. A recomendação de acordo com o teor de argila e fósforo disponível seria de 120 kg/ha no cambissolo e 20 kg/ha no organossolo de P_2O_5 . E ainda seriam necessários 3 kg/ha de boro para os dois tipos de solo (Silveira et al., 2001).

Como dito anteriormente, a atividade florestal é destinada a solos arenosos e de baixa fertilidade (Persson & Madji, 1995). Contudo, graças às baixas exigências de fertilidade do solo e também ao programa de melhoramento genético conduzido no Brasil, em que se procura adaptar as espécies às condições edafoclimáticas da região, as florestas de eucaliptos e pinus têm se mostrado produtivas, mesmo com recomendações de adubação bem aquém daquelas utilizadas para as culturas agrícolas (Gonçalves, 1995). Outros fatores, como a fertilidade, acidez e compactação do solo podem ser corrigidos através do manejo adequado do solo (Higa et al., 2000).

Considerando agora a fertilidade natural dos solos, o organossolo e o cambissolo possuem os maiores teores de Ca e K disponíveis. Tais macronutrientes são associados à resistência ao ataque de parasitas, importantes na formação de barreiras a infecção (Spann & Schumann, 2010) através da cicatrização das injúrias, estabilidade, (Silveira

& Higashi, 2003) e fortalecimento da parede celular (Huber, 1980). Segundo Hayward (1991), a murcha em tomate não ocorre na costa do Suriname devido as conchas do mar, ricas em cálcio. Além disso, a deficiência de potássio pode afetar a síntese de proteínas associadas a defesa das plantas (Marschner, 1995). Silva (2007) estudando a influência de nutrientes na incidência e na severidade da mancha foliar do eucalipto (*Xanthomonas axonopodis*) observou que quanto maior o nível de potássio menor a intensidade da doença.

Segundo van Veen et al. (1997), fatores abióticos como, por exemplo, temperatura, pH, umidade e tipo de solo, além de bióticos tais como, presença e atividade de organismos predadores, antagonistas e/ou competidores, podem influenciar a sobrevivência da bactéria no solo. Os fatores bióticos não poderiam ser levados em consideração neste estudo, já que os solos foram autoclavados. Outras características físicas e químicas do solo, tais como teor de matéria orgânica, macro e micronutrientes, estrutura e textura, tipo e porcentagem de argila, retenção de água, condutividade elétrica, nitrogênio, atuam na supressividade de patógenos de solo, reduzindo a densidade de inóculo e suas atividades saprofitas, ou da doença restringindo a severidade, mesmo em alta densidade de inóculo e longa sobrevivência do patógeno (Bettiol & Ghini, 2005; Prado, 2005).

O boro, que é um elemento associado à proteção contra rachaduras e fissuras (Silveira & Higashi, 2003), importante na síntese de ácidos nucleicos, alongamento celular, respostas hormonais, não teve correlação neste estudo, pois nos solos avaliados era de média disponibilidade, exceto no organossolo que foi baixo. O cobre, cofator de enzimas (Taiz & Zeiger, 2004) é também ligado a processos como a lignificação e ação antimicrobiana, foi muito baixo nos solos, exceto no cambissolo em que tais níveis foram maiores. Assim como o manganês que esteve em baixa quantidade nestes solos.

Com relação à acidez (pH), os solos caracterizaram-se por serem muito ácidos e pela alta toxidez por alumínio que geralmente reduz o crescimento de raízes e a absorção de nutrientes essenciais do solo (Persson & Madji, 1995), exceto pelo organossolo que apresentou média acidez e toxidez por alumínio e maior desenvolvimento de raízes. *In vitro*, doses crescentes de Al levaram a indisponibilização de nutrientes como cálcio, fósforo e potássio, comprometimento do metabolismo celular, ocasionando alterações morfológicas na parte aérea, acúmulo de massa seca e redução de proteínas solúveis totais em brotações de *E. grandis* x *E. urophylla* (Basso et al., 2003). *R. solanacearum* suporta ambientes com pH em torno de 5,6-8,4 (Kelman,

1953). Segundo Ho et al. (1988), solos com baixo pH de Taiwan tendem a ser menos favoráveis a sobrevivência do patógeno. O solo considerado mais condutivo a bactéria por Felix (2009) apresentou o mesmo pH (5,2) que o organossolo considerado como o que menos favoreceu a murcha.

Avaliando a incidência do mal-do-panamá (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*), Lopes et al. (2008) observaram que o pH, Ca e Al são os elementos mais importantes sob o ponto de vista do equilíbrio nutricional e severidade da doença. O valor de 0,4 cmol_c/dm³ de Al em termos de acidez já comprometeria o sistema radicular predispondo a raiz ao ataque do patógeno. O pH de 5,1 e baixos níveis de Ca foi associado à planta doente.

Solos argilosos ou arenosos, geralmente, provocam distúrbios fisiológicos e predisõem as árvores à ação de patógenos (Appel & Stipes, 1984). Os solos que levaram ao menor desenvolvimento das plantas e menor incidência da doença apresentam textura próxima da argilosa (LV e LVA) e textura arenosa (gleissolo). O solo no qual foi observado as maiores médias para parte aérea e raiz (organossolo) possui uma textura considerada média (20% argila). Já o cambissolo que também mostrou bons resultados de desenvolvimento de raízes (peso seco) possui textura argilosa (52,5% argila). Segundo Moffett et al. (1983), em solos argilosos há um declínio do patógeno, assim como observado por Prior et al. (1993) que associaram a supressividade natural de vertissolos de Guadalupe (Antilhas Francesas) ao tipo de argila e suas propriedades físico-químicas e por van Elsas et al. (2000) onde a sobrevivência de *R. solanacearum* era menor em solo argiloso-arenoso. Por outro lado, solos considerados condutivos por Felix (2009) ao patógeno, apresentaram quantidades entre 30 e 50% de argila.

As bases trocáveis no organossolo e cambissolo apresentaram os maiores valores, assim como foi observado por Felix (2009) que foram baixos valores, mas para solos condutivos. Ainda segundo Felix (2009), os solos que foram considerados supressivos apresentaram os maiores valores de fósforo no solo, tal qual observado neste trabalho para o organossolo.

Nos solos avaliados os que mostraram menor ação do patógeno apresentaram os maiores teores de matéria orgânica, tais solos geralmente são os mais supressivos a patógenos de solo (Bettioli & Ghini, 2005). Segundo Prior et al. (1993), em solos orgânicos a incidência da murcha bacteriana é normalmente baixa.

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostraram que o organossolo foi o tipo de solo que menos favoreceu a murcha bacteriana do eucalipto. O segundo solo que se destacou foi o cambissolo que corresponde a 10% da área plantada com eucalipto no país. Os latossolos, mais empregados no plantio desta cultura no Brasil, foram mais condutivos a doença e devem ser evitados em áreas de ocorrência da bacteriose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdullah H (1993) Bacterial Wilt in Malaysia: Hosts, disease incidence and geographical distribution. In: Hayward AC, Hartman GL (Eds.) Bacterial wilt. Canberra ACT. Aciar Proceeding. pp. 334-337.

Abdullah H, Maene LMJ, Naib H (1983) The effects of soil types and moisture levels on bacterial wilt disease of groundnut (*Arachis hypogaea*). *Pertanika* 6:26-31.

Appel DN, Stipes RJ (1984) Canker expansion on water-stressed pin oaks colonized by *Endothia gyrosa*. *Plant Disease* 68:851-853.

Aracruz (2008) Eucalipto & Meio ambiente em tempos de aquecimento GLOBAL. <http://www.aracruz.com.br/eucalipto/pt/eucalipto.html>

Auer CG, Krugner TL (1997) Influência do solo na incidência de cancro em *Eucalyptus grandis*. *Boletim de Pesquisa Florestal* 34:65-73.

Barros NF, Novais RFI (1999) Eucalipto. In: Ribeiro AC, Guimarães PTG, Alvarez VH (Eds.). *Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação*. Viçosa MG. CFSEMG/UFV. pp.303-305.

Basso LHM, Gonçalves NA, Silveira LV de A, Lima GPP (2003) Efeito do alumínio no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas *in vitro*. *Scientia Forestalis* 63:167-177.

Bellote AFJ (2003) Cultivo do Eucalipto: Nutrição, Adubação e Calagem. Embrapa Florestas Sistemas de Produção 4 ISSN 1678-8281 Versão Eletrônica. http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto/05_05_recomendacao_de_calagem.htm

Bettiol W, Ghini R (2005) Solos supressivos. In: Michereff SJ, Andrade DEGT, Menezes M (Eds.) *Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais*. Recife PE. Imprensa Universitária UFRP. pp. 125-152.

Borges EM, Novais RF, Regassi AJ, Fernandes B, Barros NF (1988) Respostas de variedades de soja à compactação de camadas de solo. *Revista Ceres* 35:553-568.

Embrapa (2009) Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro RJ. EMBRAPA-SPI.

Epstein E (1975) *Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas*. 1ª Ed. São Paulo. EDUSP.

Felix KC da S (2009) Sobrevivência de *Ralstonia solanacearum* em resto de cultura de pimentão e diferentes tipos de solo de Pernambuco, Brasil. Tese de Mestrado. Recife PE. Universidade Federal de Pernambuco.

Gonçalves JL de M (1995) Recomendações de adubação para *Eucalyptus*, *Pinus* e espécies típicas da mata atlântica. *Documentos Florestais* 15:1-23.

Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29:65-87.

He LY (1990) Control of bacterial wilt of groundnut in China with emphasis on cultural and biological properties. In: Bacterial Wilt of Ground nuts. Highlands Malaysia ACIAR Proc. pp. 22-25.

Higa RCV, Mora AM, Higa AR (2000) Plantio de eucalipto na pequena propriedade rural. Colombo PR. Embrapa Florestas. Documentos 54.

Ho WC, Chern LL, Ko WH (1988) *Pseudomonas solanacearum*-suppressive soils in Taiwan. Soil Biology and Biochemistry 20:489-492.

Huber DM (1980) The role in the mineral nutrition in defense. In: Horsfall JG, Cowling EB (Eds.) Plant pathology, an advanced treatise. New York. Academic Press. pp.381-406.

Janse JO (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. Bulletin OEPP/EPPO. Bulletin 18:343-351.

Kelman A (1953) The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: A review and bibliography. North Carolina. Agricultural Experiment Technical Bulletin.

Lacerda MPC, Barbosa IO, Campos PM, Papa R de A (2007) Utilização de sensoriamento remoto para o estabelecimento de relações entre vegetação nativa e classes de solos em mapeamento pedológico, Distrito Federal. Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. Florianópolis SC. INPE. pp. 3991-3996. <http://marte.dpi.inpe.br/col/dpi.inpe.br/sbsr@80/2006/11.16.01.59/doc/3991-3996.pdf>

Lopes BE, Brito CH de, Albuquerque IC, Oliveira RB de (2008) Influência de fatores químicos do solo sobre a incidência do mal-do-Panamá na bananeira cv. *pacovan* na Paraíba. Revista de Biologia e Ciências da Terra 8:99-109.

Mafia RG (2006) Sintomatologia, etiologia e controle da murcha bacteriana do eucalipto. Tese de Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa.

Marschner H (1995) The mineral nutrition of higher plants. 2nd Ed. London. Academic Press.

Milling A, Meng F, Denny TP, Allen C (2009) Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Phytopathology* 99:1127-1134.

Moffett ML, Giles JE, Wood BA (1983) Survival of *Pseudomonas solanacearum* biovars 2 and 3 in soil: effect of moisture and soil type. *Soil Biology and Biochemistry* 15:587-591.

Persson H, Madjji H (1995) Effects of acid deposition on tree roots in Swedish forest stands. *Water, Air and Soil Pollution* 85:1287-1292.

Pezzutti RV, Scnumacher MV, Hoppe JM (1999) Crescimento de mudas de *Eucalyptus globulus* em resposta à fertilização NPK. *Ciência Florestal* 9:117-125

Power RH (1983) Relationship between the soil environment and tomato resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) 4. Control methods. *Surinaamse Landbouw* 31:39-47.

Prado H (2005) Ambientes de produção de cana-de-açúcar na região Centro-Sul do Brasil. *Encarte de Informações Agronômicas* 110:12-17.

Prior P, Beramis M, Clairon M, Quiquampoix H, Robert M, Schmit J (1993) Contribution to integrated control against bacterial wilt in different pedoclimatic situations: Guadeloupe experience. In: Hayward AC, Hartman GL (Eds.) *Bacterial wilt*. Canberra ACT. *Aciar Proceeding*. pp. 294-304.

Pritchett W L, Fisher RF (1979) Properties and management of forest soils. 1st Ed. New York. J Wiley.

Silva F de AS, Azevedo CAV de (2009) Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: *World Congress on Computers in Agriculture 7*. Reno-

NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.
<http://www.assistat.com/indexp.html>

Silva AG da (2007) Influência de nutrientes na incidência e severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis*. Viçosa MG. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

Silva SR, Barros NF de, Eliel J, Boas BV (2006) Crescimento e nutrição de eucalipto em resposta à compactação de latossolos com diferentes umidades. Revista Brasileira de Ciência do Solo 30:759-768.

Silveira RLV da A, Higashi EN (2003) Aspectos nutricionais envolvidos na ocorrência de doenças com ênfase para o eucalipto. Circular Técnica IPEF 200.

Silveira RLV da A, Higashi EM, Sgarbi F, Muniz MRA (2001) Seja o doutor do seu eucalipto. Patafos Informações Agronômicas Nº 93.

Supriadi D, Karden M, Sitepu D (2001) Bacterial wilt disease of woody trees caused by *Pseudomonas solanacearum*: a review. Jurnal Litbang Pertanian Local 20:106-112.

Spann TM, Schumann AW (2010) Mineral nutrition contributes to plant disease and pest resistance. The institute of food and agricultural sciences extension. University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/HS/HS118100.pdf>

Taiz L, Zeiger E (2004) Fisiologia Vegetal. 3ª Ed. São Paulo. Artmed.

Takatsu A, Lopes CA (1997) Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas futuras de controle. Horticultura Brasileira 15:170-177.

van Elsas JD, Kastelein P, van Bekkum P, van Der Wolf JM, Vries PM, van Overbeek LS (2000) Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. Phytopathology 90:1358-1366.

van Overbeek LS, Bergervoet JHW, Jacobs FHH, van Elsas JD (2004) The low-temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2. *Phytopathology* 94:463-469.

van Veen JA, van Overbeek LS, van Elsas JD (1997) Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61:121-135.

CAPÍTULO 4

Avaliação da suscetibilidade, *in vitro*, de diferentes espécies de *Eucalyptus* a R3bv2T de *Ralstonia solanacearum*

RESUMO

A busca por resistência genética é a abordagem mais efetiva para a redução da severidade da doença, levando em consideração a aplicação limitada das estratégias de controle existentes para a murcha bacteriana do eucalipto, por sua fácil disseminação através de material propagativo, somada a alta capacidade de sobrevivência do patógeno. A avaliação da suscetibilidade, *in vitro*, de dezessete espécies de *Eucalyptus* a duas estirpes de *Ralstonia solanacearum*, foi realizada através do teste de microbiolização de sementes. Nas espécies de *Eucalyptus* analisadas, a suscetibilidade, medida pela germinação e desenvolvimento das plântulas, variou e foi maior devido a estirpe UnB 1359 (biovar 2T), recentemente descrita em eucalipto, quando comparada a UnB 575 (biovar 1). A primeira estirpe causou mais que 50% de morte das sementes em 13 das 17 espécies analisadas, enquanto a segunda estirpe só em 8 espécies. O híbrido “urograndis” e as espécies *E. deanei*, *E. pilularis* e *E. robusta* foram consideradas tolerantes a ambas as estirpes. Ao contrário, *E. cloeziana*, *E. paniculata*, *E. exserta*, *E. acmenoides*, *E. botryoides*, *E. pellita*, *E. propinqua* e *E. resinifera* exibiram baixa tolerância. Este trabalho serve de alerta do potencial de contaminação de viveiros e regiões produtoras de eucalipto onde a Raça dessa bactéria ocorre, em face da suscetibilidade *in vitro* observada em várias espécies analisadas.

Palavras-chave: murcha bacteriana do eucalipto, microbiolização de sementes, resistência genética, jardins clonais, suscetibilidade.

Evaluation, *in vitro*, of the susceptibility of different eucalyptus species to R3bv2T of *Ralstonia solanacearum*

ABSTRACT

The most effective approach for reducing the severity of bacterial wilt of eucalyptus is by means of achieving genetic resistance. Existing strategies to control the disease have limited application because of bacterial wilt's easy dissemination via propagative material, along with the pathogen's high capacity to survive. Seventeen species of *Eucalyptus* were evaluated for their, *in vitro*, susceptibility to two strains of *R. solanacearum* by means of seed microbiolization. In the *Eucalyptus* species analyzed, susceptibility was measured by germination and seedling development, varied and was greatest in the UnB 1359 strain (biovar 2T), recently described in eucalyptus, when compared to UnB 575 (biovar 1). The first strain of these caused more than 50% of dead seeds in 13 of the 17 species analyzed, while the second strain achieved this result in only 8 species. The hybrid "urograndis" and the species *E. deanei*, *E. pilularis* and *E. robusta* were considered tolerant to both strains. In contrast, *E. cloeziana*, *E. paniculata*, *E. exserta*, *E. acmenoides*, *E. botryoides*, *E. pellita*, *E. propinqua* and *E. resinifera* showed low tolerance. This study serves as an alert to the potential for contamination in eucalyptus nurseries and productive regions where this bacterial Race occurs, given the *in vitro* susceptibility observed in various species analyzed.

Key words: bacterial wilt of eucalyptus, seed microbiolization, genetic resistance, clonal nurseries, susceptibility.

INTRODUÇÃO

Doenças causadas por bactérias constituem um novo desafio à cultura do *Eucalyptus* spp., podendo, inclusive, limitar o uso de clones suscetíveis (Cunha et al., 2006). Nesta planta tem sido observada a especificidade clonal com relação à suscetibilidade à doença (Ferreira, 2002). Além disso, segundo Mew & Ho (1977) as chances de sucesso no plantio de materiais resistentes são baixas, devido a falta de variabilidade para resistência e também por causa das interações ambientais, especialmente alta temperatura e umidade do solo. A avaliação de genótipos visando identificar fontes de resistência é considerada a abordagem mais efetiva para a redução na severidade da doença (Ran et al., 2005). Isso é particularmente aplicável no caso do eucalipto em que o sistema de produção de mudas é basicamente clonal e altamente favorável à multiplicação de *Ralstonia solanacearum* (Alfenas et al., 2006).

Em infecção natural a murcha bacteriana ocorre devido à biovar 3 na Ásia (Wu & Liang, 1988; Wang, 1992; Pongpanich, 2000; Thu et al., 2000); Oceania (Akiew et al., 1994) e África (Coutinho et al., 2000; Roux et al., 2000) e devido a biovar 1 na América do Sul: Brasil (Sudo et al., 1983; Robbs et al., 1988; Dianese & Takatsu, 1985; Auer et al., 2008) e Venezuela (Ciesla et al., 1996). Mais recentemente foi descrita a murcha incitada pela Raça 3 biovar 2T em cultivo inicial de campo “urograndis” no município de Alexânia - Goiás (Marques et al., 2009).

Estudos com a biovar 3, através de levantamentos de campo e inoculações artificiais, realizados por Wu & Liang (1988), na China, mostraram variação na resistência a murcha bacteriana entre espécies e procedências de eucalipto. Em *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. saligna* 7451, *E. saligna* 7651, *C. citriodora* e *E. exserta* observou-se os maiores níveis de resistência a doença. Foram consideradas moderadamente resistentes: *E. saligna* 13341, *E. propinqua*, *E. grandis*, *E. saligna* 13522, *C. citriodora* No. 52, *E. camaldulensis* 12501, Leizhou No. 1 (Dong Zhen), *C. citriodora* (Ji Jia), *E. saligna* 13434, *E. saligna* 13334, entre outras. Por outro lado, *E. urophylla* e *E. camaldulensis* 13923 foram mais suscetíveis.

No Brasil, entre seleções de sete espécies e cruzamentos, Dianese et al. (1990) observaram indicações de tolerância, nos experimentos de campo, a biovar 1 de *R. solanacearum* em: *E. deglupta*, *E. pellita* e *E. tereticornis*, mas não em *E. pilularis*, *E. resinifera*, *E. urophylla* e no híbrido “urograndis”. Posteriormente, Dianese & Dristig

(1993) analisando diferentes concentrações de inóculo em 42 genótipos de 20 espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia*, não observaram seleções tolerantes em *E. deglupta*, *E. microcorys*, *E. pilularis*, *E. punctata*, *E. pyrocarpa*, *E. robusta*, *E. saligna* e *E. urophylla*. Ao contrário do observado nas seleções avaliadas das espécies *E. camaldulensis*, *C. citriodora*, *E. cloeziana*, *E. deanei*, *E. pellita*, *E. grandis*, *E. resinifera*, *E. tereticornis* e *C. torelliana*, onde houve genótipos tolerantes.

Chen & Wu (1995) observaram que alguns clones resistentes tornam-se suscetíveis quando introduzidos em diferentes ambientes. Segundo Shi et al. (2000), a resistência também decresce quando a planta é propagada por cultura de tecidos por mais de 3 anos consecutivos.

Na China, Li & Wu (1996) mostraram que espécies de crescimento rápido como *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. saligna* e os híbridos *E. grandis* x *E. urophylla* ou *E. urophylla* x *E. grandis*, com menos de dois anos, são altamente suscetíveis. Segundo esses autores, as diferenças quanto ao nível de resistência para uma mesma espécie podem estar relacionadas com o uso de procedências distintas. O mesmo foi observado em avaliações de campo realizadas por Shi et al. (2000), mostrando que o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* é altamente suscetível.

Testes de patogenicidade por inoculação em clones de *E. grandis* x *E. camaldulensis*, na África, mostraram que o Clone GC550 exibiu murcha depois de três dias e todos os cortes subsequentemente morreram. Os clones GC515 e GC505 pareceram ser os menos suscetíveis, não mostrando sintomas da doença até sete dias após a inoculação (Coutinho et al., 2000).

No intuito de desenvolver um método de avaliação de resistência, empregando um infectário que simula as condições de um minijardim clonal, Mafia (2006) observou que dentre as espécies avaliadas *E. tereticornis* e *E. grandis* apresentaram, respectivamente, o menor (33,3%) e o maior (91,7%) percentual de genótipos suscetíveis. *E. saligna*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis* e *E. dunnii* apresentaram entre 53 e 65% de plantas suscetíveis.

Tendo em vista a divergência quanto à resposta à murcha bacteriana nas diferentes espécies e cruzamentos de eucalipto anteriormente estudados e a ausência de conhecimento da ação da Raça 3 biovar 2T sobre diferentes espécies dessa planta, foi objetivo deste trabalho: realizar testes para avaliar a suscetibilidade *in vitro* de dezessete espécies de *Eucalyptus* a duas estirpes de *R. solanacearum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização dos ensaios

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Departamento de Fitopatologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília.

Origem dos isolados bacterianos

Para avaliação da suscetibilidade de diferentes espécies e cruzamentos de eucalipto a 2 estirpes de *Ralstonia solanacearum* (**Tabela 1**) foram utilizadas sementes, parte doadas pelo IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, Piracicaba - SP) e as restantes compradas do mesmo Instituto (**Tabela 2**). As estirpes bacterianas foram obtidas da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas, do Departamento de Fitopatologia, da Universidade de Brasília. A recuperação foi feita diretamente dos tubos com água estéril contendo as culturas preservadas, sendo que após as repicagens em meio Kelman (1954) foram utilizadas as colônias virulentas.

Avaliação da suscetibilidade de *Eucalyptus* spp. através do teste de microbiolização em sementes

A metodologia utilizada foi adaptada de Rodrigues (2010). A desinfestação superficial das sementes de eucalipto foi efetuada por imersão em álcool 70% (30 s), seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% (3 min) e lavagem em água destilada estéril, por duas vezes consecutivas. A seguir, as sementes foram imersas em suspensão de *R. solanacearum* na concentração de 10×10^8 UFC/mL (Escala 7 de McFarland), agitadas a 150 rpm em incubador rotativo, a 28 °C por 24 h, com exceção das sementes testemunhas que foram mantidas nas mesmas condições, porém em água destilada e esterilizada. Após esse período, as sementes foram depositadas individualmente em tubos tipo “Falcon” (50 mL) contendo 10 mL de meio ágar-água (0,85%). Os tubos foram colocados em estantes, mantidos a temperatura ambiente (24 ~ 25° C) e após 30 dias avaliou-se a germinação das sementes (número total de sementes

germinadas/número total de sementes semeadas) ou alteração no crescimento das plântulas de eucalipto. Para analisar a reação de cada espécie considerou-se: 1) sementes sadias, que quando comparadas ao controle não apresentava diminuição do crescimento; 2) sementes mortas, que não germinavam ou se germinavam não se desenvolviam devido à ação da bactéria (suscetíveis) e 3) plântulas afetadas, que eram sementes que se desenvolviam, mas com crescimento reduzido (tolerantes). Foram considerados tolerantes os resultados com $\leq 50\%$ de sementes mortas. Utilizou-se 1020 tubos no total, 60 repetições para cada espécie de eucalipto, sendo 20 por estirpe bacteriana e 20 para cada testemunha.

TABELA 1 - Estirpes de *Ralstonia solanacearum* utilizadas nos testes de suscetibilidade das diferentes espécies de *Eucalyptus*.

Estirpe	Hospedeira de origem	Local de coleta	Ano de Coleta	Raça/biovar
UnB 1359	“urograndis”	Alexânia-GO	2009	3/2T
UnB 575	<i>E. urophylla</i>	Monte Dourado-PA	1985	1/1

RESULTADOS

As sementes utilizadas como testemunhas (**Tabela 2**), sem a microbiolização com o patógeno, mostraram germinação a cima de 70% na maior parte delas, exceto para *E. acmenoides*, *E. phaeotricha* (**Figura 2F**) e *E. pilularis* (**Figura 2G**) em que a germinação foi menor ou igual a 50%.

Nas espécies analisadas, suscetibilidade maior foi observada devido à estirpe UnB 1359 da biovar 2T, quando comparada a estirpe UnB 575 da biovar 1. A primeira estirpe causou mais de 50% de morte das sementes em 13 espécies e cruzamentos das 17 testadas: *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. grandis* x *E. camaldulensis*, *E. cloenziana*, *E. microcorys*, *E. paniculata*, *E. exerta*, *E. acmenoides*, *E. botryoides*, *E. pellita* (**Figura 1**), *E. phaeotricha*, *E. propinqua* e *E. resinifera*. Enquanto a segunda estirpe só em 8 espécies: *E. cloenziana*, *E. paniculata*, *E. exerta*, *E. acmenoides*, *E. botryoides*, *E. pellita*, *E. propinqua* e *E. resinifera*. Nas espécies *E. cloeziana* e *E. botryoides* a

suscetibilidade foi igual para ambas as estirpes testadas, de 90 e 100% de sementes mortas, respectivamente (**Tabela 2**).

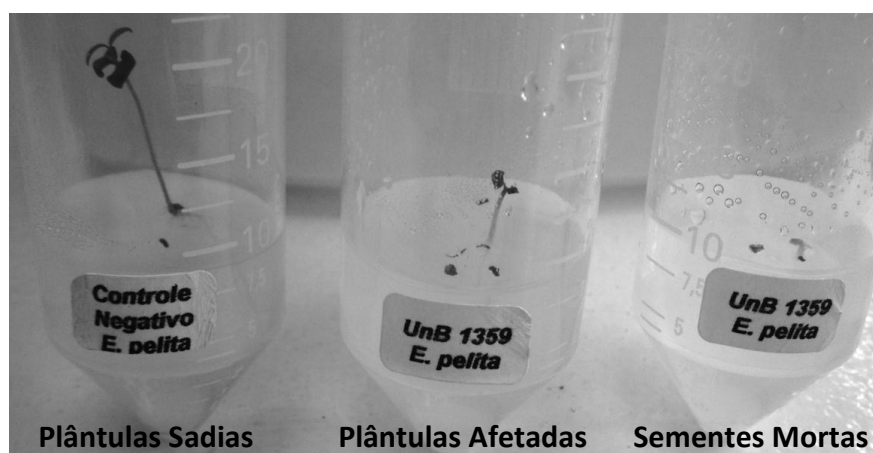


FIGURA 1 - Forma de avaliação da suscetibilidade de *Eucalyptus* spp. a estirpes de *Ralstonia solanacearum*, exibindo testemunha com plântulas sadias, plântulas afetadas e sementes mortas da espécie *E. pellita*.

Nos testes com a estirpe UnB 1359 as espécies *E. robusta*, *E. deanei* (**Figura 2A**), *E. pilularis* (**Figura 2G**) e o híbrido “urograndis” mostraram tolerância a ação da bactéria, apresentando 35, 50, 15 e 50% de sementes mortas respectivamente, ou seja, o restante das sementes desenvolveram plântulas mesmo que ainda afetadas. As demais espécies, ao contrário, mostraram-se suscetíveis a esta estirpe bacteriana, sendo que a suscetibilidade chegou a 100% em *E. urophylla*, *E. grandis* x *E. camaldulensis*, *E. grandis*, *E. paniculata* e *E. botryoides*.

A microbiolização com a estirpe UnB 575 levou a resultados diferentes, sendo as espécies mais tolerantes. Consideradas como suscetíveis foram: *E. cloeziana* (**Figura 2C**), *E. paniculata*, *E. exserta*, *E. acmenoides* (**Figura 2D**), *E. botryoides*, *E. pellita*, *E. pronpinqua* (**Figura 2H**) e *E. resinifera* (**Figura 2E**). Somente em *E. acmenoides* e *E. botryoides* a suscetibilidade foi de 100%. As espécies *E. grandis*, *E. exserta* e *E. robusta* foram as únicas que mostraram 15, 5 e 5% de plântulas sadias, respectivamente, ou seja, que escaparam a ação da bactéria quando comparadas ao controle, não exibindo sintomas de redução de crescimento.

TABELA 2 - Espécies e híbridos de *Eucalyptus* utilizados nos testes de suscetibilidade, *in vitro*, a *Ralstonia solanacearum* R3bv2 e R1bv1.

Espécies/ Cruzamentos	Procedência	Grau ²	Germinação ou viabilidade das sementes (%)	Safr	% Germinação Testemunha	Estirpe UnB 1359	Estirpe UnB 575	
						R3bv2T	R1bv1	
						% sementes mortas ⁶	% sementes mortas	% plântulas sadias
<i>E. urophylla</i>	Anhembi - SP	APS-MS-F1 ³	81	2009	95	100	15	0
<i>E. urophylla</i> x <i>E. urograndis</i>	Anhembi - SP	PMS-F3 ⁴	NF ⁵	2010	100	50	15	0
<i>E. grandis</i> x <i>E. camaldulensis</i>	Anhembi - SP	APS-MS-F3	NF	2011	80	100	25	0
<i>E. cloeziana</i>	Anhembi - SP	APS-MS-F1	86	2008	90	90	90	0
<i>E. grandis</i>	Itatinga - SP	APS-MS-F2	97	2009	100	100	0	15
<i>E. microcorys</i>	Itatinga - SP	APS-MS (F2)	68	2007	95	75	45	0
<i>E. paniculata</i>	Itatinga - SP	APS-MS (F1)	NF	2011	100	100	85	0
<i>E. exserta</i>	Itatinga - SP	APS-MS (F2)	70	2002	75	85	60	5
<i>E. acmenoides</i>	Itatinga - SP	APS-MS (F2)	NF	2007	50	95	100	0
<i>E. botryoides</i>	Anhembi - SP	APS-MS (F1)	81	1991	80	100	100	0
<i>E. deanei</i>	Anhembi - SP	APS-MS (F2)	NF	2007	100	50	20	0
<i>E. pellita</i>	Anhembi - SP	APS-MS (F1)	95	2010	90	55	80	0
<i>E. phaeotricha</i>	Anhembi - SP	APS-MS (F1)	72	1990	45	80	40	0
<i>E. pilularis</i>	Anhembi - SP	APS-MS (F1)	NF	2008	40	15	50	0
<i>E. propinqua</i>	Anhembi - SP	APS-MS (F1)	NF	1991	85	85	95	0
<i>E. resinifera</i>	Anhembi - SP	APS-MS (F1)	93	1995	70	90	85	0
<i>E. robusta</i>	Itatinga - SP	APS-MS (F2)	91	2009	95	35	15	5

¹Dados do fornecedor/produtor

²Grau de Melhoramento:

³Área de Produção de Sementes e Fn (n = 1 a 5): Geração de Melhoramento

⁴Pomar de Sementes por Mud

⁵Dado não fornecido

⁶Baseado na porcentagem de germinação das sementes não tratadas

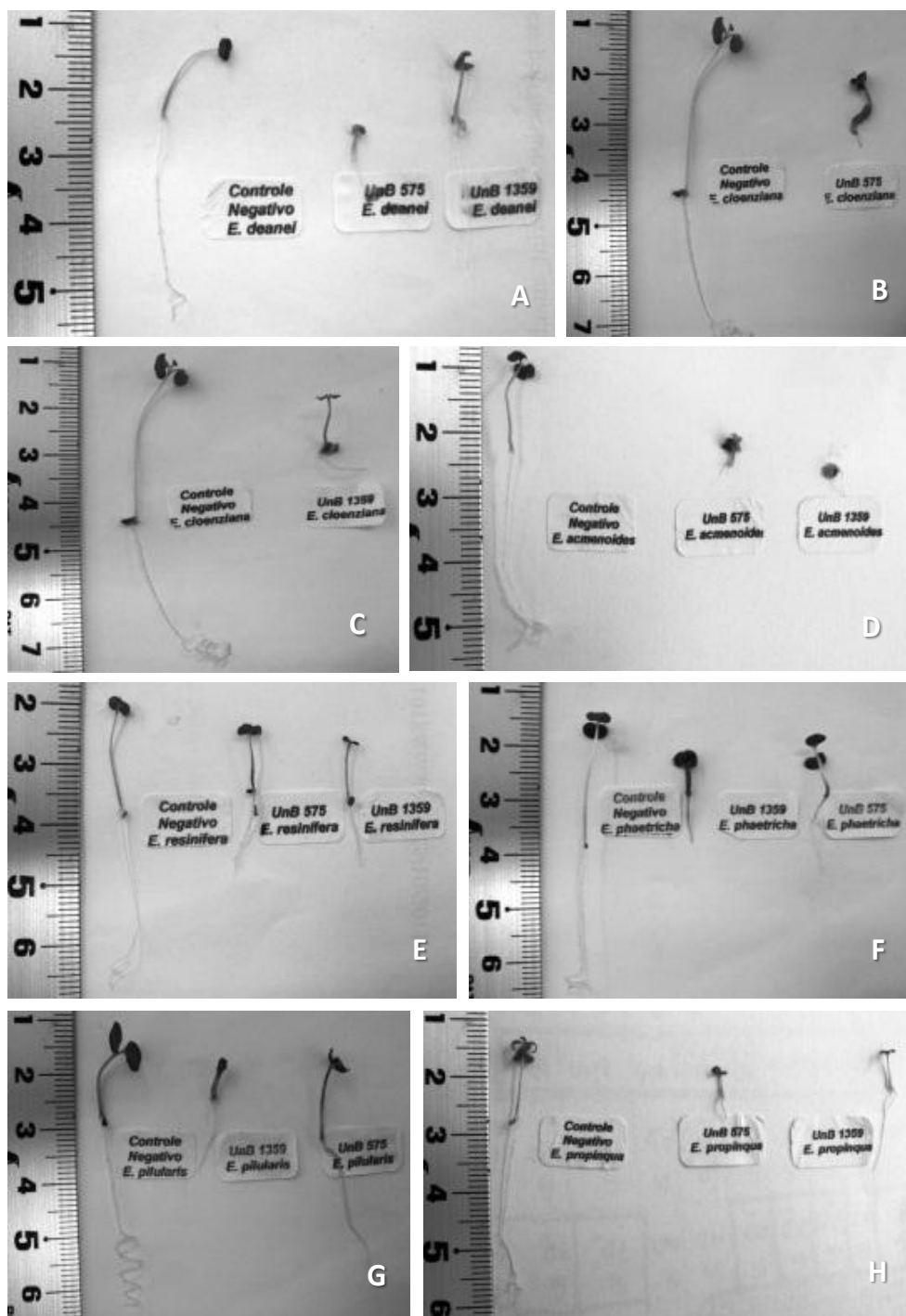


FIGURA 2 - Suscetibilidade de diferentes espécies de *Eucalyptus* a estirpes de *Ralstonia solanacearum* UnB 575 (R1bv1) e UnB 1359 (R3bv2T). **A.** *E. deanei*; **B** e **C.** *E. cloeziana*; **D.** *E. acmenoides*; **E.** *E. resinifera*; **F.** *E. phaetricha*; **G.** *E. pilularis* e **H.** *E. propinqua*.

DISCUSSÃO

A busca por resistência genética à murcha bacteriana do eucalipto tem sido realizada em espécies puras, procedências, clones e híbridos (Gan et al., 2004). Para isso, diferentes métodos de inoculação foram desenvolvidos e não existem protocolos definidos para essa avaliação (Mafia, 2006). Além disso, diferenças quanto ao nível de resistência de uma mesma espécie pode estar associada com o uso de procedências distintas (Li & Wu, 1996), de forma que se torna difícil comparar os relatos na literatura, pois envolvem a busca de resistência genética de diferentes formas e fontes. Neste trabalho, foi utilizado o método de microbiolização de sementes em laboratório, através da infecção natural das mesmas, sem provocar ferimentos, para avaliar a suscetibilidade de diferentes espécies, ou seja, a capacidade das estirpes bacterianas em causar danos nas plântulas de eucalipto ou interferir na germinação de sementes, que fossem mensuráveis no período de um mês.

Nas sementes obtidas do IPEF, a maioria mostrou germinação da testemunha próximo ao atestado pelo fornecedor. Por outro lado, as sementes pertencentes às espécies *E. acmenoides*, *E. phaeotricha* e *E. pilularis* não tiveram boa germinação. Duas delas, *E. acmenoides* (safra 2007) e *E. pilularis* (safra 2008), não possuem informações quanto a germinação ou viabilidade, no termo de conformidade de sementes que acompanha o boletim de análise do fornecedor (**Tabela 2**), não sendo possível dizer se estavam fora do prazo de validade. Já a germinação de *E. phaeotricha* (safra 1990) atestada, é de 72% e a validade do teste de germinação é março de 2011, período anterior a obtenção das sementes. Portanto, pode ser que tais sementes estivessem pouco viáveis ou com baixo vigor, levando em consideração a safra antiga, o fato de estar fora do prazo de validade do teste e a baixa germinação observada neste estudo. Segundo Ferrari (2003), sementes de eucalipto, por seu tamanho, apresentam-se muitas vezes, com uma quantidade alta de material inerte misturado, principalmente sementes não fecundadas, reduzindo o número de sementes viáveis por kg. Foram selecionadas as sementes maiores para os testes, mas sabe-se que a capacidade de germinação não é afetada pelo tamanho das mesmas, apesar de as maiores serem mais vigorosas (Nakagawa et al., 2001; Aguiar et al., 1979).

A estirpe UnB 575 da R1bv1 oriunda de *E. urophylla* (Dianese & Dristig, 1993) foi menos agressiva, que a estirpe UnB 1359 da **R3bv2T** recentemente descrita em infecção natural em campo do híbrido “urograndis” (Marques et al., 2009).

Experimentalmente já foi observado que estirpes de biovares originárias de outras hospedeiras podem se mostrar mais virulentas a eucalipto do que suas próprias estirpes. Segundo estudo realizado por Dianese & Dristig (1993), as biovares 1, 2 e 3 pertencentes a outras plantas foram mais virulentas a *E. grandis* do que a estirpe UnB 575 biovar 1, de eucalipto. Rodrigues (2010) em ensaio de agressividade através de microbiolização *in vitro* de sementes de eucalipto também relatou que biovares 1, 2 e 3 de diferentes hospedeiras infectaram plantas de *E. grandis* ou afetaram seu crescimento.

Não foram encontrados ou acessados estudos de resistência genética ou estudos relacionados à murcha bacteriana na literatura para cinco das espécies de eucalipto avaliadas: *E. paniculata*, *E. acmenoides*, *E. botryoides*, *E. propinqua* e *E. phaeotricha*.

Nas sementes de espécies avaliadas e consideradas aqui suscetíveis e com relato na literatura, embora utilizem diferentes métodos de avaliação, para ambas as biovares de *R. solanacearum* discordou com o observado em seleções de *E. cloeziana* e *E. resinifera*, por Dianese & Dristig (1993), *E. pellita* (Dianese & Dristig, 1993; Dianese et al., 1990) e *E. exserta* (Wu & Liang, 1988), que as consideram tolerantes ou resistentes a murcha.

Dentre as espécies tidas como tolerantes, o verificado para o cruzamento de crescimento rápido *E. grandis* x *E. urophylla* discordou as espécies, proveniências e seleções estudadas por Shi et al. (2000), Li & Wu (1996) e Dianese et al. (1990) considerados como altamente suscetíveis a biovar 1 e 3 e aqui medianamente tolerantes, por outro lado concordou em parte com o relatado por Wu & Liang (1988) que relatou suas proveniências como resistentes. Segundo Dianese & Dristig (1993) e Dianese et al. (1990), *E. robusta* e *E. pilularis* são suscetíveis, contrariando o observado. Analogamente ao ocorrido neste trabalho, onde se observou tolerância a ambas as estirpes testadas, Dianese & Dristig (1993) e Dianese et al. (1990) consideraram *E. deanei* como tolerante a estirpes da biovar 1.

Consideradas como suscetíveis à estirpe da biovar 2T e tolerantes a biovar 1, o observado com *E. urophylla*, *E. grandis* confere com Wu & Liang (1988), Dianese et al. (1990), Dianese & Dristig (1993), Li & Wu (1996) e Mafia (2006) tidas como suscetíveis. O cruzamento *E. grandis* x *E. camaldulensis* que se mostrou suscetível nesse estudo a biovar 2T e tolerante a biovar 1 também é considerada tolerante por Coutinho et al. (2000), mas resistente por Wu & Liang (1988). Por fim, genótipos da espécie *E. microcorys* também foram relatados como suscetíveis por Dianese & Dristig (1993).

Foram utilizadas sementes obtidas de campos de melhoramento genético florestal, o que talvez expresse melhor a resistência das espécies utilizadas, fornecendo subsídios na busca por fonte de resistência genética para regiões de ocorrência da bacteriose. Além disso, foram dadas informações das espécies não encontradas na literatura (*E. paniculata*, *E. acmenoides*, *E. botryoides*, *E. propinqua* e *E. phaeotricha*) quanto a suscetibilidade a biovar 1 e 2T de *R. solanacearum*.

CONCLUSÕES

Estudos de resistência genética são importantes para o controle da murcha bacteriana, pois é o componente mais eficiente do manejo. O uso neste trabalho de sementes verdadeiras de *Eucalyptus* mostrou uma maior suscetibilidade das espécies testadas à **R3bv2T** em comparação com a R1bv1, que afeta o eucalipto no Brasil, servindo de alerta do potencial de contaminação de viveiros e regiões onde a biovar desta bactéria ocorre, em face da suscetibilidade *in vitro* observada em várias espécies analisadas. O híbrido “urograndis” e as espécies *E. deanei*, *E. pilularis* e *E. robusta* foram consideradas as espécies mais tolerantes a ambas as biovars. Novos estudos na correlação entre testes *in vitro* e no campo devem ser realizados, onde interações ambientais podem interferir na resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar IB, Carvalho NM, Maimoni-Rodella RCS, Damasceno MCM (1979) Influência do tamanho sobre a germinação e o vigor de sementes de eucalipto. Revista Brasileira de Sementes 1:53-58.

Akiew E, Tevorow PR (1994) Management of bacterial wilt of tobacco. In: Hayward A, Hartman GL (Eds.) Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford UK. CAB International. pp. 179-198.

Alfenas AC, Mafia RG, Sartório RC, Binoti DHB, Silva RR, Lau D, Vanetti CA (2006) *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. Fitopatologia

Brasileira 31:357-366.

Auer CG, Santos AF, Rodrigues Neto J (2008) Ocorrência de murcha bacteriana em plantios de *Eucalyptus grandis* no estado de Santa Catarina. *Tropical Plant Pathology* 3 (Supl.):370.

Chen EY, Wu XY (1995) Occurrence and control of eucalyptus bacterial wilt in Hainan Province. *Tropical Forestry* 23:4-6.

Ciesla WM, Diekmann M, Putter CA (1996) *Eucalyptus* spp. Rome Italy. Technical Guidelines for the safe movement of germplasm 17.

Coutinho TA, Roux J, Riedel KH, Terblanche J, Wingfield MJ (2000) First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. *Forest Pathology* 30:205-210.

Cunha J de F, Picoli EA de T, Alfenas AC, Gonçalves RC (2006) Efeito *in vitro* de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. *Revista Árvore* 30:871-876.

Dianese JC, Dristig MCG (1993) Screening *Eucalyptus* selections for resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. In: Hartman GL, Hayward AC (Eds.) *Bacterial Wilt Proceedings of an International Conference*. Kaohsiung Taiwan. pp. 206-210.

Dianese JC, Dristig MCG, Cruz AP (1990) Susceptibility to wilt associated with *Pseudomonas solanacearum* among six species of *Eucalyptus* growing in equatorial Brazil. *Australasian Plant Pathology* 19:71-76.

Dianese JC, Takatsu A (1985) *Pseudomonas solanacearum* biovar 1 isolada de eucalipto em Monte Dourado, Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira* 10 (Supl.):362.

Ferrari MP (2003) Cultivo de Eucalipto – Produção de mudas. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto>

Ferreira FA (2002) Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. Mogi Guaçu SP. International Paper.

Gan S, Li M, Li F, Wu K, Wu J, Bai J (2004) Genetic analysis of growth and susceptibility to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in *Eucalyptus* by interspecific factorial crossing. *Silvae Genetica* 53:5-6.

Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.

Li H, Wu XY (1996) The current status, causes and control of forest diseases in Haiman province. *Tropical Forestry* 24:101-103.

Mafia RG (2006) Sintomatologia, etiologia e controle da murcha bacteriana do eucalipto. Tese de Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa.

Marques E, Rezende DV, Uesugi H (2009) Primeiro relato da biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* em eucalipto no Brasil. *Tropical Plant Pathology* 34 (Supl.):12.

Mew TW, Ho WC (1977) Effect of soil temperature on resistance of tomato cultivars to bacterial wilt. *Phytopathology* 67:909-911.

Nakagawa J, Mori ES, Amaral WAN do, Mello EJ de (2001) Envelhecimento acelerado em sementes de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden classificadas por tamanho. *Scientia Forestalis* 60:99-108.

Pongpanich K (2000) *Eucalyptus* pathology in Thailand. In: *Eucalyptus* diseases and their management. Kasetsart University Bangkok. ACIAR 9441 Final Report. pp. 6-8.

Ran LX, Liu CY, Wu GJ, Van Loon LC, Bakker PAHM (2005) Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China.

Biological Control 32:111-120.

Robbs CF, Cruz AP, Neto JR (1988) Algumas estratégias de controle à murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em eucaliptos. Jaguariúna SP. Comunicado Técnico Embrapa 3.

Rodrigues LMR (2010) Avaliação da agressividade e caracterização genética de linhagens de *Ralstonia solanacearum* isoladas de diferentes plantas hospedeiras. Tese de Mestrado. Botucatu SP. Universidade Estadual Paulista.

Roux J, Coutinho TA, Majuni BD, Wingfield MJ (2000) Diseases of plantation *Eucalyptus* in Uganda. South Africa Journal of Science 97:16-18.

Shi ZM, Xi FS, He GZ, Li JH, Wang SM, Xian SH, Peng SY (2000) Studies on selection of *Eucalyptus* for resistance to bacterial wilt and resistance stability. Guangxi Forest Science 29:1-6.

Sudo S, Oliveira GHN, Pereira AC (1983) Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e bracatinga (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. Fitopatologia Brasileira 8 (Supl.):631.

Thu PQ, Old KM, Dudzinski MJ, Gibbs RJ (2000) Results of eucalyptus disease surveys in Vietnam. In: *Eucalyptus* diseases and their management. Kasetsart University Bangkok. ACIAR 9441 Final Report. pp. 6-8.

Wang WY (1992) Survey of *Eucalyptus* disease in Taiwan. Bulletin Taiwan Forest Research Institute 7:179-194.

Wu QP, Liang ZC (1988) Selection of species and provenance of eucalyptus for resistances to bacterial wilt. Journal of South China Agricultural University 9:41-45.

CAPÍTULO 5

Avaliação de bactérias extremófilas facultativas na promoção do crescimento do híbrido “urograndis” (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) a partir de sementes

RESUMO

Estudos de bactérias benéficas, tais como as promotoras de crescimento vêm sendo desenvolvidos há mais de um século. Este trabalho objetivou avaliar estirpes de bactérias extremófilas facultativas, que possuam potencial na promoção de crescimento do eucalipto. As sementes do híbrido “urograndis” foram microbiolizadas com uma suspensão de 10×10^8 UFC/mL de 10 estirpes bacterianas, através da agitação a 150 rpm em incubador rotativo, a 28 °C por 24 h. Em seguida, foram plantadas em sementeiras e mantidas em casa de vegetação. Após 60 dias avaliou-se a germinação, o peso seco da parte aérea e raízes. Observou-se uma variação, em função dos tratamentos, na germinação nas sementes entre 28-100%. O peso seco da parte aérea revelou que todas as estirpes bacterianas levaram a ganhos quando comparados a testemunha, variando entre 11,3 e 78,0%. Entretanto, as estirpes UnB 1366, UnB 1371, UnB 1375, UnB 1370 e UnB 1373, foram as que diferiram significativamente em relação a testemunha. Em contrapartida, a estirpe UnB 1368 (*Bacillus* sp.) se destacou individualmente no incremento (130,0%) da biomassa radicular. Pôde-se observar também que, aparentemente algumas estirpes induziram uma germinação precoce das sementes, em destaque a UnB 1366 (*Bacillus* sp.). Tais estirpes apresentam potencial para que possam ser utilizadas na otimização da produção de mudas.

Palavras-chave: microbiolização de sementes, germinação, produção de mudas, biomassa de raiz.

Evaluation of facultative extremophile bacteria in promoting growth of the hybrid “urograndis” (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*) from seeds

ABSTRACT

Studies of beneficial bacteria, such as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs), have been carried out for more than a century. This work aimed to evaluate strains of facultative extremophile bacteria that show potential in promoting eucalyptus growth. Seeds from the hybrid “urograndis” were microbiolized with a suspension of 10×10^8 UFC/mL from 10 bacterial strains, by means of shaking at 150 rpm in a rotating incubator, at 28 °C for 24 h. Next, they were planted in seed-trays and kept in the greenhouse. After 60 days seed germination and total dry weight of the aerial part and roots were evaluated. A variation in seed germination, from 28 to 100%, was observed with respect to treatments. The dry weight of the aerial part revealed that all the bacterial strains produced gains when compared to the control, varying from 11.3 to 78.0%. However, strains UnB 1366, UnB 1371, UnB 1375, UnB 1370 and UnB 1373 were the ones that differed significantly. In contrast, the UnB 1368 strain (*Bacillus* sp.) stood out individually in promoting an increase of 130.0% in root biomass. It was also observed that some strains apparently induced early seed germination, especially UnB 1366 (*Bacillus* sp.). These strains have potential to be used in optimizing seedling production.

Key words: seed microbiolization, germination, seedling production, root biomass.

INTRODUÇÃO

As florestas naturais no mundo somam cerca de 4 bilhões de hectares, cobrindo aproximadamente 30% da superfície terrestre do globo (SBS, 2008). Cinco países concentram mais da metade da área florestal total: Rússia, Brasil, Canadá, Estados Unidos e China. No Brasil, que é o segundo maior, a área florestal total absoluta é de aproximadamente 851,4 milhões de hectares. Deste total, apenas 0,7% é de florestas plantadas, e destas 81,6% é com eucalipto (Bracelpa, 2009). O crescimento da área de florestas plantadas no país foi de 27,11% entre os anos de 2004 e 2009 (ABRAF, 2011).

Os plantios florestais, via de regra, são impulsionados por empresas consumidoras da madeira (ABRAF, 2008), tendo a eucaliptocultura um importante papel na economia do país. Em 2008, o Brasil subiu do 6º para o 4º lugar entre os produtores mundiais de celulose. A produtividade florestal em 2009 do Brasil foi de 44,2 m³ de eucalipto com casca/ha, gerando aproximadamente 46.850 empregos diretos (Bracelpa, 2009).

A decomposição de matéria orgânica, agregação do solo, além do controle biológico de pragas e doenças são realizadas por microrganismos de solo (Siqueira, 1993; Moreira & Siqueira, 2006). Entre eles, as bactérias constituem o grupo mais numeroso, variando de acordo com o tipo de solo, manejo e métodos de isolamento empregados (Brandão, 1992). Estima-se que menos de 10% da vida existente no solo seja conhecida (Mendes & Reis Jr., 2010).

Sabe-se que em determinados materiais genéticos de eucalipto, em fase de multiplicação, o índice de enraizamento é baixo, dificultando o processo de clonagem (Mafia et al., 2009). Além disso, na propagação vegetativa por miniestaquia do eucalipto, amplamente empregada, ainda se observa heterogeneidade no enraizamento (Teixeira, 2001). Dessa forma, muitos desses organismos de solo e da rizosfera, que têm grande potencial na promoção do crescimento e enraizamento de plantas, podem ser estudados na minimização desse entrave.

As chamadas Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs), termo inicialmente utilizado para descrever bactérias benéficas bem adaptadas às raízes das plantas (Kloepper & Schorth, 1978) e para diferenciá-las das bactérias do solo que não colonizam ou não o fazem tão agressivamente, estão entre esses organismos (Zago et al., 2000). Elas têm sido utilizadas na biofertilização, biorremediação, biopesticidas e

fitoestimulantes (Mafia et al., 2007). A maioria das estirpes de RPCPs documentadas, até então, pertencem aos gêneros *Pseudomonas* (gram-negativas) e *Bacillus* (gram-positivas) (Luz, 1996). Sendo que, dentro do gênero *Pseudomonas*, o maior número das espécies refere-se ao grupo das fluorescentes (Latour & Lemanceau, 1997).

A prospecção de tais organismos pode ser realizada diretamente do solo, assim como do interior das plantas (Paz, 2009) ou mesmo do rizoplano (Lemos, 2009).

Segundo Romeiro (2007), vários parâmetros podem ser analisados para avaliar a promoção do crescimento, tais como: percentagem de germinação de sementes, tempo de germinação, altura da planta, número de folhas, peso seco da parte aérea e raízes, além do peso seco de toda a planta.

Grande parte das RPCPs apresenta um ou mais mecanismos de ação, que podem ser divididos em: de ação indireta, ou seja, de controle de patógenos e de ação direta, que promovem o crescimento direto das plantas. Dentre eles pode-se citar: fixação de nitrogênio (*Bacillus* sp.), produção de fitohormônios (*Bacillus subtilis*, giberelinas), de ácido hidrocianico (*Pseudomonas fluorescens*), mineralização de nutrientes (*Pseudomonas putida*, disponibilização de fósforo), produção de sideróforos (*Pseudomonas* fluorescentes, pioverdina), indução de resistência (*Pseudomonas* sp.), produção de bactericinas (*Agrobacterium radiobacter*, Agrocin 84), antibióticos (*Bacillus subtilis*, bacilizina), competição por substrato (*Pseudomonas fluorescens*, competição por Fe^{3+}), parasitismo (*Enterobacter cloacae*, degradação de micélio de *Pythium*) (Luz, 1996).

Um número reduzido de trabalhos descrevem RPCPs em eucalipto. Por exemplo, Mafia et al. (2005) avaliaram o efeito de rizobactérias promotoras incorporadas ao substrato de minijardins clonais de eucalipto e foi observado incremento da biomassa radicular, além de diferenças significativas na produção de miniestacas.

Zarpelon (2007) avaliou a formulação de um inoculante (Rizolyptus[®]), contendo várias espécies bacterianas, no enraizamento e crescimento do eucalipto. Uma alta eficiência no enraizamento de miniestacas e crescimento de mudas, variando de acordo com o clone, tipo de formulação e isolado testado foi relatada. O clone de *E. grandis* respondeu melhor a rizobacterização do que o de “urograndis” e a formulação turfosa foi a que propiciou o maior incremento de velocidade de enraizamento, biomassa da parte aérea e do sistema radicular.

Avaliando isolados da rizosfera de eucalipto, Teixeira et al. (2007) observaram isolados que propiciaram ganhos de até 100% no enraizamento e de 250% no peso seco de raízes, também variando de acordo com o clone e isolado testados.

Mafia et al. (2007) observou incrementos significativos na velocidade, no índice de enraizamento e na biomassa radicular, com a aplicação de fonte alimentar inicial junto com isolados de rizobactérias. Não houve interação entre isolados e substratos de enraizamento.

Rizobactérias obtidas a partir da rizosfera de mudas clonais de eucalipto de diferentes regiões do país foram avaliadas quanto ao índice de enraizamento, biomassa radicular e a incidência de doenças. Em geral, todos os isolados aumentaram o enraizamento, a biomassa radicular e promoveram o controle biológico de *Cylindrocladium* spp. (Mafia et al., 2009).

Embora estudos recentes relatem a utilização de bactérias benéficas no Brasil, um número reduzido de trabalhos trata da presença natural dessas espécies bacterianas no solo, principalmente bactérias que crescem fora da faixa da neutralidade.

Neste trabalho, utilizou-se o termo “extremófilos facultativos” para designar bactérias capazes de crescer tanto em condições mais extremas. Existem poucos relatos e conhecimento sobre o potencial desses organismos em solos do cerrado (Madigan, 2000). Dessa forma, foi objetivo deste trabalho: avaliar o potencial de estirpes de bactérias extremófilas facultativas previamente isoladas e identificadas, para a promoção de crescimento do eucalipto.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização dos ensaios

Os experimentos foram iniciados no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Departamento de Fitopatologia, do Instituto de Biologia, da Universidade de Brasília e montados em casa de vegetação da Estação Experimental de Biologia.

Origem das estirpes bacterianas

As estirpes bacterianas (**Tabela 1**) foram obtidas como descrito no Capítulo 2, a partir de condições ambientais extremas e identificadas com base no sequenciamento de parte do gene do 16S rDNA.

Testes de promoção de crescimento via microbiolização de sementes

Os testes foram realizados via microbiolização de sementes com metodologia adaptada de Rodrigues (2010), utilizando-se sementes do híbrido “urograndis” cedidas pelo IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais), da mesma forma descrita no Capítulo 2. As sementes microbiolizadas foram semeadas em 60 células de bandejas de isopor contendo o substrato Bioplant[®] e mantidas em bancadas sobre estrados plásticos para evitar possível contaminação entre os tratamentos. Foi realizado o raleio após a germinação.

Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com 10 tratamentos (estirpes bacterianas) constituídos de 60 repetições (parcelas experimentais) e mais uma testemunha. Trinta dias do início do experimento foi realizada uma adubação com o fertilizante líquido Casa Verde (Dimy[®]) na formulação de NPK 08-08-08.

Após 60 dias, avaliou-se a germinação e a promoção do crescimento e enraizamento pela análise do peso seco da parte aérea e raízes. A parte aérea foi separada da raiz na altura do coleto e em seguida as raízes foram lavadas para retirar o substrato. As respectivas partes foram acondicionadas em sacos de papel individualmente e levados a estufa por 24 h a 70 °C e pesadas em balança digital.

Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o programa Assistat 7.6 beta (Silva & Azevedo, 2009). Os valores médios de peso seco da parte aérea e raízes foram comparados pelo teste de **T**, ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Inicialmente, pôde-se observar uma variação na germinação das sementes, os tratamentos com as estirpes UnB 1366 e UnB 1370, por exemplo, mostraram 100% de germinação, por outro lado os tratamentos com UnB 1369, UnB 1367, UnB 1371, UnB 1372 e UnB 1374, exibiram germinação abaixo da testemunha, que foi de 88% (**Tabela 1**).

A análise geral das médias do peso seco da parte aérea revelou que todas as estirpes levaram a ganhos, embora alguns tratamentos não tenham diferido estatisticamente (**Tabela 1**). O isolado UnB 1366 foi o que mostrou maior média neste parâmetro, promovendo o incremento de 78,0% em comparação a testemunha e diferindo-se estatisticamente da mesma. Entretanto, ele não exibiu diferença estatística significativa com UnB 1371, UnB 1375, UnB 1370, UnB 1373, UnB 1369, UnB 1368, UnB 1372 e UnB 1374, que levaram a ganhos de massa seca de: 76,6; 70,4; 62,0; 56,4; 52,0; 48,0; 27,5% e 22,9 respectivamente. Por outro lado, a testemunha não diferiu estatisticamente dos tratamentos com UnB 1367, UnB 1372 e UnB 1374, sendo que estes conjuntamente tiveram os menores valores de incremento de massa seca da parte aérea.

Comparando-se as médias da massa seca das raízes pôde-se observar que o isolado UnB 1368 foi o que se destacou promovendo o maior incremento do peso de 130,0% e diferindo-se estatisticamente da testemunha e demais tratamentos. Este foi seguido pela estirpe UnB 1369, UnB 1373, UnB 1371, UnB 1372, UnB 1366, UnB 1370 e UnB 1375 com ganhos de 50,0; 47,1; 36,1; 33,0; 16,2; 10,6 e 9,6% de massa seca. Os tratamentos com as estirpes UnB 1367 e UnB 1374 não proporcionaram incremento no peso.

Outra característica observada nos testes foi uma desuniformidade na germinação das sementes quando comparadas às diferentes estirpes, sendo que algumas delas aparentemente induziram a uma germinação precoce das sementes. Após o 6º dia de sementeiras, as sementes do controle negativo (testemunha), que foram microbiolizadas apenas em água estéril, ainda não haviam germinado (**Figura 1A**). Por outro lado, as sementes microbiolizadas com o isolado UnB 1366 (**Figura 1B**), que exibiram as maiores médias de peso seco de parte aérea, já exibiam 100% de germinação. As sementes microbiolizadas com o isolado UnB 1368 (**Figura 1C**), que

promoveu o melhor incremento de biomassa de raízes, dentre as estirpes testadas, já haviam germinado, mas não 100%. Por fim, as menores médias observadas tanto no peso seco de parte aérea e raízes das sementes microbiolizadas com bactérias, isolado UnB 1367 (**Figura 1D**), exibiam baixa germinação ao 6º dia de semeadas.

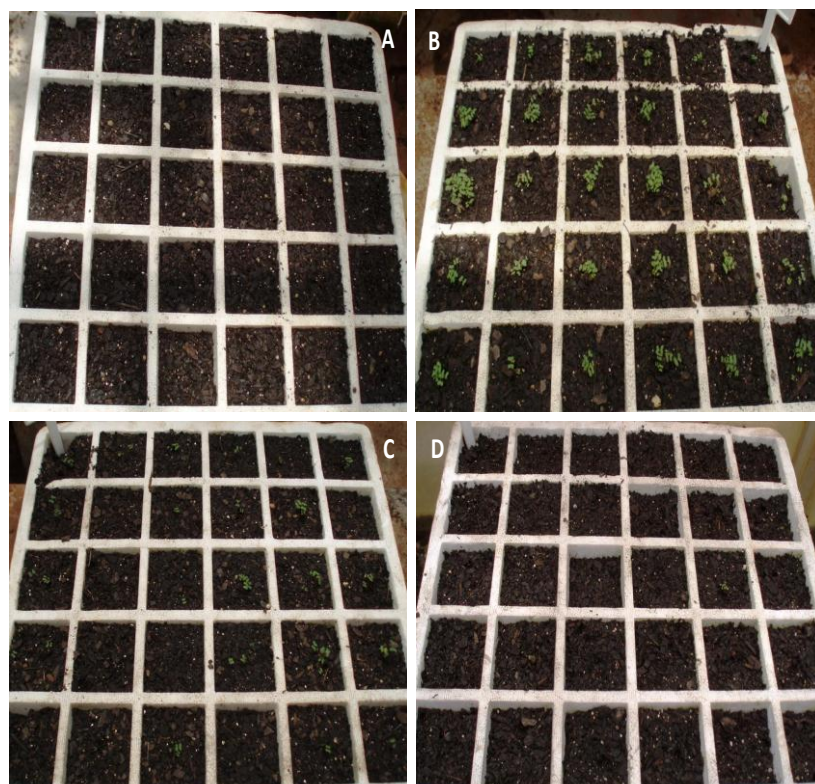


Figura 1 - Parte do teste de promoção de crescimento a partir de sementes do híbrido “urograndis” com as estirpes bacterianas obtidas de solos submetidos a condições ambientais extremas, 6 dias após a semeadura. **A.** testemunha, sementes microbiolizadas em água esterilizada; **B.** plântulas de sementes sementes microbiolizadas com a estirpe UnB 1366; **C.** plântulas de sementes microbiolizadas com a estirpe UnB 1368 e **D.** sementes microbiolizadas com a estirpe UnB 1367.

Tabela 1 - Efeito das estirpes bacterianas, oriundas de solos submetidos a condições ambientais extremas, na promoção do crescimento de plantas do híbrido “urograndis” obtidos de sementes.

Tratamentos		Germinação das sementes (%)	Peso Seco Parte Aérea		Peso Seco Raiz	
Estirpes	Gênero		MG ¹ : 0.16073 CV% ² : 68.32	Incremento ⁴ %	MG: 0.06149 CV%: 76.25	Incremento %
UnB 1366	<i>Bacillus</i> sp.	100	0,19046 a ³	78,0	0,05464 bcde	16,2
UnB 1367	<i>Enterobacter</i> sp.	60	0,11923 bc	11,3	0,04196 e	NA
UnB 1368	<i>Bacillus</i> sp.	95	0,15848 ab	48,0	0,10811 a	130,0
UnB 1369	<i>Enterobacter</i> sp.	43	0,16255 ab	52,0	0,07041 b	50,0
UnB 1370	<i>Enterobacter</i> sp.	100	0,17330 a	62,0	0,05198 b de	10,6
UnB 1371	<i>Enterobacter</i> sp.	72	0,18912 a	76,6	0,06397 bcd	36,1
UnB 1372	<i>Bacillus</i> sp.	28	0,13657 abc	27,5	0,06244 bcde	33,0
UnB 1373	<i>Bacillus</i> sp.	95	0,16745 a	56,4	0,06916 bc	47,1
UnB 1374	<i>Bacillus</i> sp.	47	0,13836 abc	29,2	0,04698 b de	NA
UnB 1375	<i>Bacillus</i> sp.	95	0,18248 a	70,4	0,05154 b de ⁵	9,6
Testemunha	NA ⁵	88	0,10707 c	NA	0,04701 b de	NA

¹Média geral; ²Coeficiente de variação; ³Valores seguidos da mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem significativamente ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste **T**; ⁴Incremento em relação a testemunha e ⁵Não se aplica neste caso.

DISCUSSÃO

Estudos de identificação de bactérias de solo que desempenham diversas funções (Siqueira, 1993; Moreira & Siqueira, 2006), mas que crescem em condições fora da faixa das mesófilas são incipientes. Presume-se que estes organismos por terem habilidade de sobreviver em tais condições possuam características desejáveis.

Como o tempo de produção no setor florestal é longo, o uso de bactérias benéficas não visa o aumento direto da produção de madeira e sim aumentar o índice de sobrevivência e precocidade no estabelecimento em campo após o plantio (Mafia et al., 2007). O uso de bactérias no aumento da produtividade de plantas já é estudado há muito tempo e em várias espécies de plantas (Kloepper, 1996), inclusive arbóreas, necessitando, entretanto de estudos de otimização do processo de inoculação bacteriana (Mafia et al., 2009). A principal forma de veiculação é via microbiolização de sementes, principalmente quando o objetivo é o biocontrole de patógenos no solo (Luz, 1993). Outros métodos também são utilizados com função e eficiência variados, tais como: a inoculação do solo ou substrato, imersão de raízes na suspensão bacteriana e infiltração das folhas (Ran et al., 2005).

No estudo em questão, foi utilizada a técnica de microbiolizar as sementes com bactérias, que levou a resultados positivos. Não existem estudos conclusivos da interação entre isolados e genótipos de plantas de interesse. O que se sabe é que essa interação está relacionada com diferenças no ambiente da rizosfera e da constituição genética. A prospecção de estirpes promotoras de crescimento em eucalipto envolve, em sua maioria, o uso de clones, pois a propagação do eucalipto para produção de mudas ocorre por enraizamento de estacas (Mafia et al., 2009). As sementes são mais utilizadas em programas de melhoramento e em campos de produção.

Testando dois métodos de inoculação, a adição de suspensão de rizobactérias no substrato e a microbiolização das miniestacas na mesma suspensão de inóculo, Mafia et al. (2009) observaram que em geral, não houve diferença entre os métodos de inoculação, e todos os isolados aumentaram o enraizamento e a biomassa radicular. Alguns resultados indicaram interação entre clones de eucalipto e isolados de rizobactérias. Zarpelon (2007) observou uma maior eficiência no enraizamento de miniestacas e crescimento de mudas em formulação turfosa com rizobactérias, propiciando os maiores incrementos do que em solução estabilizante. Também foi relatada a interação entre clones/isolados, onde o clone de *E. grandis* respondeu

melhor a rizobacterização do que o do híbrido “urograndis”. Mafia et al. (2007) não observaram a interação entre isolados e substrato de enraizamento. Dessa forma, nem sempre é comparável resultados de estudos de promoção de crescimento utilizando diferentes tipos de ensaios, formulações, clones, sementes.

Inicialmente o uso de fertilizantes bacterianos não simbiotes propiciavam ganhos de 10-20 % na produtividade em diversas culturas (Brown, 1974). Segundo (Chanway, 1997), os ganhos médios seriam de 15 a 30% e, em casos especiais, até mesmo dobrar a biomassa produzida, mas obviamente esses valores são variáveis. Mafia et al. (2005) testando diferentes clones observaram variação no incremento de biomassa radicular chegando a 69%, com destaque para o isolado de *B. subtilis*. Zarpelon (2007) observou uma maior eficiência no enraizamento de miniestacas e crescimento de mudas em formulação turfosa de um isolado de *B. subtilis* (S1), com incremento de 47% de parte aérea e 40% de biomassa radicular. Isolados da rizosfera de eucalipto propiciaram ganhos de até 250% no peso seco de raízes (Teixeira et al., 2007). Foi demonstrado ganhos no índice de enraizamento e de biomassa radicular em tratamento com a aplicação de fonte alimentar enriquecida com leite em pó, variando entre 40,6 e 114,2% de biomassa radicular, segundo Mafia et al. (2007). Mais tarde, Mafia et al. (2009) relataram a interação do isolado de rizobactéria 3918 (*Bacillus subtilis*) e o clone 1172 (“urograndis”), resultando em ganhos percentuais de 187,6% também de biomassa radicular.

Assim como no presente estudo, Rezende (2010) avaliou isolados obtidos de condições extremas na promoção do crescimento do tomate, e os gêneros pertencentes a *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp. mostraram os maiores incrementos de matéria seca total de 102,3% e 140,2%, respectivamente. Aqui, foram as estirpes pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. que proporcionaram os maiores ganhos de matéria seca da parte aérea e raízes de 78,0% (UnB 1366) e 130,% (UnB1368), respectivamente, em comparação as estirpes do gênero *Enterobacter* sp. também utilizadas.

Como citado por Kloepper & Schorth (1978), as bactérias que colonizam o rizoplano podem ter efeito benéfico, neutro ou deletério às plantas hospedeiras, o que pode ter ocorrido, por exemplo, no caso das estirpes UnB 1367 (*Enterobacter* sp.) e UnB 1374 (*Bacillus* sp.), que exibiram baixa germinação de sementes, incremento massa seca de parte aérea e biomassa de raízes. Procópio (2004), avaliando promoção de crescimento em eucalipto com bactérias endofíticas desta planta, também observaram uma interação negativa.

A precocidade de germinação das sementes observada neste estudo foi relatada por Cunha et al. (2005), em sementes de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*) plantadas em substrato rizobacterizado, otimizando a produção das mudas.

Segundo Mafia et al. (2009), para otimizar a interação entre isolados e clones torna-se necessário selecionar aqueles que são capazes de aumentar o enraizamento e crescimento de maior número de clones possível, além de estudos para aplicação da tecnologia em larga escala, em misturas e em formulação comercial. Existem poucos bioagentes comerciais à base de RPCPs e estes englobam três gêneros, *Agrobacterium*, *Bacillus* e *Pseudomonas*. O emprego de tais bactérias é uma tática sustentável, diminuindo a utilização de produtos químicos, mas para isso uma série de problemas deve ser solucionada, fazendo com que seu uso eficaz seja implementado (Luz, 1996).

CONCLUSÃO

O estudo de populações bacterianas benéficas, tais como as RPCPs, é um trabalho contínuo e teve início há mais de um século. Neste trabalho, pioneiro no uso de baterias extremófilas facultativas, algumas estirpes mostraram resultados interessantes nos testes e na germinação de sementes, de forma que estudos pertinentes, tais como: outras formas de veiculação das bactérias, formulações, adição de fontes alimentares, combinações ou mesmo utilização de outras espécies ou clones de eucalipto para verificação de interações, devem ser realizados, para que possam ser utilizadas na otimização da produção de mudas, assim como a investigação do mecanismo de ação dessas bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF (2011) Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. Informativo 224. <http://www.abraflor.org.br/informativo/ABRAF224.pdf>

ABRAF (2008) Anuário Estatístico: ano base 2008. <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF09-BR.pdf>

BRACELPA (2009) Relatório Anual. http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/public/RA02-RelatorioFlorestal_2009.pdf

Brandão EM (1992) Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: Cardoso EJB, Tsai SM, Neves MCP (Eds.) Microbiologia do Solo. Campinas SP. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. pp.1-15.

Brown ME (1974) Seed and root bacterization. Annual Review of Phytopathology 2:181-197.

Chanway CP (1997) Inoculation of tree roots with PGPR soil bacteria: An emerging technology for reforestation. Forest Science 43:99-112.

Cunha J de MS (2005) Rizobacterização no crescimento de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides*). Tese de Mestrado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa.

Kloepper JW (1996) Host specificity in microbe-microbe interactions. BioScience 46:406-409.

Kloepper JW, Schroth MM (1978) Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: international conference on plant pathogenic bacteria 4. Proceedings...Angers, France. p.879-882.

Latour X, Lemanceau P (1997) Carbon and energy metabolism of oxidase positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie* 17:427-443.

Lemos MTO (2009) Prospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em quatro espécies arbóreas nativas do Brasil. Dissertação de Mestrado. Jaboticabal SP. Universidade Estadual de São Paulo.

Luz WC (1996) Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 4:1-49.

Luz WC (1993) Microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 1:33-77.

Madigan MT (2000) Extremophilic bacteria and microbial diversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 87:3-12.

Mafia RG, Alfenas AC, Maffia LA, Ferreira EM, Binoti DHB, Siqueira L (2009) Microbiolização e interação entre rizobactérias promotoras do crescimento e clones de eucalipto. *Revista Árvore* 33:789-797.

Mafia RG, Alfenas AC, Maffia LA, Ferreira EM, Teixeira D do AE, Zauza EAV (2007) Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. *Revista Árvore* 31:589-597.

Mafia RG, Alfenas AC, Ferreira EM, Zarpelon TG, Siqueira L (2005) Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. *Revista Árvore* 29:843-851.

Mendes IC, Reis Junior FB (2001) Microrganismos do solo e a sustentabilidade dos agroecossistemas. <http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/188/>

Moreira FMS, Siqueira JO (2006) Microbiologia e Bioquímica do solo. Lavras MG. Editora UFLA.

Paz ICP (2009) Bactérias endofíticas de eucalipto e potencial uso no controle de doenças e promoção de crescimento de mudas em viveiros florestais. Tese de Doutorado. Porto Alegre RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Procópio RE (2004) Diversidade de bactérias endofíticas de *Eucalyptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico. Tese de Doutorado. Piracicaba SP. Universidade de São Paulo.

Ran LX, Li ZN, Wu GJ, Van Loon LC, Bakker PAHM (2005) Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. *European Journal of Plant Pathology* 113:59-70

Rezende AMFA (2010) Bactérias extremófilas facultativas: efeito na promoção de crescimento de tomate e na supressão de *Ralstonia solanacearum*. Tese de Doutorado. Brasília DF. Universidade de Brasília.

Rodrigues LMR (2010) Avaliação da agressividade e caracterização genética de linhagens de *Ralstonia solanacearum* isoladas de diferentes plantas hospedeiras. Tese de Mestrado. Botucatu SP. Universidade Estadual Paulista.

Romeiro R da S (2007) Controle biológico de doenças de plantas. Viçosa MG. Editora UFV.

SBS – Sociedade Brasileira de Silvicultura (2008) Fatos e números do Brasil florestal. <http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>

Silva FAS, Azevedo CAV (2009) Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: World Congress on Computers in Agriculture 7. Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.

Siqueira JO (1993) Biologia do solo. Lavras, MG. ESAL/FAEPE. 230p.

Teixeira DA, Alfenas AC, Mafia RG, Ferreira EM, Siqueira L, Maffia LA, Mounteer AH (2007) Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:118-123.

Teixeira DA (2001) Promoção do enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem e à mancha-de-cylindrocladium, mediadas por rizobactérias em clones de *Eucalyptus* spp. Tese de Doutorado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa.

Zago VCP, De-Polli H, Rumjanek NG (2000) *Pseudomonas* spp. Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 32p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 127).

Zarpelon TG (2007) Caracterização de rizobactérias e eficiência do Rizolyptus[®] no enraizamento e crescimento do eucalipto. Tese de Mestrado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a importância das bacterioses em plantas, a murcha bacteriana do eucalipto, causada por *Raltonia solanacearum*, pode limitar o uso de clones suscetíveis. Este trabalho descreveu e caracterizou a Raça 3 biovar 2T, obtida de cultivo de campo de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, e alerta a possibilidade de contaminação de viveiros clonais com tal biovar ou mesmo a ocorrência de novas infecções de campo em outras regiões. Esse patógeno já é reconhecido por sua alta capacidade de sobrevivência no solo, de diferentes formas, além da natureza sistêmica de sua infecção, que limita e dificulta seu controle. Em condições de infecção artificial, as estirpes obtidas foram capazes de infectar grande parte das plantas descritas na literatura como suscetíveis, além das arbóreas moringa e cajueiro, o que preocupa ainda mais ao se levantar a possibilidade de adaptação do patógeno a diferentes hospedeiras. Não se pode afirmar a origem da fonte de inóculo na área de cultivo de eucalipto, em Alexânia - Goiás, mas é notório o fato da bactéria ocorrer naturalmente em solos brasileiros.

Os estudos pioneiros de controle e promoção de crescimento com bactérias extremófilas facultativas exibiram resultados positivos. Tais estirpes permitiram o melhor desenvolvimento das plantas na interação com o patógeno no solo, além de ter levado a incrementos de massa seca e aumento no potencial de germinação das sementes, podendo ser utilizadas na otimização da produção de mudas e em estudos com outras espécies de plantas que exibam baixa germinação.

A interação entre a Raça 3 biovar 2T de eucalipto com o solo, revelou que os organossolos e cambissolos parecem desfavorecer o patógeno, e por outro lado, os latossolos são condutivos a ocorrência da doença. Os estudos da interação do patógeno com o solo são escassos e tal informação é de suma importância, uma vez que o solo é uma fonte de sobrevivência de *Ralstonia solanacearum*.

As perspectivas para possíveis continuações desse trabalho poderiam ser estudos que estabeleçam condições ideais para desenvolvimento da doença em casa de vegetação, imprescindível para o estudo deste patossistema, pois como relatado, observa-se baixa frequência de murcha nestas condições, dificultando as avaliações. Além disso, as estirpes bacterianas obtidas devem ser testadas com outros protocolos de avaliação da resistência genética, inclusive em condições de campo, verificando possíveis interações ambientais e na ausência de metodologias definidas, estabelecer protocolos para avaliação da resistência.

ANEXO

Sequências parciais (5'→3') do gene 16S ribossomal, amplificado por PCR com os *primers* R1387 e P027F e respectivos isolados – estirpes

pH 3GLEI (2) – UnB 1366

TACCCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGSTGTGACGGGCGGTGTG
TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAG
CGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAACGG
TTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATT
GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGCTCCC
CACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTTAATG
ATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATC
TCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACYTGTCACTCTGCTCCCGA
AGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTKTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGG
TTCTTCGCGTCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCC
GTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGC GGCCGTA CTCCCCAGGCGGAGTGCT
TAATGCGTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAACCTCTAACACTTAGCACTC
ATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGC
TTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTG
TTCTCATATCTCTACGCATTTCA

pH 5 ORGA – UnB 1367

TAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTG
TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGC
GATTCCGACTTCATGGAGTCGAGGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCAC
TTTATGAGGTCCGCTTGTCTTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTG
TAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGCTCCCCA

CCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCT
GGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTC
ACAACACGAGCTGACACGCCATGCAGCAYYTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGC
ACCAAWSCATCTCTGSWAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCT
TCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGGCGGCCCCCGTCA
ATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGCGACTTAAC
GCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATC
GTTTACGGCGGGACACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCG
CACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCT
CCAGATCTCTACGCATTTCA

pH 5 LVA – UnB 1368

TACCCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTG
TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCSCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGC
GATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGGCAGCCTACAATCCGAAGTGAACGGT
TTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTG
TAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGCTCCCC
ACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTTAATGA
TGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT
CACGACACGAGCTGACGCACCATGCACCAYYTGTCACTCTGCTCCCGAAGG
AGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCT
TCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGCCCCCGTCA
ATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAAT
GCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCAT
CGTTTACGGCGGGACACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTC
GCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTC
TCCATATCTCTACGCATTTCA

pH 7 ORGA (2) – UnB 1369

TAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGYGTGACGGGCGGTGTG
TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGC
GATTCCGACTTCATGGAGTCGAGGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCAC
TTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTG
TAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGCTCCCCA
CCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCT
GGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTC
ACAACACGAGCTGACACGCCATGCAGCWYCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGC
ACCAAWSCATCTCTGSWAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCT
TCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGGCGGCCCCCGTCA
ATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGCGACTTAAC
GCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATC
GTTTACGGCGGGACACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCG
CACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCT
CCAGATCTCTACGCATTTCA

pH 7CAMB – UnB 1370

TAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTG
TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTASCATTCTGATCTACGATTACTAGC
GATTCCGACTTCATGGAGTCGAGGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCAC
TTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTG
TAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGWAAGGGCCATGATGACTTGACGCTCCCC
ACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCG
CTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATT
TCACAACACGAGCTGACACGCCATGCAKYWYYTGTCTCAGAGTTCCCGAAG
GCACCAAWSCATCTCTGSWAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTT
CTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGGCGGCCCCCGT
CAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGCGACTTA
ACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACA
TCGTTTACGGCGGGACACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTT

CGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTC
CTCCAGATCTCTACGCATTTCA

pH 7LV – UnB 1371

TAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGGCGGTGTG
TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTASCATTCTGATCTACGATTACTAGC
GATTCCGACTTCATGGAGTCGAGGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCAC
TTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTG
TAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGCTCCCCA
CCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCKRACCGCT
GGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTTC
ACAACACGAGCTGACACGCCATGCAKYWYYTGTCTCAGAGTTCCCGAAGG
CACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCT
TCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGT
CAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGACTTAAC
GCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATC
GTTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACCTTCGC
ACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATCCTCC
AGATCTCTACGCATTTCA

pH 9 LVA – UnB 1372

TACCCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGGCGGTGTG
TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAG
CGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAACGG
TTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATT
GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGCTCCC
CACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTTAATG
ATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATC
TCACGACACGAGCTGACGCACCATGCACCACYTGTYWYTCTGCTCCCGAAG
GAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTT

CTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTCGGCCCCCGT
CAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTA
ATGCGTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTC
ATCGTTTACGGCGGCACACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTT
TCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTT
CCTCCATATCTCTACGCATTTCA

pH 10 GLEI – UnB 1373

TACCTCACGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGGCGGTGTGT
ACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGC
GATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGA
TTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTG
TAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTACCCC
ACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGC
TGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT
CACGACACGAGCTGACGAAACATGCACCAYCTKTCWYTCTGCCCCGAAGG
GGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCT
TCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTTGGGGCCCCGTCA
ATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAAT
GCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCAT
CGTTTACGGCGTGACTCCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTC
GCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTCCT
CCACATCTCTACGCATTTCA

10% LVA – UnB 1374

TACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGGCGGTGTG
TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAG
CGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAG
ATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATT
GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGCTCCC

CACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATG
CTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATC
TCACGACACGAGCTGACGCACCATGCAYYAYCTGTCACTCTGCCCCGAAG
GGGACGTCTATCTCTAGGATTGTCAAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTT
CTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTCGGCCCCCGT
CAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTA
ATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTC
ATCGTTTACGGCGGGACACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTT
TCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTT
CCTCCACATCTCTACGCATTTTC

15% GLEI (2) – UnB 1375

TACCCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTG
TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCSCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGC
GATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGGCAGCCTACAATCCGAAGTGAACGGT
TTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGACGCTCTTTGTACCGTCCATTG
TAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGCTCCCC
ACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTTAATGA
TGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT
CACGACACGAGCTGACGCACCATGCACCACTGTCACTCTGCTCCCGAAGG
AGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCT
TCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTCGGCCCCCGTCA
ATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAAT
GCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCAT
CGTTTACGGCGGGACACCAGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCG
CGCCTCAGTGTCAAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCT
CCATATCTCTACGCATTTCA