

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

RÓDNEY LÚCIO PINHEIRO HENRIQUE

**COMPORTAMENTO DE *Ralstonia solanacearum* DE EUCALIPTO EM
SOLO CONTENDO GLIFOSATO**

Ilha Solteira

2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Ilha Solteira

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

RÓDNEY LÚCIO PINHEIRO HENRIQUE

COMPORTAMENTO DE *Ralstonia solanacearum* DE EUCALIPTO EM SOLO CONTENDO GLIFOSATO

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Especialidade: Sistemas de Produção

Profa. Dra. Ana Carolina Firmino
Orientadora

Ilha Solteira

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

H519c Henrique, Ródney Lúcio Pinheiro.
Comportamento de *Ralstonia solanacearum* de eucalipto em solo contendo glifosato / Ródney Lúcio Pinheiro Henrique. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2022
75 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2022

Orientador: Ana Carolina Firmino
Inclui bibliografia

1. Murcha bacteriana. 2. Herbicida. 3. Biodegradação. 4. Fenilalanina. 5. Peroxidase.



João Josué Barbosa

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Diretor Técnico
CRB 8-5642



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Comportamento de *Ralstonia solanacearum* de eucalipto em solo contendo glifosato

AUTOR: RODNEY LÚCIO PINHEIRO HENRIQUE

ORIENTADORA: ANA CAROLINA FIRMINO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA, área: Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. ANA CAROLINA FIRMINO (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena UNESP

Dr. DANIEL DIAS ROSA (Participação Virtual)
Departamento de Fitopatologia / Syngenta seeds Ltda

Prof. Dr. LEANDRO TROPALDI (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

Ilha Solteira, 26 de novembro de 2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sônia e José; e aos meus irmãos Roger e Cynthia, por todo o amor e por sempre me apoiarem em todos os momentos da minha vida.

Ao meu sobrinho e afilhado Miguel Henrique, por todo o amor e por sempre trazer alegria.

À Diego Santos Lojo, pela amizade, companheirismo e amor, sempre. E à sua família pelo acolhimento e incentivo.

À minha orientadora, Dra. Ana Carolina Firmino, pela orientação, paciência, compreensão, conselhos, prestatividade, ensinamentos e oportunidades durante minha jornada.

À minha família no geral, que sempre me ajudou quando precisei.

Aos amigos que fiz durante minha caminhada, assim como aos que sempre estiveram presentes, em especial Izabela Ponso Magalhães, Marcus Gabriel Santrin, Jhemys Vinícius dos Santos Alves e Henrique Alves.

À todas as pessoas que fazem parte do laboratório de Fitopatologia da FCAT/Unesp – Dracena, assim como todos que me ajudaram de alguma maneira, em especial Izabela Ponso, Marcela Eloi, Marcela Bergamini, Gustavo, Bruno Rafael e Lucas Alves.

Ao prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto e à sua orientada Camila, pelo auxílio e disponibilização de seu laboratório para meus estudos.

Aos professores Dr. Paulo Renato Matos Lopes e Dr. Leandro Tropaldi, pela orientação e considerações durante parte do projeto.

À profa. Dra. Flávia Thomaz Verechia Rodrigues, pela disponibilização de seu laboratório.

A todos os professores, técnicos e servidores da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT/Unesp – Dracena), pelos ensinamentos, respeito e por auxiliarem minha trajetória.

Aos professores, técnicos e servidores da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/Unesp – Ilha Solteira), pelos ensinamentos e auxílios durante o mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Aprendemos e crescemos pelo amor ou pela adversidade. A dificuldade
é um implacável professor.”

- Johnny De'Carli

RESUMO

A *Ralstonia solanacearum* é um dos principais patógenos do eucalipto por ser causadora da murcha bacteriana, doença que tem sido fator limitante na cultura. A bactéria é um patógeno de solo com hábitos saprofiticos e é capaz de interagir com a microbiota e elementos do solo em que vive. Diante do exposto e sabendo que herbicidas amplamente utilizados em plantios de eucalipto, como o glyphosate, podem deixar resíduos no solo, o presente trabalho teve como objetivo analisar o comportamento de *R. solanacearum* isolada de eucalipto em solo contendo doses de glyphosate. Para a realização dos experimentos a solução bacteriana foi preparada e inoculada em solo estéril, na presença de mudas de eucalipto, tratadas com diferentes doses de glyphosate. Foram utilizados sete tratamentos: solo; solo + *R. solanacearum*; solo + *R. solanacearum* + dose recomendada de glyphosate (0,36 mg e.a. L⁻¹); e para os tratamentos seguintes as doses foram sendo dobradas até alcançar a dose de 16 vezes (0,72 mg e.a. L⁻¹, 1,44 mg e.a. L⁻¹, 2,88 mg e.a. L⁻¹ e 5,76 mg e.a. L⁻¹, respectivamente). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento, totalizando 70 parcelas experimentais. Foi realizada a quantificação da população bacteriana de amostras de solo dos tratamentos em diferentes períodos, em meio de cultura Kelman, além de análise da atividade das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase, ligadas à defesa da planta. Também foram realizadas análises morfofisiológicas das plantas e análise respirométrica do solo. Houve aumento da população da bactéria no solo com o aumento das doses do herbicida, havendo diminuição apenas nas doses mais altas. Os tratamentos que continham glyphosate interferiram na atividade das enzimas analisadas, onde sobredoses aumentaram a atividade de peroxidase e diminuíram a atividade de fenilalanina amônia-liase. Doses de glyphosate induziram a maior produção de biomassa. A presença do glyphosate apresentou aumento na respiração do solo com presença do patógeno, principalmente no tratamento com 8 vezes a dose recomendada. A utilização de glyphosate no controle de plantas daninhas na cultura do eucalipto apresentou interação com *R. solanacearum*, necessitando de estudos mais específicos.

Palavras-chave: murcha bacteriana; herbicida; biodegradação; fenilalanina; peroxidase.

ABSTRACT

Ralstonia solanacearum is one of the main pathogens of eucalyptus as it causes bacterial wilt, a disease that has been a limiting factor in the culture. The bacterium is a soil pathogen with saprophytic habits and is able to interact with the microbiota and soil elements in which it lives. Given the above and knowing that herbicides widely used in eucalyptus plantations, such as glyphosate, can leave residues in the soil, this study aimed to analyze the behavior of *R. solanacearum* isolated from eucalyptus in soil containing doses of glyphosate. To carry out the experiments, the bacterial solution was prepared and inoculated in sterile soil, in the presence of eucalyptus seedlings, treated with different doses of glyphosate. Seven treatments were used: soil; soil + *R. solanacearum*; soil + *R. solanacearum* + recommended dose of glyphosate (0.36 mg e.a. L⁻¹); and for the following treatments the doses were doubled until reaching a dose of 16 times (0.72 mg a.e. L⁻¹, 1.44 mg a.e. L⁻¹, 2.88 mg a.e. L⁻¹ and 5.76 mg e.a. L⁻¹, respectively). The experimental design used was completely randomized, with 10 replications per treatment, totaling 70 experimental parcels. The quantification of the bacterial population of soil samples from the treatments at different periods was carried out, in Kelman culture medium, in addition to the analysis of the activity of the enzymes peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase, linked to plant defense. Morphophysiological analyzes of the plants and respirometric analysis of the soil were also carried out. There was an increase in the population of bacteria in the soil with increasing doses of the herbicide, with a decrease only in the highest doses. The glyphosate treatments interfered in the activity of the analyzed enzymes, where overdoses increased the peroxidase activity and decreased the phenylalanine ammonia-lyase activity. Glyphosate doses induced the highest biomass production. The presence of glyphosate showed an increase in soil respiration with the presence of the pathogen, especially in the treatment with 8 times the recommended dose. The use of glyphosate to control weeds in the eucalyptus crop showed interaction with *R. solanacearum*, requiring more specific studies.

Keywords: bacterial wilt; herbicide; biodegradation; phenylalanine; peroxidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do herbicida glyphosate.....	22
Figura 2 – Solução bacteriana de <i>R. solanacearum</i> em meio líquido.....	27
Figura 3 – Soluções bacterianas de <i>R. solanacearum</i> para a inoculação das parcelas experimentais.	29
Figura 4 – Coleta de amostras de solo em plantio de eucalipto das parcelas experimentais inoculados com <i>R. solanacearum</i> , sob aplicação de glyphosate.	30
Figura 5 – Homogeneização das amostras de solo em água destilada esterilizada com o auxílio de aparelho agitador.	30
Figura 6 – Colônias de <i>Ralstonia solanacearum</i> em placas de Petri. Isolados obtidos por meio das amostras de solo de seus respectivos tratamentos.	31
Figura 7 – Recipiente utilizado como respirômetro para os tratamentos do experimento de respiração de solo.	33
Figura 8 – Quantificação da população de <i>R. solanacearum</i> em Unidade Formadora de Colônia (UFC) nas amostras de solo sob doses de glyphosate ao decorrer de 28 dias.	37
Figura 9 – Quantificação da população de <i>R. solanacearum</i> em UFC nas amostras de solo sob presença de glyphosate após 7 dias.	39
Figura 10 – Quantificação do teor de proteínas de plantas de eucalipto com murcha bacteriana de <i>R. solanacearum</i> sob doses de glyphosate ao decorrer de 28 dias.....	40
Figura 11 – Atividade da POD de plantas de eucalipto com murcha bacteriana de <i>R. solanacearum</i> sob doses de glyphosate ao decorrer de 28 dias.	43
Figura 12 – Atividade da peroxidase em plantas de eucalipto com murcha bacteriana de <i>R. solanacearum</i> sob doses de glyphosate após 7 dias.....	44
Figura 13 – Atividade da FAL de plantas de eucalipto com murcha bacteriana de <i>R. solanacearum</i> sob doses de glyphosate ao decorrer de 28 dias.	46
Figura 14 – Atividade da fenilalanina amônia-liase em plantas de eucalipto com murcha bacteriana de <i>R. solanacearum</i> sob doses de glyphosate após 7 dias.	47
Figura 15 – Médias e desvios padrões da altura de plantas de eucalipto em solos com <i>R. solanacearum</i> sob doses de glyphosate; * $p < 0,05$	48

Figura 16 – Médias e desvios padrões do índice SPAD de plantas de eucalipto em solos com <i>R. solanacearum</i> sob doses de glyphosate; * p < 0,05.	48
Figura 17 – Médias e desvios padrões da biomassa de plantas de eucalipto em solo com <i>R. solanacearum</i> sob doses de glyphosate; * p < 0,05.	49
Figura 18 – Biomassa de plantas de eucalipto em solo com <i>R. solanacearum</i> sob doses de glyphosate.....	50
Figura 19 – Folha apical de eucalipto com murcha bacteriana de <i>R. solanacearum</i> sob doses de glyphosate, apresentando desenvolvimento de folhas túrgidas e disformes.....	51
Figura 20 – Produção acumulada de CO ₂ , em gramas, por 50 dias.....	52
Figura 21 – Produção diária de CO ₂ em mg por 50 dias.	54
Figura 22 – Interior de respirômetro contendo amostra de solo com sinais de desenvolvimento de fungos após 35 dias de avaliação.	55
Figura 23 – Análise de componentes principais (PCA), mapeamento fatorial da relação hospedeiro-patógeno-agrotóxico.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Doses de campo de RoundUp WG e respectivas concentrações do equivalente ácido sal de amônio de glifosato.	28
Tabela 2 – Parametrização e adequação do modelo de superfície de resposta para quantificação da população de <i>R. solanacearum</i> em solo contendo plantas de eucalipto sob efeito de glyphosate ao longo de 28 dias.	36
Tabela 3 – Parametrização e adequação do modelo de superfície de resposta para o teor de proteínas de plantas de eucalipto com murcha bacteriana de <i>R. solanacearum</i> sob efeito de glyphosate ao longo de 28 dias.	41
Tabela 4 – Teor de proteínas de plantas de eucalipto com murcha bacteriana de <i>R. solanacearum</i> sob efeito de doses de glyphosate após 7 dias.	41
Tabela 5 – Parametrização e adequação do modelo de superfície de resposta para a atividade da POD de plantas de eucalipto com murcha bacteriana de <i>R. solanacearum</i> sob efeito de glyphosate.	43
Tabela 6 – Parametrização e adequação do modelo de superfície de resposta para a atividade da FAL de plantas de eucalipto com murcha bacteriana de <i>R. solanacearum</i> sob efeito de glyphosate.	46
Tabela 7 – Altura de plantas de eucalipto após 28 dias, inoculadas com <i>R. solanacearum</i> , sob doses de glyphosate.	49
Tabela 8 – Índice SPAD de plantas de eucalipto após 28 dias, inoculadas com <i>R. solanacearum</i> , sob doses de glyphosate.	49
Tabela 9 – Porcentagem de plantas de eucalipto inoculadas com <i>R. solanacearum</i> , sob doses de glyphosate com sintomas de murcha bacteriana.	51
Tabela 10 – Produção acumulada de CO ₂ em mg em 50 dias.	53
Tabela 11 – Relações lineares entre variáveis analíticas; significância: $p < 0,05$	55
Tabela 12 – Pontos ortogonais latentes no complexo solo-bactéria-planta-agrotóxico.	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPA	Ácido aminometilfosfônico
BDA	Batata-dextrose-ágar
°C	Graus Celsius
CP	Componente principal
CO ₂	Gás carbônico
e.a.	Equivalente ácido
EC	Número EC (<i>Enzyme Commission Number</i>)
EPSPs	5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase
FAL	Fenilalanina amônia-liase
g	Gramas
GLY	Glyphosate
GOX	Glifosato oxidoreductase
ha	Hectare
kg	Quilos
KOH	Hidróxido de potássio
L	Litros
M	Molar
ml	Mililitros
mg	Miligramas
nm	Nanômetro
OD	Densidade óptica (<i>Optical density</i>)
p.c.	Produto comercial
PCA	Análise de componentes principais (<i>Principal component analysis</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
POD	Peroxidase
R_{adj}^2	R ² ajustado
RPM	Rotações por minuto
SAR	Sarcosina
UFC	Unidade formadora de colônia
WG	Granulado dispersível (<i>Water dispersible granules</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	<i>Eucalipto</i>	17
2.2	<i>Murcha bacteriana do eucalipto</i>	19
2.3	<i>Ralstonia solanacearum.....</i>	20
2.4	<i>Glyphosate</i>	22
2.5	<i>Biodegradação de glyphosate.....</i>	24
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1	<i>Preparo da cultura bacteriana</i>	26
3.2	<i>Preparo das diluições de glyphosate</i>	27
3.3	<i>Experimento em casa de vegetação</i>	28
3.3.1	<i>Avaliações dos dados do experimento em casa de vegetação</i>	29
3.3.1.1	<i>Quantificação de população bacteriana.....</i>	29
3.3.1.2	<i>Análises enzimáticas e do teor de proteínas das mudas de eucalipto.....</i>	32
3.3.1.3	<i>Análises morfofisiológicas das mudas de eucalipto</i>	32
3.4	<i>Experimento de respiração do solo tratado com glyphosate e inoculados com <i>R. solanacearum</i></i>	32
3.5	<i>Análise estatística</i>	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	<i>Análises do experimento em casa de vegetação</i>	35
4.1.1	<i>Análise de Unidade Formadora de Colônia em solo</i>	35
4.1.2	<i>Análises proteica e enzimáticas das plantas de eucalipto.....</i>	39
4.1.3	<i>Análise de características morfofisiológicas das plantas.....</i>	47
4.2	<i>Análises do experimento de respirometria</i>	52
4.3	<i>Análises das relações entre as variáveis obtidas</i>	55

5	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61

1 Introdução

A *Ralstonia solanacearum* é uma bactéria fitopatogênica de grande importância, pois além de ser cosmopolita, possui ampla gama de hospedeiros (HAYWARD, 1994; FREITAS *et al.*, 2021a). O patógeno é causador da doença conhecida como murcha bacteriana que afeta mais de 200 espécies de plantas, podendo causar perdas significativas em culturas economicamente relevantes, como diversas espécies de solanáceas, leguminosas, algumas monocotiledôneas e espécies florestais (HAYWARD, 1994; GENIN; BOUCHER, 2002; LOPES; ROSSATO, 2018).

Dentre as diversas espécies de plantas acometidas pelo patógeno, encontra-se o eucalipto, sendo que há ocorrência da doença na cultura em diversos locais no Brasil, como nos Estados de Minas Gerais, Santa Catarina, Goiás, Espírito Santo, Bahia, Maranhão e Pará (SUDO *et al.*, 1983; FONSECA *et al.*, 2014), além de diversas regiões pelo mundo como Paraguai (SANTIAGO *et al.*, 2014), Indonésia (GIYANTO *et al.*, 2021), Tailândia (PONGPANICH, 2000), China (RAN, 2005), África do Sul (COUTINHO *et al.*, 2000) e Equador (ÁLVAREZ ROMERO *et al.*, 2021).

No Brasil, os primeiros relatos da doença em plantas de eucalipto foram registrados em meados de 1980 (SUDO *et al.*, 1983), desde então o patógeno se tornou um dos mais importantes para a cultura. Os sintomas característicos da doença se expressam por murcha, morte de raízes e escurecimento e rachadura de cascas e caules, podendo chegar à necrose foliar (ALFENAS *et al.*, 2006).

A ocorrência de *R. solanacearum* em viveiros clonais é comum, fazendo com que, em diversas vezes, clones suscetíveis apresentem sintomas ainda durante a fase de mudas, enquanto clones aparentemente saudáveis sejam levados à campo, onde após situações adversas começam a apresentar sintomas da murcha bacteriana (COUTINHO; WINGFIELD, 2017). Condições de estresse são essenciais para a infecção da planta pelo patógeno, sendo que fatores como deficiência de raízes, manejo inadequado no plantio e infecção por patógenos primários são comuns (COUTINHO; WINGFIELD, 2017).

Um dos fatores que mais influenciam para o estresse durante os estágios iniciais do eucalipto, é a suscetibilidade às plantas daninhas, que pode

prejudicar de maneira expressiva o desenvolvimento da planta durante o primeiro ano de plantio (NAMBIAR; SANDS, 1993; FLORENTINE; FOX, 2003; GARAU *et al.*, 2009). Neste contexto, a utilização de herbicidas para o controle de plantas daninhas é prática comum, sendo o glyphosate, muito utilizado desde a fase de mudas no campo (CARVALHO *et al.*, 2016; CERVEIRA JUNIOR *et al.*, 2020).

O glyphosate é recomendado para o controle de plantas daninhas em pós-emergência e é um dos herbicidas mais utilizados mundialmente desde sua introdução no mercado, na década de 70, por ser de amplo-espectro, além de poder ser aplicado em culturas transgênicas, resistentes ao produto (DUKE; POWLES, 2008; SAMSEL; SENEFF, 2013).

Atualmente, diversos estudos indicam que a utilização indiscriminada e intensiva do produto tem ocasionado resíduos em solos, água e lençóis freáticos em diversas regiões do mundo (WAIMAN *et al.*, 2013; STRUGER *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2017; SILVA, 2018). Associadamente, diversos estudos em biorremediação têm sido feitos para diminuir os agravantes desses resíduos em solos, principalmente utilizando-se bactérias (GONZÁLEZ-VALENZUELA; DUSSÁN, 2018; MASOTTI *et al.*, 2021).

No geral, os microrganismos presentes no solo são capazes de degradar o glyphosate em dias ou meses, entretanto, são as bactérias que possuem maior potencial para fazê-lo (BORGGAARD; GIMSING, 2008), como *Arthrobacter atrocyaneus* (PIPKE; AMRHEIN, 1988) e *Pseudomonas sp.* (JACOB *et al.*, 1988).

Apesar da biodegradação ser fator desejável para resíduos de agrotóxicos em solos, há a possibilidade de microrganismos fitopatogênicos presentes no solo interagirem com as moléculas dos produtos, utilizando-as como forma de substrato (ALTMAN; CAMPBELL, 1977). Estudos a respeito da interação entre diversos herbicidas com fitopatógenos apontam que em alguns casos, o efeito pode ser benéfico para esses microrganismos (KATAN; ESHEL, 1973).

Diante do exposto, vale ressaltar que, apesar de haverem diversos estudos relacionados à biodegradação de glyphosate, pesquisas relativas à capacidade de fitopatógenos de solo em degradarem as moléculas do produto são escassas. Sendo assim, devido à grande importância da interação

herbicida e fitopatígeno, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento do fitopatígeno de solo, causador da doença da murcha bacteriana, *Ralstonia solanacearum*, isolada de eucalipto, em solo sob aplicação de glyphosate.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Eucalipto

O eucalipto (*Eucalyptus* spp.) é uma das espécies florestais mais comuns em diversas regiões do mundo, representando grande importância econômica, destacando-se por sua produtividade e velocidade de crescimento (GODED *et al.*, 2019). O gênero *Eucalyptus* é pertencente à família Myrtaceae e possui mais de 600 espécies e subespécies, sendo elas, em sua maioria, advindas da Austrália. Além das características já citadas, a adaptabilidade e diversidade de espécies são fatores que favorecem seu cultivo (CORREIA, 2011).

As espécies mais utilizadas de eucalipto, globalmente, são *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, e *E. globulus*, além de alguns híbridos entre elas, representando cerca de 80% das áreas de plantio (ROCKWOOD *et al.*, 2008). Os principais interesses econômicos advindos da cultura são carvão, celulose, madeira, óleos essenciais, produtos ornamentais, produção de mel, utilização como quebra-ventos e fitorremediação (TOURNIER *et al.*, 2003; FOLLEY; LASSAK, 2004; GORRINI *et al.*, 2004; ROCKWOOD *et al.*, 2004; OGUNWANDE, 2005, BOBIS *et al.*, 2020).

Os plantios de eucalipto ocorrem em áreas diversas, inclusive em regiões onde há déficit hídrico para a cultura. Neste sentido, alguns estudos enfatizam a capacidade de adaptação das espécies de *Eucalyptus*, indicando que, em situações de estresse hídrico, as plantas são capazes de realizar alterações fisiológicas com o intuito de manterem seu desenvolvimento. Dentre as mudanças constatadas estão a redução da condutância estomática e inibição de expansão celular, que resultam na diminuição da assimilação de carbono, fazendo com que o desenvolvimento das plantas também ocorra de forma mais lenta (CORREIA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2004).

Em casos onde o estresse hídrico se agrava, as plantas de *Eucalyptus* ainda podem desenvolver seu sistema radicular, além de buscarem água em maiores profundidades (LI *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2004; BATTIE-LACLAU *et al.*, 2014; CHRISTINA *et al.*, 2018). Não obstante, o déficit hídrico de maneira crítica ainda é fator limitante e pode causar a morte das plantas (MCDOWELL *et al.*, 2008).

A ocorrência de plantas daninhas também afeta diretamente o desenvolvimento do eucalipto, interferindo no crescimento das plantas desde o início de seu desenvolvimento, exigindo assim aplicações de herbicidas ainda na fase de mudas (CARVALHO *et al.*, 2016).

A interferência causada por plantas daninhas é fator que se destaca na cultura, visto que a alta incidência, principalmente durante o início de desenvolvimento das plantas, pode ocasionar em redução do crescimento e até a morte das plantas, exigindo aplicações de herbicidas desde o estágio de mudas (CARVALHO *et al.*, 2016).

No Brasil, o cultivo de eucalipto representa importante atividade, visto que no ano de 2020 as áreas de plantio alcançaram mais que 5,7 milhões de hectares (FRIGOTTO *et al.*, 2020), e de acordo com IBÁ (2020), durante o mesmo ano, cerca de 154,2 milhões de metros cúbicos de *Eucalyptus* spp. foram comercializados. As áreas de floresta plantada formadas por eucalipto têm aumentado, em grande parte, devido ao melhoramento genético aumentando a produtividade da cultura, além de melhorias em hibridação, clonagem e manejo (ASSIS, 2015).

O aumento de produtividade está diretamente relacionado à propagação vegetativa de clones com alto potencial e performance, sendo este método o mais utilizado em plantios. A utilização de clones híbridos com características desejáveis, como rápido crescimento e resistência a doenças, é comum em países de regiões tropicais e subtropicais, como na África do Sul, China e Brasil (MESKIMEN *et al.*, 1987; ROCKWOOD *et al.*, 2008).

A resistência a doenças é fator desejável, pois diversos são os patógenos que podem atacar o eucalipto, desde a fase de viveiro até o plantio à campo, sendo em sua maioria, fungos (SANTOS *et al.*, 2001). A fase de viveiro, onde ocorre a produção de mudas clonais, representa um momento fundamental para a cultura, visto que o ambiente do viveiro apresenta

condições que favorecem o desenvolvimento de diversos patógenos, como alta umidade relativa do ar, temperaturas amenas, disponibilidade de água, matéria orgânica presente no substrato, tecido vegetal jovem, proximidade de mudas devido ao espaçamento adotado em viveiros e cultivo permanente da mesma espécie (HOPPE; BRUN, 2004; VOMERO, 2008).

As principais doenças fúngicas que ocorrem em viveiros clonais são *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* (mofo cinzento), *Cylindrocladium* spp., *Puccinia psidii* (ferrugem) e *Oidium eucalypti* (oídio); enquanto as principais doenças causadas por bactérias são: a mancha foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* e *Pseudomonas* spp., além da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (ALFENAS *et al.*, 2009).

Diversos patógenos podem ser levados de mudas contaminadas, porém sem sintomas, presentes em viveiros, até o campo, fazendo assim com que a doença se espalhe, como ocorre com a murcha bacteriana.

2.2 Murcha bacteriana do eucalipto

A murcha bacteriana, causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum*, é atualmente uma das doenças mais importantes do eucalipto no Brasil, apresentando potencial destrutivo desde o ambiente de viveiro até o plantio à campo (FREITAS *et al.*, 2021b). Em 2005, a ocorrência da doença no Brasil causou perdas em diversos Estados produtores, totalizando um prejuízo estimado em aproximadamente R\$ 6 milhões. Entretanto, considerando-se descartes e atrasos em cronogramas de empresas, os prejuízos elevam-se a cerca de 11 R\$ milhões, que seriam equivalentes a, aproximadamente, R\$ 35 milhões em 2021 (ALFENAS *et al.*, 2006; BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2021).

A doença foi relatada em *Eucalyptus* pela primeira vez na China (CAO, 1982) e desde então passou a ocorrer em outras regiões ao redor do mundo, como América do Sul, Austrália, África e Sudeste Asiático (COUTINHO *et al.*, 2000; FONSECA *et al.*, 2016). Até o ano de 2018 a doença ocorria apenas em áreas de clima quente e úmido, entretanto recentemente tem ocorrido aumentos recorrentes de surtos. Além disso, propagação do patógeno em viveiros clonais também é preocupação constante, visto que o plantio de

eucalipto por estacas sob condições estressantes favorece a contaminação (LOPES; ROSSATO, 2018).

Os principais sintomas da doença encontrados em viveiros são: murcha, escurecimento anelar da região do lenho, necrose foliar e morte de minicepas. (ALFENAS *et al.*, 2009).

O sintoma mais característico da doença no campo é a murcha da parte apical para a parte basal das plantas, que ocorre devido à suscetibilidade de clones ou quando o ambiente é favorável ao patógeno. Os demais sintomas que ocorrem em campo são: bronzeamento e necrose foliar, escurecimento e rachadura da casca das plantas na base do caule, descoloração do xilema, perda de folhas basais, além da morte de raízes e plantas (ALFENAS *et al.*, 2009).

A diagnose da doença pode ser facilmente obtida por meio do teste de exsudação de pus bacteriano (ALFENAS *et al.*, 2004; FERREIRA; MILANI, 2002), realizando-se um corte em um caule infectado e mantendo sua base em água, em câmara úmida, causando a exsudação de pus bacteriano.

De acordo com estudos prévios, a doença se tornou de fato importante, quando espécies de eucalipto foram selecionadas para o plantio sob manejo intensivo, agravando-se ainda mais após a mudança nas indústrias de produção de mudas, onde o método adotado passou a ser a propagação clonal de estacas (ALFENAS *et al.*, 2006; ALFENAS *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2014).

Pesquisas relacionadas a genótipos de eucalipto que apresentem resistência e o possível desenvolvimento de cultivares resistentes são de suma importância, pois aliados a medidas preventivas e manejo adequado, podem diminuir o potencial de danos e perdas causados pela incidência do patógeno (DIANESE *et al.*, 1990; FONSECA *et al.*, 2016).

2.3 *Ralstonia solanacearum*

A bactéria comumente responsável por causar a murcha bacteriana do eucalipto no Brasil é atualmente conhecida como *Ralstonia solanacearum* Smith (1896) (YABUUCHI *et al.*, 1995), é gram-negativa, aeróbia e um patógeno de solo (PATIL *et al.*, 2016). Suas colônias se apresentam sendo lisas, fluídas, levemente arredondadas e de coloração opaca, entretanto, em

meio de cultivo Kelman contendo tetrazólio, as colônias virulentas apresentam coloração avermelhada com bordas esbranquiçadas, enquanto colônias avirulentas são apenas vermelhas (KELMAN, 1954).

Por ser uma bactéria que se encontra presente no solo, seu principal método de infecção é a penetração por meio de ferimentos no sistema radicular, ou regiões de raízes novas. Uma vez dentro da planta, a bactéria se desenvolve em espaços intercelulares do córtex da raiz, assim como do parênquima vascular, causando a perda de estrutura de parede celular, fator que por sua vez tende a ocasionar a colonização de todo o sistema radicular, prejudicando principalmente os vasos do xilema. A bactéria também é capaz de secretar um exopolissacarídeo capaz de entupir os vasos condutores, o que também gera o sintoma de murcha e em casos mais severos, a morte das plantas (VASSE *et al.*, 1995; DENNY, 2000; GENIN; BOUCHER, 2002; MAFIA, 2006).

A *R. solanacearum* já possuiu diferentes classificações taxonômicas, sendo conhecida anteriormente como *Pseudomonas solanacearum* e *Burkholderia solanacearum* (EPPO, 2018). As primeiras classificações de isolados de *Ralstonia solanacearum sensu lato* se deram por raças e biovars, sendo a raça caracterizada pelo hospedeiro que a bactéria foi isolada, enquanto o biovar se relacionava à capacidade de um certo isolado de utilizar ou reagir a dissacarídeos e álcoois específicos (HAYWARD, 1964; HAYWARD, 1991). A abundância genética de cepas causadoras de murcha bacteriana, fez com que houvesse a necessidade de que esses isolados fossem associados ao complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* (RsSC), de modo a facilitar sua classificação (GENIN; DENNY, 2012).

Devido à metodologia de classificação em raças e biovars apresentar dificuldades, como demora para a obtenção dos resultados, além de não favorecer o agrupamento dos isolados de acordo com suas características geográficas ou filogenéticas, foram realizados estudos utilizando esquemas de classificação molecular, fundamentados na amplificação da região do espaçador transcrito interno 16S-23S rRNA (ITS), com o objetivo de simplificar a classificação do RsSC (FEGAN; PRIOR, 2005; FONSECA *et al.*, 2014 SAFNI *et al.*, 2014).

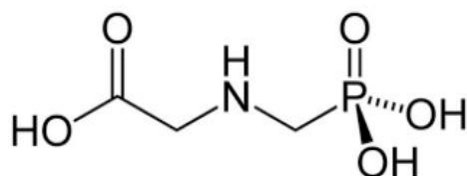
Como resultado dos estudos, dentro do complexo de espécies de *Ralstonia solanacearum* foram identificados quatro filótipos, sendo o Filótipo I caracterizado por isolados do continente Asiático, Filótipo II por isolados do continente Americano, Filótipo III por isolados do continente Africano e Filótipo IV por isolados da Indonésia, além de alguns isolados da Austrália, Japão e Filipinas (FEGAN; PRIOR, 2005; WICKER *et al.*, 2007; SAFNI *et al.*, 2014). Estudos recentes reclassificaram o RsSC em três espécies, sendo elas: *R. solanacearum* (Filótipo II), *Ralstonia pseudosolanacearum* (Filótipo I e III) e *Ralstonia syzygii* (Filótipo IV) (SAFNI *et al.*, 2014).

A *R. solanacearum* (Filótipo II) era a única espécie causando murcha bacteriana em *Eucalyptus* no Brasil (FONSECA *et al.*, 2014), não obstante, estudos recentes identificaram a espécie *R. pseudosolanacearum* (Filótipo I) infectando plantios de eucalipto e causando a doença (FREITAS *et al.*, 2020).

2.4 Glyphosate

O glyphosate [N-(phosphonomethyl)-glycine] é um dos principais herbicidas utilizados para o controle de plantas daninhas no mundo, sendo considerado o mais importante da história (DUKE; POWLES, 2008). O composto é um ácido orgânico fraco formado por um grupo fosfometil e um grupo glicina, sendo assim um derivado aminofosfônico da glicina (KACZYNSKI *et al.*, 2020). O produto foi introduzido no mercado na década de 1970, como um herbicida não seletivo, de pós-emergência, capaz de agir interferindo na produção de aminoácidos aromáticos essenciais para as plantas (WILLIAMS *et al.*, 2000). Na Figura 1 é representada a fórmula estrutural do herbicida glyphosate.

Figura 1 – Fórmula estrutural do herbicida glyphosate.



Fonte: Son *et al.* (2008).

O glyphosate pode ser recomendado para mais de 150 espécies de plantas daninhas, dentre monocotiledôneas e dicotiledôneas, perenes ou anuais (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). O herbicida é amplamente utilizado em espécies transgênicas resistentes a seu princípio ativo e é comumente utilizado em pré-colheita, com o intuito de realizar a dessecação da área, garantindo a melhor produtividade (EFSA, 2013; BECKIE; HALL, 2014; KACZYNSKI *et al.*, 2020).

Diversos herbicidas possuem o glyphosate como ingrediente ativo, sendo comercializados em diferentes tipos de sais, como sal de isopropilamina, de amônio, de potássio e sal de triênio. Atualmente, a utilização do glyphosate é comum em diversas áreas, como em ambientes rurais, urbanos, florestais e aquáticos (KANISSERY *et al.*, 2019).

Apesar da aplicação do glyphosate ser realizada, normalmente, na parte aérea das plantas, existem quatro possíveis rotas para o herbicida, sendo essas as folhas ou tecidos verdes no geral, raízes, o tronco e as brotações que são originadas da raiz ou caule (SHARMA; SINGH, 2001). Uma vez dentro da planta, a molécula é translocada para regiões em desenvolvimento, onde age inibindo a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs, EC 2.5.1.19), na via do Ácido Chiquímico (Chiquimato) (DUKE; POWLES, 2008).

A inibição da EPSPs acarreta no impedimento da biossíntese dos aminoácidos aromáticos essenciais tirosina, fenilalanina e triptofano, que, por sua vez originam compostos essenciais para o desenvolvimento e resistência da planta, como alcaloides, flavonoides, ácidos benzoicos e lignina, prejudicando diretamente a sua sobrevivência (FRANZ *et al.*, 1997; AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002; GRAVENA *et al.*, 2012). Após a absorção do glyphosate, as plantas podem sobreviver por volta de 1 a 3 semanas, sendo que após esse período todas as partes da planta perecem, devido ao modo de ação sistêmico do herbicida (CHANG; LIAO, 2002).

Os riscos de poluição e toxicidade para organismos não-alvo são baixos, visto que sua meia-vida no solo varia de dias a meses, pois a molécula do herbicida pode ser rapidamente degradada por ação microbiana ou ainda inativada, sendo fortemente adsorvida na fração coloidal (PICCOLO *et al.*, 1992; GIESY *et al.*, 2000). Estudos recentes enfatizam que, além de

microrganismos, algumas espécies de plantas também são capazes de degradar a molécula de glyphosate (DUKE, 2011). Não obstante, apesar dessas características, o glyphosate é utilizado, muitas vezes, de maneira indiscriminada e por conta disso passou a ser encontrado em ambientes pluviais como córregos, além de haver relatos sobre sua ocorrência em lençóis freáticos e solos (PERUZZO *et al.*, 2008).

Embora haja maior tendência de adsorção do glyphosate nos coloides, a sua mobilidade está relacionada à composição do solo, além da ação de outras substâncias presentes, como matéria orgânica, íons, fertilizantes e outros pesticidas (BOTT *et al.*, 2011; WAIMAN *et al.*, 2013). A exemplo, a Goethita é um mineral de ferro (Fe) que compõe solos e é de grande relevância para a adsorção do glyphosate, entretanto o mineral também é adsorvente de fosfato, um macronutriente amplamente utilizado como fertilizante, fazendo assim com que ocorra competição entre ambos. Neste contexto, estudos mostram que o fosfato é capaz de ocupar os espaços disponíveis em superfície antes do glyphosate (WAIMAN *et al.*, 2013).

Os principais mecanismos que auxiliam na sorção do glyphosate no solo são a troca de ligantes com os óxidos de ferro e alumínio, além da formação de pontes de hidrogênio entre o produto e matéria orgânica presente no solo (FENG; THOMPSON, 1990; VEIGA *et al.*, 2001).

Com a preocupação sobre a presença do composto em solos, diversos estudos sobre a degradação da molécula de glyphosate por microrganismos do solo têm sido realizados (ASCOLANI *et al.*, 2014.; ZHANG *et al.*, 2015; LA CECILIA; MAGGI, 2018; KACZYNSKI *et al.*, 2020).

2.5 Biodegradação de glyphosate

A biodegradação é o principal meio de degradação de compostos orgânicos e é realizada por microrganismos, podendo ocorrer direta ou indiretamente (PRATA, 2002). Os microrganismos, por meio de suas enzimas, são capazes de utilizar compostos orgânicos como substrato, fazendo com que eles sejam metabolizados e transformados em energia e nutrientes para sua sobrevivência (MAIER, 2000).

No que se refere ao glyphosate, os microrganismos presentes no solo são de fundamental importância, visto que podem degradar aproximadamente 50% da molécula em cerca de 28 dias, podendo alcançar até 90% de degradação da molécula original ao longo de 90 dias (RODRIGUES; ALMEIDA, 1995). Estudos sobre a degradação de glyphosate por plantas daninhas ainda são escassos, entretanto indicam que algumas espécies possuem potencial para metabolizar a molécula (DUKE, 2010).

No solo, a degradação do glyphosate pode ser realizada por diversos microrganismos presentes como actinomicetos, fungos e bactérias. As bactérias podem realizar a degradação por meio de duas principais rotas catabólicas, sendo a primeira e mais recorrente, responsável pela produção do metabólito intermediário conhecido como ácido aminometilfosfônico (AMPA) e a segunda responsável pela produção de sarcosina (SAR) (BORGGAARD; GIMSING, 2008; DUKE, 2011).

O processo de degradação do glyphosate mais comum é realizado por bactérias e pode ocorrer, principalmente, por meio de duas enzimas, sendo a glifosato oxidoreductase (GOX) e a C-P liase. O processo de degradação que ocorre pela ação da GOX tem início com a clivagem da ligação de nitrogênio carboximetileno (C-N), dando origem ao AMPA e ao glioxilato, sendo este, outro metabólito intermediário. Com relação à C-P liase, ela realiza a catálise da ligação carbono-fósforo (C-P) presente na molécula de glyphosate, dando origem a fosfato e sarcosina (SAR) (HOVE-JENSEN *et al.*, 2014; DUKE, 2020; MESNAGE; ANTONIOU, 2020; BHATT *et al.*, 2021).

Os microrganismos no geral podem utilizar a molécula de glyphosate como substrato para fornecimento de nutrientes, inclusive fósforo (P) para seu desenvolvimento. Além disso a mineralização de nitrogênio (N) e P também pode estimular o aumento da respiração desses microrganismos (DUKE *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2020; SVIRIDOV *et al.*, 2015). Neste sentido, as bactérias tem papel crucial, por conseguirem degradar essa molécula por mais de uma via metabólica (BORGGAARD; GIMSING, 2008; HADI *et al.*, 2013; KACZYNSKI *et al.*, 2020; OBOJSKA *et al.*, 1999).

Além do glyphosate estar sendo encontrado em solos agrícolas e de produção florestal, também há ocorrência de AMPA, indicando a biodegradação da molécula nesses ambientes (VEIGA *et al.*, 2001; MORAES;

ROSSI, 2010; SILVA *et al.*, 2018). Alguns dos microrganismos de solo que degradam glyphosate pela ação da GOX são *Arthrobacter atrocyaneus* (PIPKE; AMRHEIN, 1998) e *Pseudomonas* sp. (JACOB *et al.*, 1988), e dentre os que o fazem pela ação da C-P liase são *Pseudomonas* sp. (SHINABARGER *et al.*, 1986), *Rhizobium* spp. (LIU *et al.*, 1991), e *Streptomyces* sp. (KAFARSKI *et al.*, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo da cultura bacteriana

O isolado de *R. solanacearum* foi obtido da coleção de microrganismos fitopatogênicos mantida na FCAT - UNESP/Campus de Dracena/Brasil. O isolado foi identificado por meio do sequenciamento da região 16S RNA ribossomal (FEGAN *et al.* 1998; FEGAN; PRIOR 2005).

O isolado, foi reativado e cultivado em placas de Petri em meio ágar Kelman TZC (KELMAN, 1954). Dois dias após seu cultivo, as placas foram utilizadas para a obtenção de suspensão bacteriana de *R. solanacearum* (10^7 UFC ml⁻¹ / OD 540 nm = 1.15). Para a multiplicação do inóculo e uso no experimento, o volume de 1 mL da suspensão bacteriana foi acrescentado em meio Kelman líquido. Este meio foi incubado a 28 °C ± 1, sob agitação constante (65 RPM), em fotoperíodo alternado de 12 horas, durante 24 horas. Passado este período, o meio líquido com bactéria foi diluído de forma que se obtivesse uma solução bacteriana de suspensão 10^7 UFC mL⁻¹ de *R. solanacearum* (OD 540 nm = 1,15) em 0,85% de NaCl (Figura 2).

Figura 2 – Solução bacteriana de *R. solanacearum* em meio líquido.



Fonte: próprio autor.

3.2 Preparo das diluições de glyphosate

O preparo da diluição do glyphosate (GLY) foi realizado com base no produto comercial (p.c.) Roundup® (WG). O cálculo de suspensão foi baseado na dose proposta pelo fabricante, proporcionalmente ao volume de solo usado nos experimentos, sendo vasos de 3 L, com as dimensões de 17,5 cm de diâmetro e 55 cm de comprimento na parte superior; e 14,5 cm de diâmetro e 48,5 cm de comprimento na base.

Foram preparadas cinco doses de GLY utilizando a dose de campo recomendada como referência (tabela 1). A primeira foi a dose recomendada de 0,36 mg de equivalente ácido L⁻¹ (sal de amônio de glifosato); e as doses seguintes seguiram-se dobrando as quantidades, até 16 vezes (0,72 mg e.a. L⁻¹, 1,44 mg e.a. L⁻¹, 2,88 mg e.a. L⁻¹ e 5,76 mg e.a. L⁻¹, respectivamente). A escolha das sobredoses em quantidades mais elevadas se deu devido à alta sorção do glyphosate na fração coloidal dos solos, buscando-se assim maior propensão do produto na solução do solo.

Para a obtenção correta das concentrações, primeiro foi preparada a maior dose e, posteriormente, foi utilizada a metodologia de diluição seriada.

Tabela 1 – Doses de campo de RoundUp WG e respectivas concentrações do equivalente ácido sal de amônio de glifosato.

Dose de campo (kg ha ⁻¹)	Concentração de equivalente ácido (mg L ⁻¹)
1 (dose recomendada)	0,36
2	0,72
4	1,44
8	2,88
16	5,76

Fonte: próprio autor.

3.3 Experimento em casa de vegetação

O experimento foi instalado durante o mês de novembro de 2020, na cidade de Dracena, Região Oeste do Estado de São Paulo no Brasil. Foram selecionadas mudas do clone H13 de *Eucalyptus*, sendo este um híbrido entre as espécies *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, com cerca de 4 meses de idade, que foram plantadas em vasos de 3 litros e mantidas sob o mesmo regime de irrigação por aspersão.

O substrato utilizado para o plantio das mudas consistiu em mistura de solo orgânico (Minho Fértil®) e substrato vegetal (Vivatto Slim Plus®), em proporção de 2:1, respectivamente. As características físico-químicas do substrato preparado utilizado se estabeleceram como segue: pH 6,0, 21% de matéria orgânica, 0,57% de nitrogênio, 0,92% de fósforo, 0,39% de potássio e 1,36% de cálcio. Todo o substrato foi esterilizado com o auxílio da autoclave antes da montagem do experimento.

Dois dias após o plantio das mudas, foi realizada a inoculação de 25 mL da suspensão bacteriana de *R. solanacearum* em cada vaso pelo método de encharcamento do solo com despejo manual, próximo da base das plantas (Figura 3). Seguiu-se então à aplicação do GLY, três dias após a introdução do patógeno. A aplicação de 50 mL da calda do agrotóxico foi realizada diretamente no solo próximo à base das plantas, despejando-se o volume manualmente.

Figura 3 – Soluções bacterianas de *R. solanacearum* para a inoculação das parcelas experimentais.



Fonte: próprio autor.

Para a instalação do experimento foram determinados sete tratamentos: somente solo esterilizado; solo esterilizado com adição da suspensão de *R. solanacearum*; solo esterilizado com adição da suspensão de *R. solanacearum* juntamente com a dose GLY recomendada pelo fabricante; e para os tratamentos seguintes as doses foram sendo dobradas até alcançar a dose de 16 vezes, já citadas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento, totalizando 70 parcelas experimentais. Os vasos foram irrigados por aspersão durante todos os dias a cada quatro horas.

3.3.1 Avaliações dos dados do experimento em casa de vegetação

3.3.1.1 Quantificação de população bacteriana

Para as avaliações das populações de *R. solanacearum* no experimento em casa de vegetação, foram coletadas amostras de solo a 3 cm das raízes de todas as parcelas a cada sete dias, no que se seguiram 7, 14, 21 e 28 dias (Figura 4). Utilizou-se 5 g de cada amostra de solo, que foram acrescentadas a 45 mL de água destilada esterilizada em tubos de ensaio. Para a

homogeneidade da solução, as misturas obtidas foram mantidas em aparelho agitador por 30 minutos (Figura 5). Posteriormente, o processo de diluição seriada foi utilizado para a obtenção da suspensão bacteriana final de 10^{-4} .

Figura 4 – Coleta de amostras de solo em plantio de eucalipto das parcelas experimentais inoculados com *R. solanacearum*, sob aplicação de glyphosate.



Fonte: próprio autor.

Figura 5 – Homogeneização das amostras de solo em água destilada esterilizada com o auxílio de aparelho agitador.



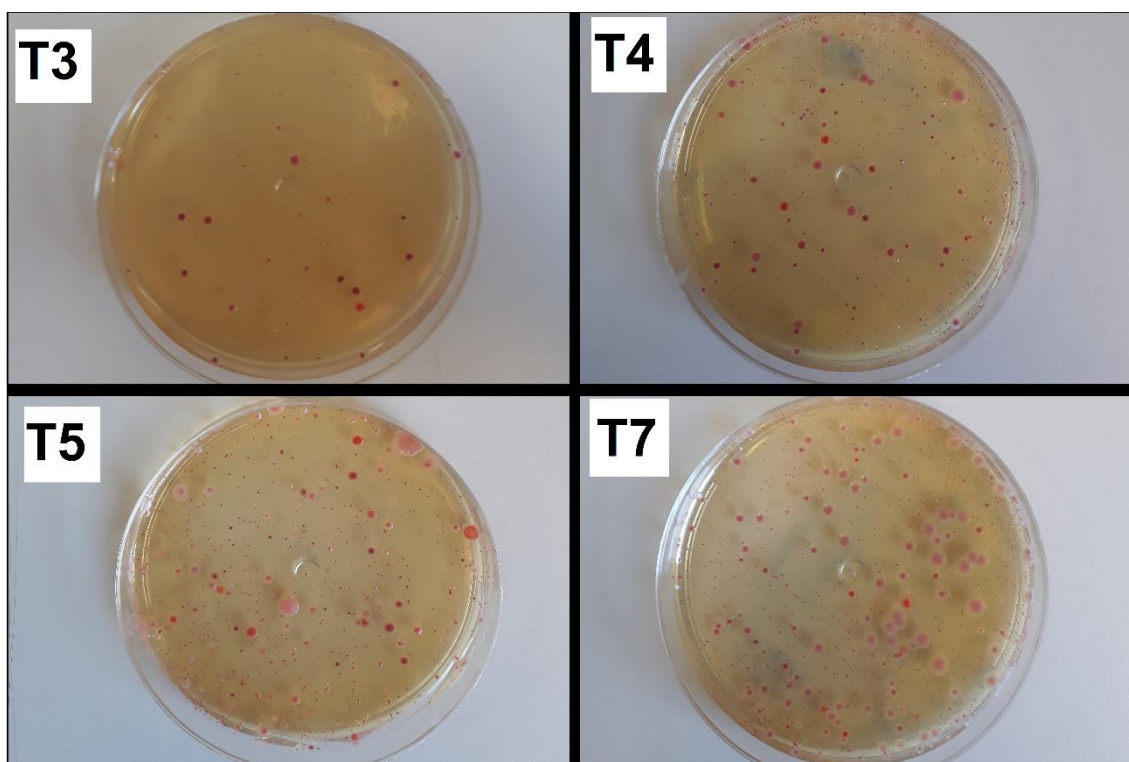
Fonte: próprio autor.

Foi adicionado 1 mL da diluição bacteriana final em placa de Petri contendo 20 mL de meio Kelman com cloreto de tetrazólio, sendo o mesmo

comumente utilizado para o isolamento de *R. solanacearum* devido à sua capacidade de identificar colônias virulentas por meio da pigmentação (KELMAN, 1954). Foram feitas 2 replicatas para cada respectiva parcela experimental. As placas foram cultivadas a 28 °C por 48 horas em câmara escura para o desenvolvimento das colônias (Figura 6).

A contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das amostras de todas as parcelas foi realizada obtendo-se as médias das respectivas replicatas. Para tanto, foram consideradas as colônias disformes, de aparência umedecida, contornos brancos largos e coloração central rosada, pois são características indicadoras de cepas virulentas de *R. solanacearum* (KELMAN, 1954; LIU *et al.*, 2004).

Figura 6 – Colônias de *Ralstonia solanacearum* em placas de Petri. Isolados obtidos por meio das amostras de solo de seus respectivos tratamentos.



Nota: Tratamento 3: solo esterilizado + *R. solanacearum* + glyphosate (0,36 mg e.a. L⁻¹); Tratamento 4: solo esterilizado + *R. solanacearum* + glyphosate (0,72 mg e.a. L⁻¹); Tratamento 5: solo esterilizado + *R. solanacearum* + glyphosate (1,44 mg e.a. L⁻¹) e; Tratamento 7: solo esterilizado + *R. solanacearum* + glyphosate (5,76 mg e.a. L⁻¹).

Fonte: próprio autor.

3.3.1.2 Análises enzimáticas e do teor de proteínas das mudas de eucalipto

Para a verificação da reação da planta aos tratamentos, foram realizadas análises do teor de proteínas, além de análises das enzimas peroxidase (POD - EC 1.11.1.7) e fenilalanina amônia-liase (FAL - EC 4.3.1.24), responsáveis pela resposta da planta a ataque de patógenos. Para isso, foram coletadas amostras de folhas apicais de cada planta de cada tratamento a cada sete dias, como realizado com o solo.

As amostras foram utilizadas para obtenção do extrato proteico e aferição do teor de proteínas conforme metodologia descrita por Bradford (1976). A determinação da atividade da peroxidase foi realizada conforme metodologia descrita por Luso e Pascholati (1999). Para a determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL), utilizou-se a metodologia descrita por Umesha (2006).

3.3.1.3 Análises morfofisiológicas das mudas de eucalipto

Para analisar a ação da *R. solanacearum* em conjunto com as doses de GLY nas mudas de eucalipto, ao final dos 28 dias do experimento em casa de vegetação, foi obtido o índice SPAD (soil-plant analysis development) de todas as parcelas experimentais, por meio das medições da base, terço médio e ápice das plantas de eucalipto. Por fim foram coletados os dados relativos à altura e, para o cálculo da biomassa, foram coletados os dados de massa fresca da parte aérea de todas as plantas, objetivando a obtenção das médias de cada tratamento.

3.4 Experimento de respiração do solo tratado com glyphosate e inoculados com *R. solanacearum*

O experimento foi realizado em laboratório utilizando-se o método respirométrico de Bartha com modificações (BARTHA; PRAMER, 1965; CETESB, 1999). Para tanto, foram preparados 1,6 kg de substrato esterilizado, utilizando a mesma metodologia do preparo dos vasos. O método de

respirometria utilizado se baseia em utilizar uma solução alcalina, de concentração conhecida, para a captura do CO_2 gerado pela atividade microbiana, possibilitando assim a realização de análises indiretas de condutividade elétrica com o auxílio de um condutímetro. As medições foram realizadas periodicamente para que assim fosse possível, ao longo do tempo, avaliar a cinética do carbono presente na solução (CARMONA, 2016).

Para a realização do experimento foram utilizados recipientes higienizados e aptos aos ensaios respirométricos (Figura 7). Em cada recipiente foi adicionado um pequeno frasco contendo 10 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,2 M, livre de CO_2 . Nos tratamentos onde deveria haver substrato, foi adicionado, separadamente, 50 g do substrato preparado com seu respectivo tratamento. Para a instalação do experimento foram determinados oito tratamentos, sendo os mesmos sete tratamentos do experimento em campo e a adição do tratamento branco, contendo apenas KOH 0,2 M, sem solo.

Os respirômetros foram mantidos a 28 °C em câmara escura. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, contendo 4 repetições para cada tratamento, totalizando 32 parcelas experimentais.

Figura 7 – Recipiente utilizado como respirômetro para os tratamentos do experimento de respiração de solo.



Fonte: próprio autor.

Dois dias após o preparo do ensaio, iniciaram-se as análises. O CO₂ foi quantificado por leituras de condutividade elétrica da solução de KOH residual, adicionando 20 mL de água destilada isenta de CO₂ e 1 mL de cloreto de bário (BaCl₂) 0,1 M. Após a homogeneização as medições foram feitas com o auxílio de um condutímetro, sendo que após cada medição, o aparelho foi lavado com água destilada isenta de CO₂. Posteriormente, os frascos também eram lavados e reabastecidos com solução KOH 0,2 M, sendo realocados em seus devidos respirômetros.

As análises se seguiram em diferentes intervalos, de acordo com a estabilidade dos dados, totalizando 50 dias de análises. As leituras foram expressas como $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

3.5 Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk e o teste de homocedasticidade de Bartlett foram realizados conscientemente para verificar a normalidade do conjunto de dados e a homogeneidade de variância, respectivamente.

Para analisar a variabilidade espaço-temporal na bioquímica e no metabolismo do hospedeiro, bem como na propagação bacteriana na placa, a metodologia de superfície resposta foi realizada para as variáveis: teor de proteínas, atividade enzimática específica da peroxidase, atividade enzimática da fenilalanina amônia-liase e unidades formadoras de colônias; os tratamentos foram codificados como 1 (solo), 2 (solo + *R. solanacearum*), 3 (solo + *R. solanacearum* + 1 × glyphosate), 4 (solo + *R. solanacearum* + 2 × glyphosate), 5 (solo + *R. solanacearum* + 4 × glyphosate), 6 (solo + *R. solanacearum* + 8 × glyphosate) e, finalmente, 7 (solo + *R. solanacearum* + 16 × glyphosate), e a plotagem foi projetada como um wireframe elegantemente multicromático para melhor visualização gráfica.

Para analisar o efeito do glyphosate isoladamente aos 7 dias, utilizou-se análise de variância (ANAVA) e aplicou-se o teste F a 5% de probabilidade (p-valor < 0,05%), por meio do software SISVAR (FERREIRA, 2011). Para a comparação de médias foi utilizado o teste t (LSD - *Least Significant Difference*) a 5% de probabilidade (p-valor < 0,05%).

Para avaliar o efeito do herbicida nas características morfofisiológicas das plantas foi realizada análise de variância (ANAVA) e aplicou-se o teste F a 5% de probabilidade (p-valor < 0,05). Para a comparação de médias foi utilizado o teste Tukey a 5% de probabilidade (p-valor < 0,05). Os dados de bioensaios de respirometria foram analisados com a mesma metodologia, onde ambos foram realizados pelo software SISVAR (FERREIRA, 2011).

Para estabelecer relações funcionais entre variáveis analíticas e, assim, compreender a relação de alta complexidade solo-bactéria-planta-agrotóxico da melhor forma possível, o teste de produto-momento de Pearson e a análise de componentes principais (PCA – *Principal Component Analysis*) foram aplicados como algoritmos exploratórios para o indivíduo, ainda que confirmatório complementar experimentos. A capacidade do PCA de dividir o conjunto de dados original de alta dimensionalidade em acetos latentes ortogonais interpretáveis e atribuíveis foi testada pela abordagem de Kaiser-Meyer-Olkin, e apenas os acetos com valor próprio igual ou superior à unidade foram considerados para deduzir como o glyphosate residual poderia criar o microambiente condições para um aumento da população fitopatogênica, promovendo assim maiores danos por *R. solanacearum* em *Eucalyptus* como organismo-teste intuitivo.

As linhas de codificação para análise de dados foram programadas e utilizadas no ambiente do R-project, que é uma linguagem de programação de código aberto para computação estatística e gráficos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises do experimento em casa de vegetação

4.1.1 Análise de Unidade Formadora de Colônia em solo

De acordo com o modelo adequado de superfície de resposta para UFC, o fator doses de GLY foi capaz de explicar 65% ($R_{adj}^2 = 0,65$) das variações (Tabela 2). Considerando que neste experimento os fatores que podem exercer

influência são diversos como planta, doses e patógeno, o valor encontrado para R_{adj}^2 é satisfatório.

Ainda para esta análise, o fator tempo apresentou diferença estatística significativa ($< 2,20 \times e^{-16}$; p-valor $< 0,01$) (Tabela 2), sendo possível notar no gráfico o aumento de UFC com o desenvolvimento do estudo ao longo dos dias (Figura 8).

Os valores de estimativa indicam a tendência do comportamento do modelo de superfície de resposta utilizado, sendo que para o fator tempo, onde houve diferença significativa, a estimativa é positiva (1,70), indicando assim a tendência do aumento dos valores de UFC ao longo do tempo. Não obstante, o valor de estimativa para o fator doses também é positivo ($4,45 \times e^{-3}$), entretanto, ainda é possível notar que nas maiores doses há diminuição de UFC. A possível causa para a diminuição de UFC nas amostras de solo com maiores doses de GLY, é o potencial de toxicidade devido à alta quantidade da molécula presente.

De maneira semelhante, em pesquisas realizadas na cultura da soja, foi possível observar que houve aumento de UFC em tecido de soja plantada por meio de preparo convencional, enquanto que em plantio direto, sob duas aplicações de glyphosate a $0,84 \text{ kg i.a. ha}^{-1}$, os valores de UFC de bactérias presentes no solo foram menores (MENGISTU *et al.*, 2009).

Tabela 2 – Parametrização e adequação do modelo de superfície de resposta para quantificação da população de *R. solanacearum* em solo contendo plantas de eucalipto sob efeito de glyphosate ao longo de 28 dias.

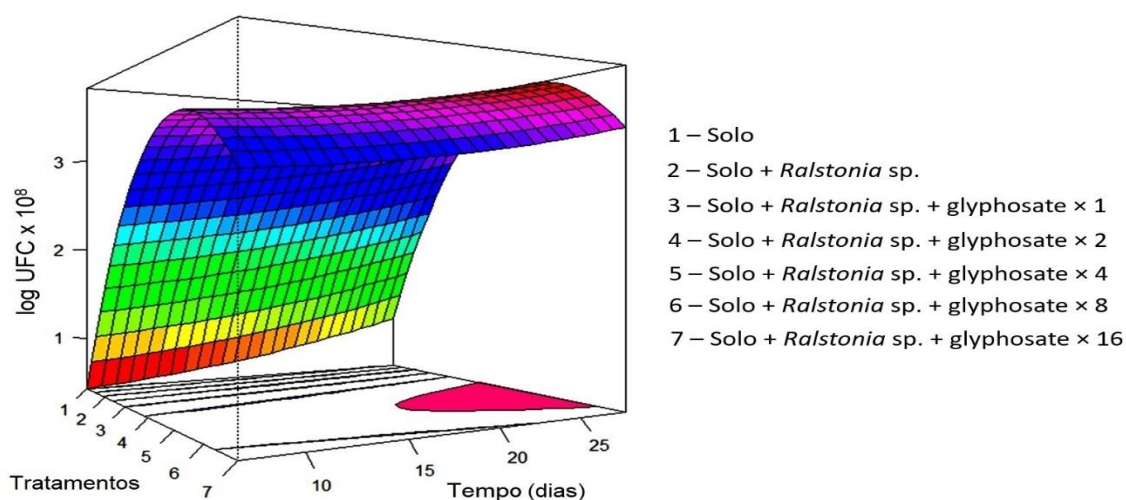
Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	t-valor	p > t	R _{adj} ²
	log UFC, x 10⁸				0,65
β₀, intercepto	-1.15	0.35	-3.40	$7.60 \times e^{-4}$ **	
β_x, Tempo	1.70	0.10	15.45	$< 2.20 \times e^{-16}$ **	
β_y, Tratamento	$4.45 \times e^{-3}$	$3.25 \times e^{-2}$	0.10	0.90	
β_x β_y	$-6.40 \times e^{-4}$	$2.70 \times e^{-3}$	-0.25	0.80	
β_x²	-0.15	$1.20 \times e^{-2}$	-13.65	$< 2.20 \times e^{-16}$ **	
β_y²	$7.40 \times e^{-4}$	$8.60 \times e^{-4}$	0.85	0.40	

Nota: Código de significância: ** p < 0.01; * p < 0.05.

Fonte: próprio autor.

A toxicidade do agrotóxico também é relatada em bactérias não fitopatogênicas, como ocorre com *Pseudomonas* sp., que está associada ao sistema radicular de plantas, onde estudos realizados para avaliar o efeito do glyphosate na sobrevivência dessas bactérias mostraram que doses de glyphosate de 100 e 360 mg mL⁻¹ inibiram o desenvolvimento da *Pseudomonas* sp. em meio de cultura, apresentando menores valores de UFC (PRZEMIENIECKI *et al.*, 2018).

Figura 8 – Quantificação da população de *R. solanacearum* em Unidade Formadora de Colônia (UFC) nas amostras de solo sob doses de glyphosate ao decorrer de 28 dias.



Fonte: próprio autor.

Em estudos prévios, foi observado que a aplicação da dose de 0,84 kg e.a. ha⁻¹ do produto Roundup Ultra, para a cultura da soja transgênica resistente à GLY, ocasionou a liberação de exsudatos pela planta, que promoveram o aumento da atividade microbiana na rizosfera, inclusive estimulando a população do patógeno *Fusarium* spp. infectando as raízes da planta (KREMER *et al.*, 2005).

De maneira contrária, análises realizadas por Busse *et al.* (2000), mostram que doses de GLY, aplicadas diretamente em amostras de solo de plantios de *Pinus ponderosa* Douglas ex C.Lawson, não apresentaram alterações significativas no tamanho e atividade microbiana. De acordo com os autores, a toxicidade do GLY não afetou os microrganismos devido à forte sorção do produto à fração coloidal. Não obstante, os autores ainda

observaram que utilizando-se sobredoses na faixa de concentração de 100x a dose do produto, houve aumento da atividade dos microrganismos.

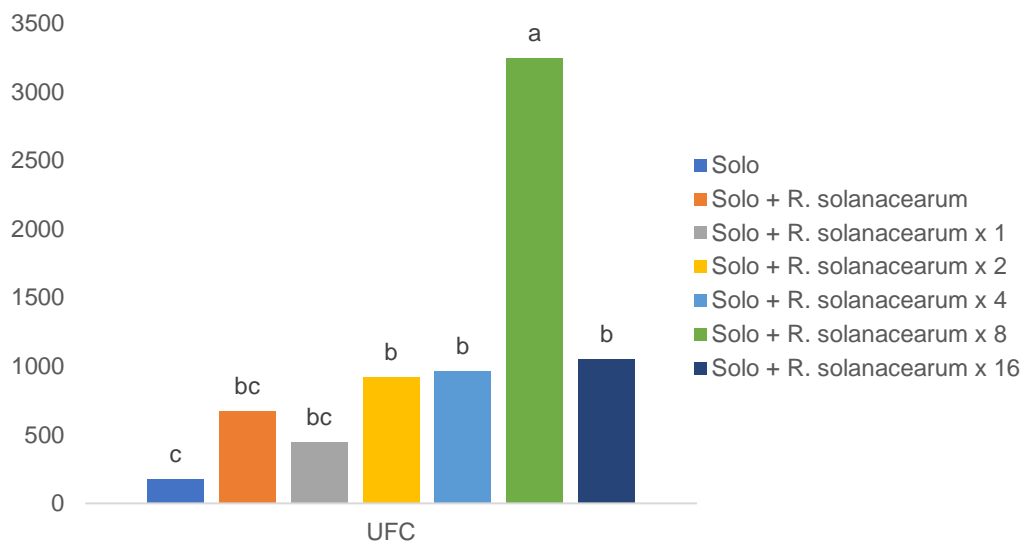
Vale a pena ressaltar que, de maneira distinta, no presente trabalho, o solo foi previamente esterilizado, garantindo a presença inicial somente da bactéria *R. solanacearum*, sem a interferência de possível microbiota distinta. Este fator foi de suma importância para avaliar a reação da bactéria unicamente à presença do GLY e das plantas de eucalipto.

A aplicação da dose de 16x no solo, sem a ação de outros microrganismos, interferiu negativamente no desenvolvimento de *R. solanacearum*, pois a alta concentração da molécula passou a apresentar toxicidade para a população da bactéria isoladamente em seu ecossistema.

Para avaliar o efeito das doses de GLY nas plantas sem a interferência do tempo, foram realizadas análises de variância considerando-se os apenas os dados obtidos aos 7 dias após a aplicação. O período de 7 dias foi escolhido, pois foi o momento da primeira coleta de dados, além de representar um período adequado tanto para o desenvolvimento da *R. solanacearum* antes do possível reestabelecimento da microbiota do solo, quanto para a sorção do GLY no solo.

Analisando os tratamentos aos 7 dias, foi possível notar a maior quantidade de UFC nas amostras de solo relativas à dose de 8x (2,88 mg e.a. L⁻¹), de acordo com o teste t (p-valor < 0,05), corroborando com os resultados discutidos até então. Apesar da presença do GLY mostrar influência nas colônias da bactéria no solo, apenas o tratamento com a dose de 8x apresentou diferença estatística significativa, reafirmando a dosagem como favorável ao desenvolvimento da *R. solanacearum* no solo (figura 9).

Figura 9 – Quantificação da população de *R. solanacearum* em UFC nas amostras de solo sob presença de glyphosate após 7 dias.



Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade (p -valor < 0,05).

Fonte: próprio autor.

Os tratamentos sem adição de GLY e o tratamento com a dose recomendada ($0,36 \text{ mg e.a. L}^{-1}$) apresentaram menores valores de UFC. Também foi possível notar que o aumento das doses passou a ocasionar aumento de UFC no solo. Não obstante, a dose de 16x ($5,76 \text{ mg e.a. L}^{-1}$) apresentou grande queda em UFC, indicando que essa alta concentração de GLY pode ter passado a apresentar toxicidade às bactérias no solo.

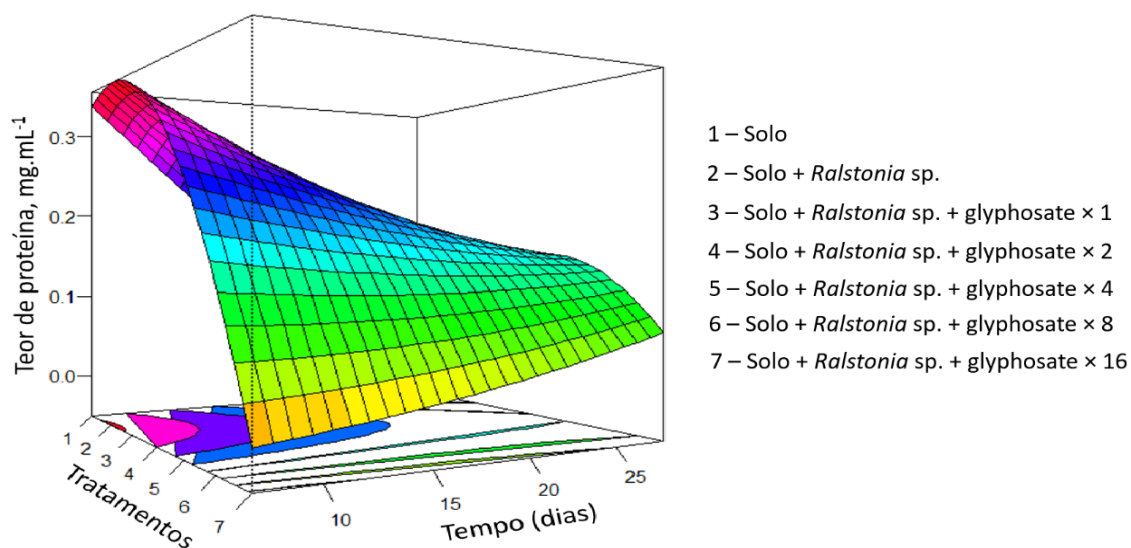
4.1.2 Análises proteica e enzimáticas das plantas de eucalipto

O modelo de superfície de resposta utilizado para a análise do teor de proteínas (Figura 10) mostra que apenas 20% ($R_{adj}^2 = 0,20$) das variações são devido ao fator doses e, apesar de não haver significância para os resultados obtidos, é importante notar que o valor de estimativa para tempo é positivo ($3,80 \times e^{-2}$), indicando a tendência do comportamento do gráfico em aumentar com o passar do tempo. Por outro lado, o valor de estimativa para as doses foi negativo ($-2,50 \times e^{-2}$), indicando a tendência do comportamento do gráfico em diminuir com o aumento das doses de GLY (Tabela 3).

De acordo com o gráfico, é possível notar que nos tratamentos sem aplicação de GLY houveram maiores valores para teor de proteínas, enquanto que, de fato, o teor de proteínas das plantas diminui com o aumento das doses. Este comportamento é esperado, devido ao mecanismo de ação do GLY, inibindo a EPSPs. Sendo assim, maiores doses possuem maior potencial de dano nas plantas de eucalipto, causando estresse nas plantas, interrompendo a produção de aminoácidos e, conseqüentemente, a produção de proteínas (KRUSE *et al.*, 2000).

O gráfico ainda nos permite observar que ocorre aumento gradativo do teor de proteínas nas plantas ao longo dos 28 dias de experimento nos tratamentos com maiores doses de GLY, que pode ter ocorrido devido à possível sorção da molécula de GLY nos colóides do solo após este período, diminuindo sua disponibilidade para as plantas ao longo do tempo (MAMMY; BARRIUSO, 2005). Outra possibilidade é a metabolização das moléculas de GLY pela população bacteriana presente, sendo que o aumento da população, pode também indicar uma maior capacidade de biodegradação da molécula.

Figura 10 – Quantificação do teor de proteínas de plantas de eucalipto com murcha bacteriana de *R. solanacearum* sob doses de glyphosate ao decorrer de 28 dias.



Fonte: próprio autor.

Tabela 3 – Parametrização e adequação do modelo de superfície de resposta para o teor de proteínas de plantas de eucalipto com murcha bacteriana de *R. solanacearum* sob efeito de glyphosate ao longo de 28 dias.

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	t-valor	p > t	r_{adj}^2
	Proteína, mg mL⁻¹				0.20
β_0 , intercepto	$4.50 \times e^{-1}$	$3.50 \times e^{-1}$	1.30	0.20	
β_x , Tempo	$3.80 \times e^{-2}$	$1.10 \times e^{-1}$	0.35	0.70	
β_y , Tratamento	$-2.50 \times e^{-2}$	$3.30 \times e^{-2}$	-0.75	0.45	
$\beta_x \beta_y$	$3.70 \times e^{-3}$	$2.75 \times e^{-3}$	1.35	0.20	
β_x^2	$-1.50 \times e^{-2}$	$1.20 \times e^{-2}$	-1.20	0.25	
β_y^2	$8.10 \times e^{-5}$	$8.75 \times e^{-4}$	0.10	0.90	

Nota: Código de significância: ** p < 0.01; * p < 0.05.

Fonte: próprio autor.

Analisando o efeito das doses de GLY no teor de proteínas das plantas aos 7 dias pelo teste t (p-valor < 0,05), foi possível notar que não houve diferença estatística significativa entre as doses utilizadas (tabela 4).

Tabela 4 – Teor de proteínas de plantas de eucalipto com murcha bacteriana de *R. solanacearum* sob efeito de doses de glyphosate após 7 dias.

Tratamento	Teor de proteínas (mg mL ⁻¹)	Desvio Padrão
Solo	0,3323 a	0,09304
Solo + <i>R. solanacearum</i>	0,294933 a	0,133
Solo + <i>R. solanacearum</i> x 1	0,093683 a	0,05482
Solo + <i>R. solanacearum</i> x 2	0,311233 a	0,59072
Solo + <i>R. solanacearum</i> x 4	0,06845 a	0,05847
Solo + <i>R. solanacearum</i> x 8	0,076067 a	0,06086
Solo + <i>R. solanacearum</i> x 16	0,12495 a	0,09128

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade (p-valor < 0,05).

Fonte: próprio autor.

O gráfico representado pelo modelo de superfície de resposta utilizado para a atividade da peroxidase (POD) (Figura 11), possui 30% das variações associadas ao fator dose ($R_{adj}^2 = 0,30$), sendo que, para essa variável, o fator doses apresentou diferença significativa (0,06; p-valor < 0,05). Os valores de estimativa para os fatores tempo e doses foram ambos positivos ($3,20 \times e^{-2}$,

1,50 x e⁻², respectivamente), indicando a tendência de aumento no modelo de curva ajustado no gráfico para ambos (Tabela 5).

As plantas são capazes de expressar resistência a doenças e ao ataque de patógenos por meio de diversos mecanismos de defesa, podendo diminuir a infecção ou até mesmo impedir o desenvolvimento da doença, dependendo do estágio da relação patógeno-hospedeiro. Dentre os mecanismos conhecidos, estão as barreiras físicas, além das barreiras químicas, que por sua vez podem ser induzidas pela presença do patógeno na planta. Algumas enzimas como a peroxidase (POD) e a fenilalanina amônia-liase (FAL), são exemplos de defesa química das plantas ao ataque de patógenos (EL-ARGAWY; ADSS, 2016; KONAPPA *et al.*, 2016).

É possível notar o aumento da atividade da POD com o aumento das doses de GLY e o aumento da atividade da POD até os 21 dias, apresentando diminuição em sua atividade após esse período. Apesar da atividade da POD ter aumentado com o aumento das doses de GLY, acredita-se que esta variável também se relaciona diretamente à contaminação pelo patógeno, pois a enzima está associada à patogênese e possui importante função na resistência de plantas por agir na síntese de lignina a fim de fornecer proteção aos tecidos por meio da lignificação de parede celular, servindo como barreira física para os patógenos (PASCHOLATI; LEITE, 1995; BOAVA *et al.*, 2010a; BOAVA *et al.*, 2010b).

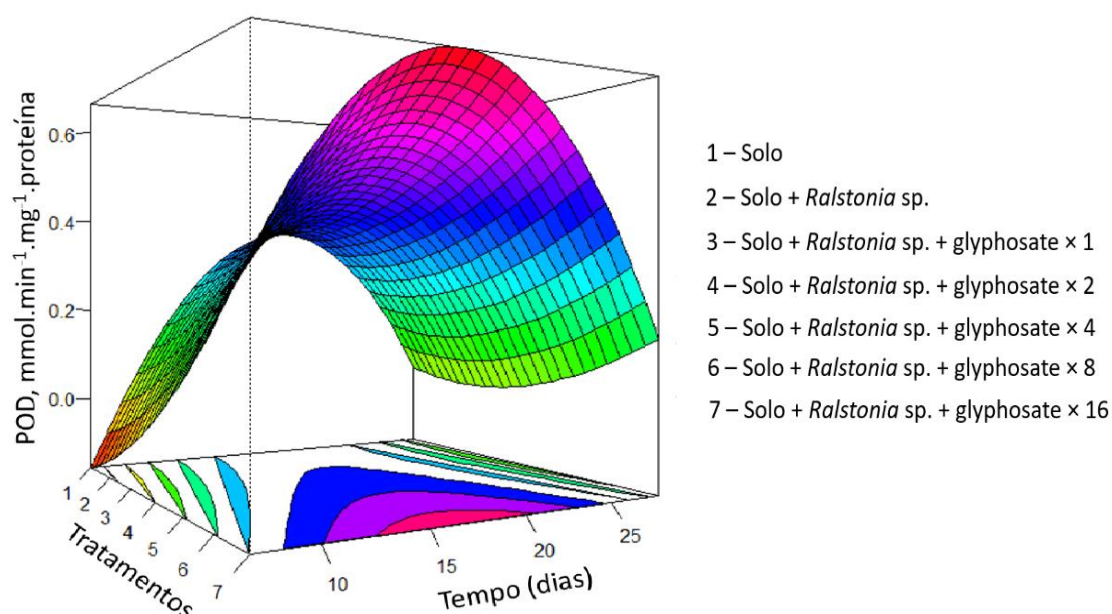
Ainda vale ressaltar que a atividade da peroxidase pode colaborar na defesa da planta mesmo na presença do GLY, pois esta enzima também atua eliminando átomos de hidrogênio de grupos álcoois hidroxicinâmicos, responsáveis pela formação de lignina, e que quando age juntamente a outros polissacarídeos, como a celulose, serve como mecanismo de defesa, dificultando a penetração de patógenos por meio de barreira física (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005; LORENZETTI *et al.*, 2018).

Resultados encontrados por Marković *et al.* (2021), apresentaram correlação entre a severidade da murcha bacteriana e a atividade da POD em plantas de batata, sendo que as plantas apresentaram maior atividade da enzima em tubérculos com sintomas de necrose vascular.

Nota-se que a atividade da POD no tratamento 1 sem a presença de GLY e *R. solanacearum* é ínfima, entretanto, com a presença do patógeno, os

valores de POD começam a aumentar e, nos tratamentos com maiores doses de GLY, o aumento é ainda maior. O aumento das doses de GLY causando aumento da atividade de POD estabelece uma possível relação com a população da bactéria no solo, visto que, quanto maior a população do patógeno, maior o risco de contaminação das plantas, induzindo seus mecanismos de resistência.

Figura 11 – Atividade da POD de plantas de eucalipto com murcha bacteriana de *R. solanacearum* sob doses de glyphosate ao decorrer de 28 dias.



Fonte: próprio autor.

Tabela 5 – Parametrização e adequação do modelo de superfície de resposta para a atividade da POD de plantas de eucalipto com murcha bacteriana de *R. solanacearum* sob efeito de glyphosate.

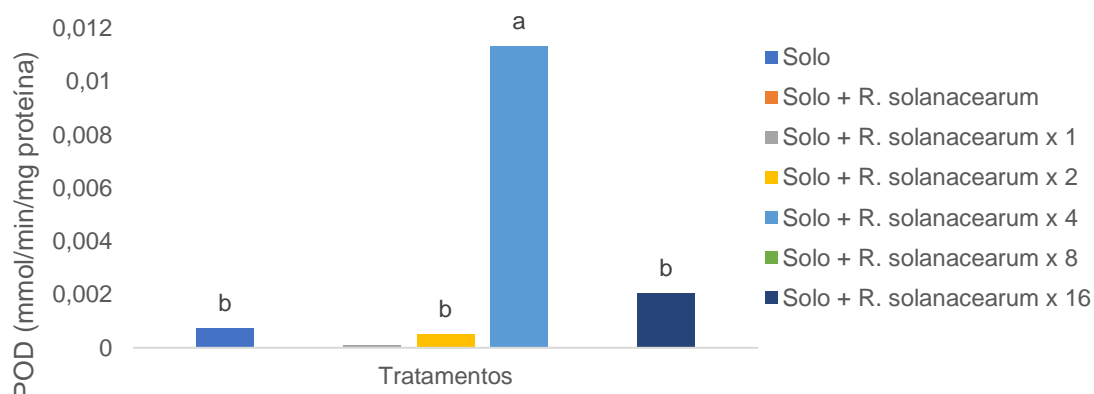
Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	t-valor	p > t	r_{adj}^2
POD, mmol min⁻¹ protein⁻¹					0.30
β_0, intercepto	$-0.10 \times e^{-1}$	$5.90 \times e^{-1}$	-1.75	0.10	
β_x, Tempo	$3.20 \times e^{-2}$	$1.90 \times e^{-1}$	0.15	0.85	
β_y, Tratamento	$1.50 \times e^{-1}$	$5.55 \times e^{-2}$	2.70	0.06 *	
$\beta_x \beta_y$	$2.75 \times e^{-3}$	$4.60 \times e^{-3}$	-0.60	0.55	
β_x^2	$8.00 \times e^{-3}$	$2.10 \times e^{-2}$	0.40	0.70	
β_y^2	$-3.90 \times e^{-3}$	$1.45 \times e^{-3}$	-2.65	0.05 *	

Nota: código de significância: ** p < 0.01; * p < 0.05.
 Fonte: próprio autor.

O estresse causado pelo agrotóxico nas plantas também pode induzir a produção de POD e, sendo assim, se estabelece a hipótese de que a queda brusca da atividade da POD após os 21 dias, pode estar relacionada a dois fatores: menos disponibilidade do herbicida no solo e também a redução do herbicida na planta devido à metabolização, compartimentalização e exsudação.

A análise relativa ao efeito das doses de GLY, após 7 dias, na atividade da POD das plantas de eucalipto mostrou que apenas o tratamento de 4x a dose ($1,44 \text{ mg e.a. L}^{-1}$) apresentou diferença estatística significativa, se destacando dos demais de acordo com o teste t ($p\text{-valor} < 0,05$) (figura 12).

Figura 12 – Atividade da peroxidase em plantas de eucalipto com murcha bacteriana de *R. solanacearum* sob doses de glyphosate após 7 dias.



Nota: médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade ($p\text{-valor} < 0,05$).

Fonte: próprio autor.

Com relação ao modelo de superfície de resposta utilizado para a análise da atividade da FAL (Figura 13), 55% das variações são relacionados ao fator doses ($R_{adj}^2 = 0,55$), sendo que para essa variável, o fator tempo apresentou diferença significativa ($1,35 \times e^{-3}$, $p\text{-valor} < 0,01$). O valor de estimativa para tempo foi positivo ($6,20 \times e^{-1}$), indicando tendência de aumento no comportamento do gráfico e, para o fator doses, o valor de estimativa foi negativo ($-9,95 \times e^{-2}$), indicando tendência de diminuição no comportamento do gráfico com o aumento das doses (Tabela 6).

O efeito do tempo na atividade da FAL é similar à POD, possuindo tendência de aumento com o passar do tempo até os 21 dias, apresentando queda brusca de atividade após este período. Com relação ao fator doses, apesar dos resultados não serem significativos estatisticamente, o comportamento do gráfico é interessante, pois indica diminuição da atividade da FAL com o aumento das doses, podendo chegar a valores próximos de 0 sob doses mais altas de GLY.

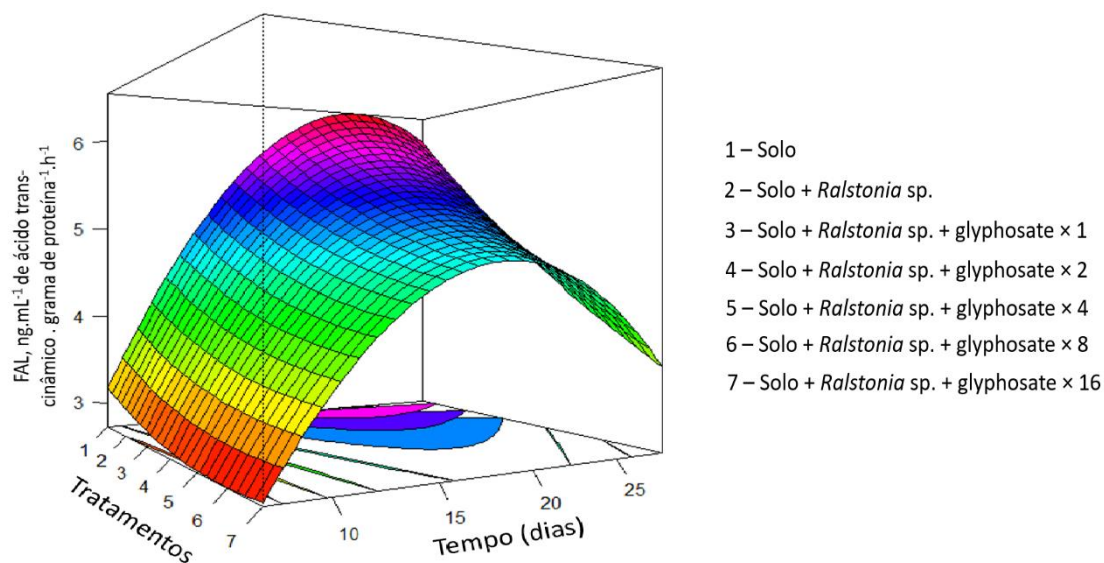
A diminuição da atividade da FAL ocorre, pois o mecanismo de ação do GLY, ao inibir a EPSPs e a formação de aminoácidos enzimáticos, dentre eles também inibe a síntese de fenilalanina, prejudicando assim a ação da enzima FAL, responsável pela síntese de compostos importantes para a resistência de plantas (NAKAZAWA *et al.*, 2001; AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002; VALENTE, 2012).

A FAL é uma enzima de suma importância para a resistência de plantas, visto que ela é fundamental para o metabolismo de fenilpropanoides, além de ser fundamental para a biossíntese de compostos fenólicos e fitoalexinas (MARIUTTO *et al.*, 2011). A enzima também está envolvida nos processos de lignificação celular e na transformação de fenóis em quinonas tóxicas aos microrganismos (STANGARLIN *et al.* 2011; LORENZETTI *et al.* 2018).

Em pesquisas realizadas por Li *et al.* (2021), onde foi avaliado o potencial de raízes de plantas de tabaco sob influência de ácido cafeico, de liberarem exsudatos capazes de controlar *R. solanacearum*, os resultados mostraram que o efeito do ácido cafeico induziu a resistência das plantas, aumentando a atividade da FAL e da POD, tornando as raízes mais resistentes à infecção pelo patógeno.

Com relação às análises proteicas e enzimáticas, a queda da quantidade de proteínas e da atividade da FAL com o aumento da dose de GLY se justifica devido ao mecanismo de ação do GLY, pois o mesmo é capaz de inibir a ação da EPSPs, fazendo com que diversas rotas metabólicas da planta sejam descontinuadas, inclusive as que originam o aminoácido fenilalanina e proteínas.

Figura 13 – Atividade da FAL de plantas de eucalipto com murcha bacteriana de *R. solanacearum* sob doses de glyphosate ao decorrer de 28 dias.



Fonte: próprio autor.

Tabela 6 – Parametrização e adequação do modelo de superfície de resposta para a atividade da FAL de plantas de eucalipto com murcha bacteriana de *R. solanacearum* sob efeito de glyphosate.

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	t-valor	p > t	r _{adj} ²
FAL, ng mL⁻¹					0.55
β₀, intercepto	-3.15 × e ⁻¹	1.80	-0.15	0.85	
β_x, Tempo	6.20 × e ⁻¹	0.15	3.65	1.35 × e ⁻³ **	
β_y, Tratamento	-9.95 × e ⁻²	0.60	-0.15	0.85	
β_x β_y	-1.75 × e ⁻²	1.40 × e ⁻²	-1.25	0.20	
β_x²	1.90 × e ⁻²	0.05	0.30	0.75	
β_y²	-1.30 × e ⁻²	4.45 × e ⁻³	-2.90	8.20 × e ⁻³ **	

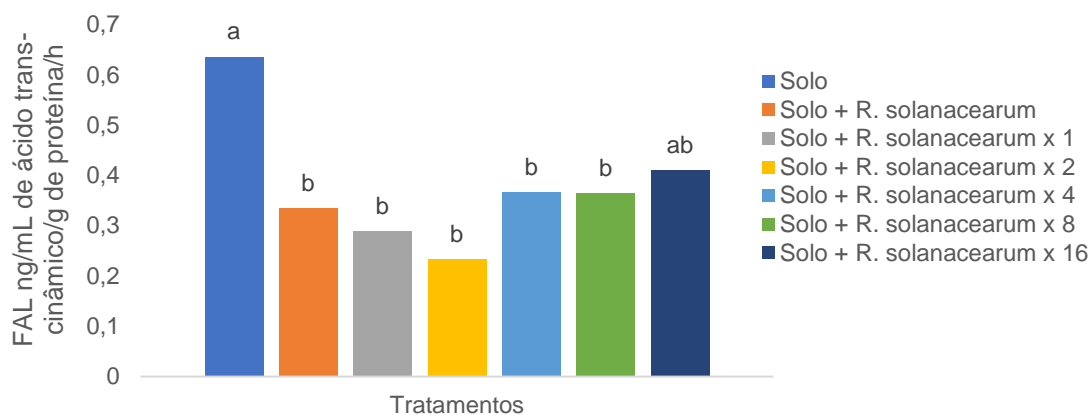
Nota: código de significância: ** p < 0.01; * p < 0.05.

Fonte: próprio autor.

A análise referente ao efeito das doses de GLY após 7 dias na atividade da FAL das plantas de eucalipto, mostrou que o tratamento sem a presença de fontes de estresse apresentou maior valor para a atividade dessa enzima, entretanto, de acordo com o teste t (p-valor < 0,05), o tratamento com apenas solo não apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao tratamento de 16x a dose de GLY (5,76 mg e.a. mL⁻¹) e aos demais (figura 14).

Apesar de não haver diferença estatística, é evidente a maior atividade da FAL no tratamento com apenas solo, pois não há a interferência do GLY na planta.

Figura 14 – Atividade da fenilalanina amônia-liase em plantas de eucalipto com murcha bacteriana de *R. solanacearum* sob doses de glyphosate após 7 dias.



Nota: médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade (p -valor < 0,05).

Fonte: próprio autor.

4.1.3 Análise de características morfofisiológicas das plantas

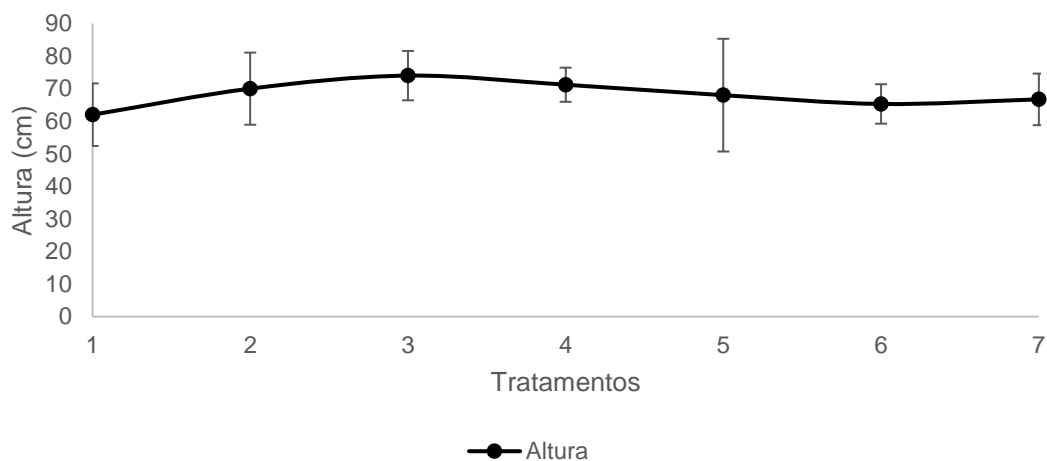
As análises das características morfofisiológicas abrangeram as variáveis altura, biomassa e índice SPAD. As médias relativas à altura das plantas e índice SPAD não apresentaram diferença estatística significativa (Figuras 15 e 16; Tabelas 7 e 8) entretanto os resultados encontrados para biomassa apresentaram diferença (p -valor < 0,05), sendo que os tratamentos 3 e 4 se destacaram, apresentando maiores valores, sendo 28,58 gramas e 29,88 gramas de biomassa da parte aérea, respectivamente (Figuras 17 e 18).

De acordo com a literatura, era esperado que doses mais elevadas de glyphosate prejudicassem o desenvolvimento das plantas e, apesar de não haver diferença estatística significativa para as variáveis altura e índice SPAD, é possível notar o aumento dessas características com as doses mais elevadas. Comparando as variáveis morfofisiológicas e observando as plantas no campo, foi possível notar que apesar das plantas apresentarem desenvolvimento da altura em doses mais elevadas, sua biomassa foi menor.

Relacionando essas características com as atividades enzimáticas já analisadas, é possível notar que as plantas continuaram se desenvolvendo nos

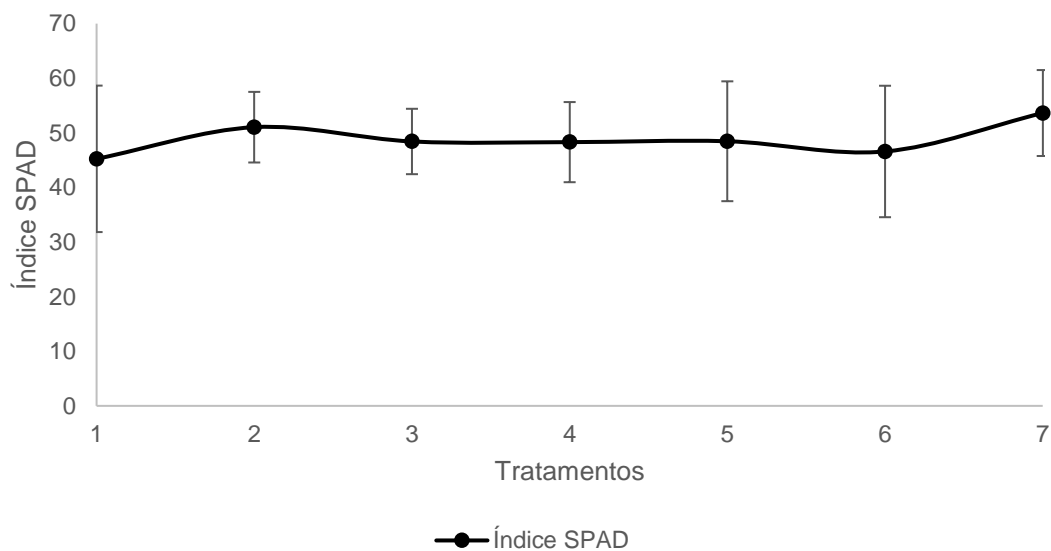
tratamentos onde houveram maiores valores para POD, podendo indicar que o sistema de defesa das plantas foi fator de grande importância para o desenvolvimento das mesmas, mesmo sob condições mais estressantes.

Figura 15 – Médias e desvios padrões da altura de plantas de eucalipto em solos com *R. solanacearum* sob doses de glyphosate; * $p < 0,05$.



Fonte: próprio autor.

Figura 16 – Médias e desvios padrões do índice SPAD de plantas de eucalipto em solos com *R. solanacearum* sob doses de glyphosate; * $p < 0,05$.



Fonte: próprio autor.

Tabela 7 – Altura de plantas de eucalipto após 28 dias, inoculadas com *R. solanacearum*, sob doses de glyphosate.

Tratamento	Altura (cm)	Desvio Padrão
Solo	62 a	9,6148
Solo + <i>R. solanacearum</i>	70 a	11,0755
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate x 1	74 a	7,57188
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate x 2	71,2 a	5,2451
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate x 4	68 a	17,3141
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate x 8	65,3 a	6,05622
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate x 16	66,7 a	7,91693

Nota: médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (p-valor < 0,05).

Fonte: próprio autor.

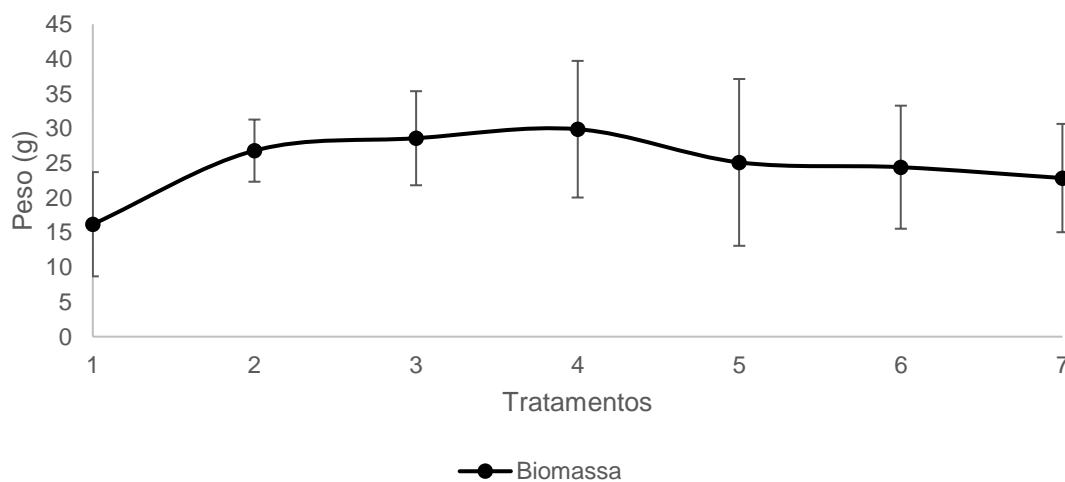
Tabela 8 – Índice SPAD de plantas de eucalipto após 28 dias, inoculadas com *R. solanacearum*, sob doses de glyphosate.

Tratamento	Índice SPAD	Desvio Padrão
Solo	45,24 a	13,4132
Solo + <i>R. solanacearum</i>	51,04 a	6,46653
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate x 1	48,42 a	5,98643
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate x 2	48,3 a	7,33848
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate x 4	48,46 a	10,9732
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate x 8	46,59 a	12,0379
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate x 16	53,63 a	7,87274

Nota: médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (p-valor < 0,05).

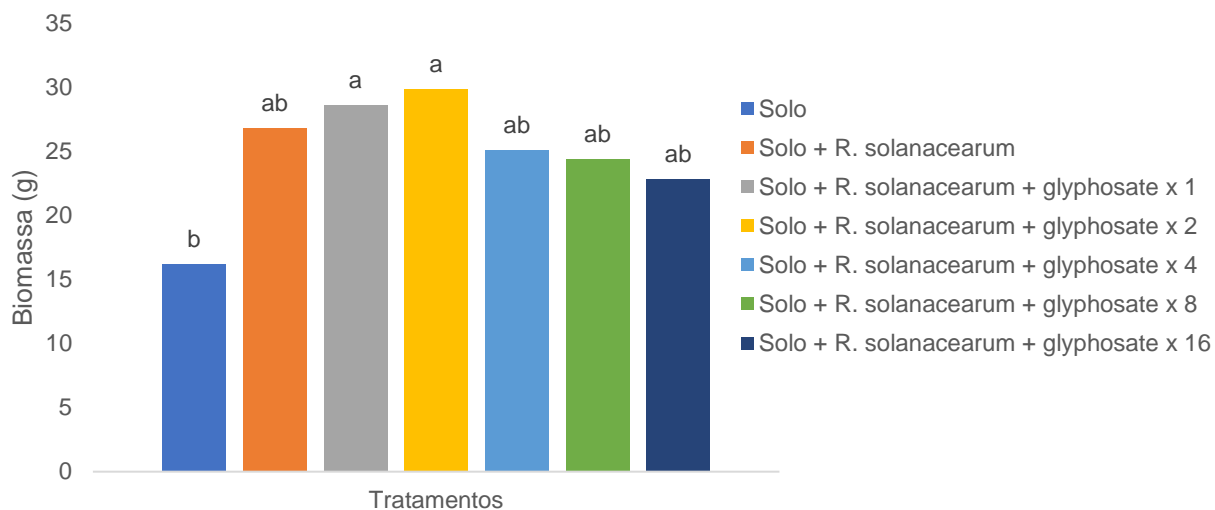
Fonte: próprio autor.

Figura 17 – Médias e desvios padrões da biomassa de plantas de eucalipto em solo com *R. solanacearum* sob doses de glyphosate; * p < 0,05.



Fonte: próprio autor.

Figura 18 – Biomassa de plantas de eucalipto em solo com *R. solanacearum* sob doses de glyphosate.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (p-valor < 0,05).

Fonte: próprio autor.

Foi possível notar o crescimento vegetativo de maneira irregular do eucalipto sob aplicação da dose recomendada e a dose de 2x de GLY no solo (Figura 19). Existe na literatura um comportamento similar, onde baixas concentrações de uma substância tóxica podem ocasionar efeitos benéficos ou estimulantes, sendo este evento conhecido como efeito hormesis (LUCKEY, 1991). Entretanto, neste trabalho não foram utilizadas subdoses.

Em estudos prévios, pequenas doses de GLY, entre 5,8 a 19 g e.a. ha⁻¹, ocasionaram o aumento de folhas, caule e massa seca total de plantas de eucalipto aos 40 dias após a aplicação do agrotóxico (NASCENTES *et al.*, 2018). Em pesquisas realizadas por Junior *et al.* (2020), foram testados dois clones de *Eucalyptus urograndis* e doses de GLY. Para as análises de altura e massa seca, as doses mais altas de GLY foram prejudiciais, reduzindo os valores de maneira significativa. Neste estudo, para as análises do índice SPAD e altura de plantas, as doses de GLY não apresentaram diferença, entretanto a dose recomendada e a dose de 2x de GLY apresentaram maiores resultados para biomassa, ambas sendo estatisticamente diferentes apenas do tratamento com apenas solo.

Figura 19 – Folha apical de eucalipto com murcha bacteriana de *R. solanacearum* sob doses de glyphosate, apresentando desenvolvimento de folhas túrgidas e disformes.



Fonte: próprio autor.

A tabela 9 mostra a porcentagem de plantas com sintomas de murcha em cada tratamento. No geral, foram observadas poucas plantas com sintomas da doença, sendo que o tratamento que apresentou maiores quantidades foi o tratamento com 8x a dose de GLY (2,88 mg e.a. L⁻¹). A ausência de sintomas está relacionada com dois principais fatores: o período de tempo de avaliação das plantas, sendo 30 dias; e a ausência do estresse nas plantas. As avaliações ocorreram apenas durante os 30 primeiros dias para que os dados se relacionassem de maneira mais direta com os dados do experimento de respiração do solo.

Tabela 9 – Porcentagem de plantas de eucalipto inoculadas com *R. solanacearum*, sob doses de glyphosate com sintomas de murcha bacteriana.

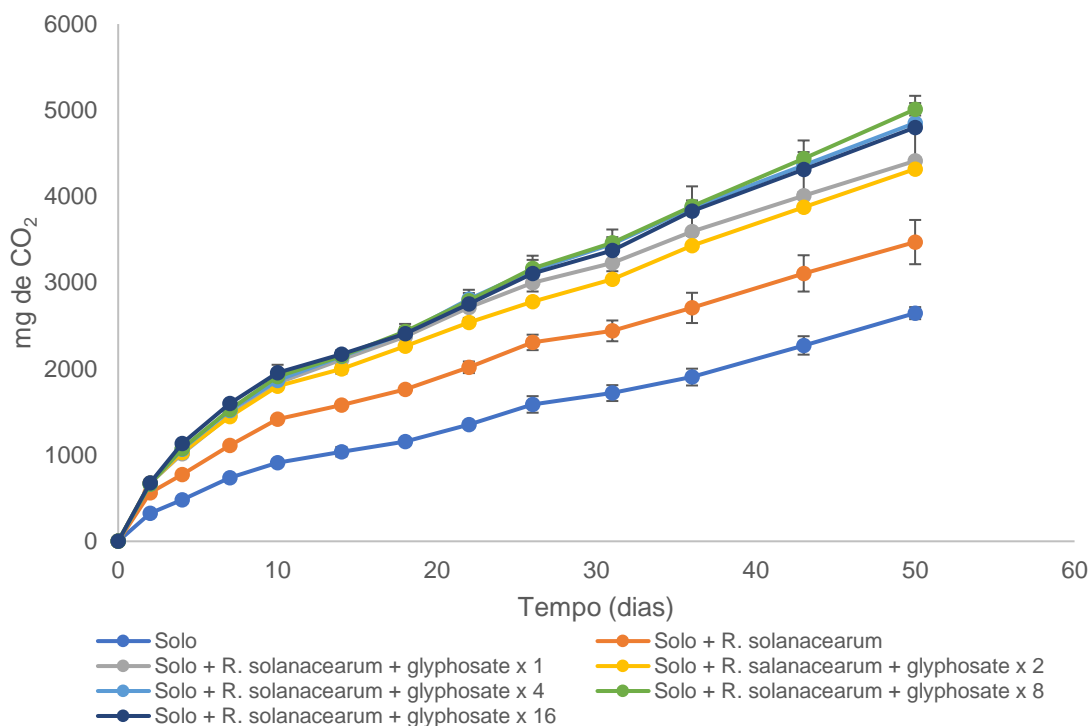
Tratamento	Plantas com sintomas (%)
Solo	0
Solo + <i>R. solanacearum</i>	0
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate 1x	0
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate 2x	10
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate 4x	20
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate 8x	30
Solo + <i>R. solanacearum</i> + glyphosate 16x	10

Fonte: próprio autor.

4.2 Análises do experimento de respirometria

Os resultados obtidos no experimento de respirometria mostram que, os tratamentos 1 e 2, ambos sem GLY, apresentaram menores valores para respiração do solo. Todos os tratamentos com doses de GLY apresentaram valores elevados para CO₂ acumulado, indicando assim maior atividade microbiana nas amostras de solo analisadas após os 50 dias. O tratamento com a sobredose de 8 vezes apresentou maiores quantidades de CO₂, indicando assim possível maior população ou atividade bacteriana ao longo do experimento (p -valor < 0,05) (Figura 20; Tabela 10).

Figura 20 – Produção acumulada de CO₂, em gramas, por 50 dias.



Fonte: próprio autor.

A população de *R. solanacearum* no solo respondeu de maneira positiva ao aumento das doses de GLY, apresentando maiores valores de UFC e respiração. Similarmente, estudos utilizando metodologias como respiração do solo e análise de biomassa para avaliar o efeito do GLY em microrganismos gerais do solo, indicam resultados onde doses menores que 50 mg.kg⁻¹ apresentam inibição temporária ou efeito nulo na respiração (HANEY *et al.*,

2000; LANCASTER *et al.*, 2006; WARDLE; PARKINSON, 1990; ZABALOY; GOMES, 2008), enquanto sobredoses entre 50 e 1500 mg.kg⁻¹ resultaram em maiores taxas de respiração (LANCASTER *et al.*, 2006).

Tabela 10 – Produção acumulada de CO₂ em mg em 50 dias.

Tratamento	CO ₂ (mg)	Desvio Padrão
Solo	2646,58 d	155,3244597
Solo + <i>R. solanacearum</i>	3470,79 c	342,2223126
Solo + <i>R. solanacearum</i> + Glifosato 1x	4412,09 ab	127,0001877
Solo + <i>R. solanacearum</i> + Glifosato 2x	4317,96 b	73,40783655
Solo + <i>R. solanacearum</i> + Glifosato 4x	4852,83 ab	90,43813171
Solo + <i>R. solanacearum</i> + Glifosato 8x	5010,94 a	157,5654803
Solo + <i>R. solanacearum</i> + Glifosato 16x	4800,26 ab	452,4161013

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. p-valor < 0,05.

Fonte: próprio autor.

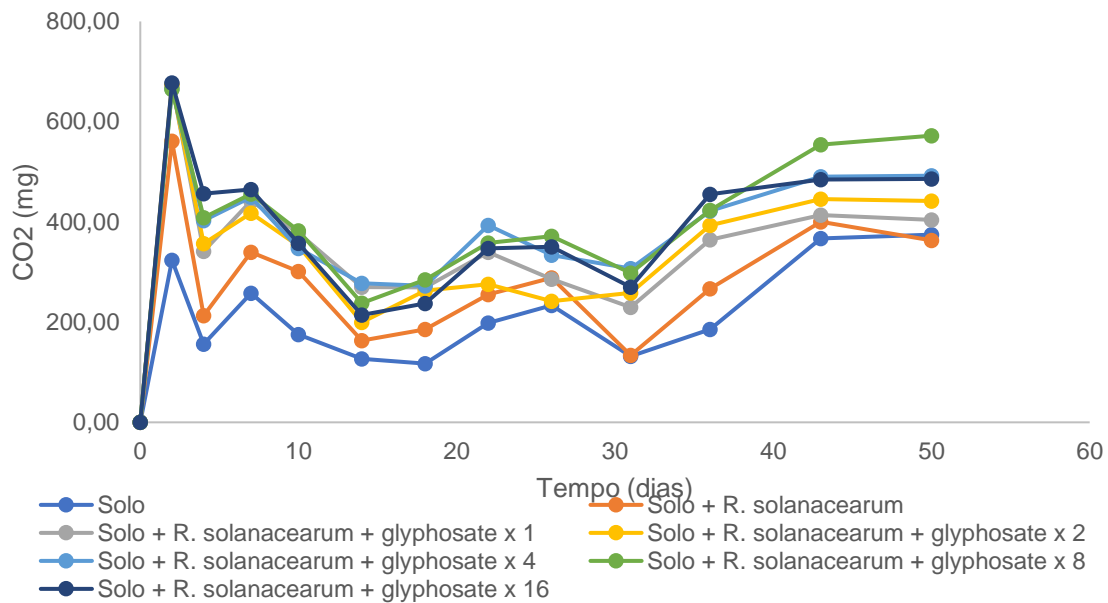
Neste presente estudo, a dose recomendada de 0,36 mg e.a. L⁻¹, causou aumento da respiração no solo contendo apenas *Ralstonia solanacearum*, sendo que a sobredose de até 2,88 mg e.a. L⁻¹ apresentou maiores valores de CO₂, representando assim, maiores taxas de respiração.

Similarmente, a dose de 0,84 kg e.a. ha⁻¹ do produto Roundup Ultra, aplicado na parte aérea de plantas de soja, em conjunto com adubação foliar, ocasionou aumentos de atividade enzimática, além de aumento de taxas respiratórias de amostras de solo da rizosfera das plantas, devido à liberação de exsudatos contendo o herbicida e outros compostos (MEANS *et al.*, 2007). Não obstante, os fatores que podem estar agindo nas alterações da atividade microbiana são diversos, como precipitação sazonal e temperatura, visto que o comportamento fisiológico das plantas e dos próprios microrganismos podem ser influenciados.

Estudos prévios realizados por Gomez *et al.* (2008), constataram diferença estatística significativa para respiração microbiana do solo, quando avaliando doses crescentes de GLY sobre biomassa microbiana, atividade metabólica e quociente metabólico dos microrganismos, corroborando com os resultados obtidos neste estudo.

Analisando a produção diária de CO₂, foi possível observar que no início do experimento houve crescimento exponencial da taxa de respiração, seguido de queda e estabilidade durante os primeiros 30 dias (Figura 21). Após esse período, houve ligeiro aumento na produção diária de CO₂, que se manteve relativamente constante até o final do experimento, aos 50 dias.

Figura 21 – Produção diária de CO₂ em mg por 50 dias.



Fonte: próprio autor.

Observando as amostras de solo durante o experimento foi possível notar que, após 30 dias, surgiram sinais de fungos no solo (Figura 22), indicando o possível reestabelecimento da microbiota do solo que havia sido esterilizado, justificando o aumento da respiração e corroborando com os resultados de produção diária de CO₂.

Figura 22 – Interior de respirômetro contendo amostra de solo com sinais de desenvolvimento de fungos após 35 dias de avaliação.



Fonte: próprio autor.

4.3 Análises das relações entre as variáveis obtidas

Após a obtenção de todos os dados, foram realizadas análises exploratórias com o objetivo de estabelecer relações entre as fontes de variações previamente analisadas.

As análises das correlações entre características do sistema patógeno-agrotóxico-hospedeiro apontaram correlações positivas estatisticamente significativas (p -valor $< 0,05$) apenas entre altura e índice SPAD, assim como altura e biomassa, indicando o aumento dessas características de maneira simultânea, como esperado devido ao desenvolvimento das plantas. As correlações negativas estatisticamente significativas ocorreram apenas entre peroxidase e proteína (p -valor $< 0,05$) e entre UFC e biomassa (p -valor $< 0,05$) (Tabela 11).

A correlação negativa entre UFC e biomassa é esperada, pois o aumento de UFC implica no maior potencial de infecção das plantas, prejudicando assim o desenvolvimento das mesmas.

Tabela 11 – Relações lineares entre variáveis analíticas; significância: $p < 0,05$.

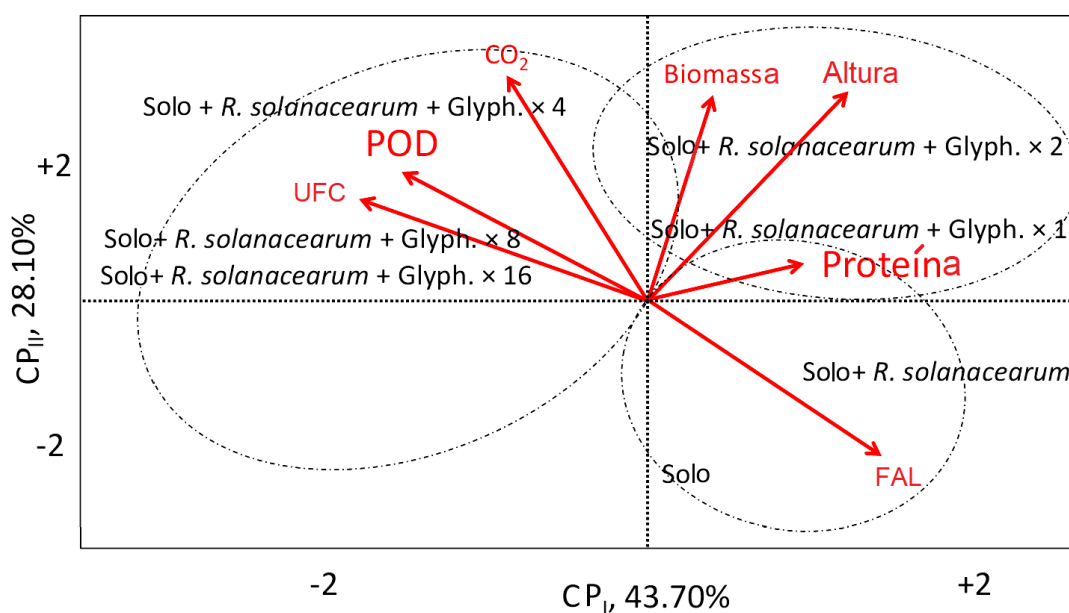
	Biomassa x Altura	Biomassa x UFC	SPAD x Altura	POD x Proteína
Correlação	0,661	-0,333	0,676	-0,421

Fonte: próprio autor.

Com o intuito de relacionar todos os resultados obtidos ao longo dos experimentos utilizou-se análise de componentes principais (PCA - *Principal Component Analysis*), sendo que a mesma é capaz de sintetizar variáveis originais analisadas e relacioná-las com outras de mesma dimensão, originando conjuntos chamados de componentes principais (Figura 23) (VARELLA, 2008).

Para a identificação dos componentes principais foram levados em consideração os dados obtidos pela análise, que forneceram as informações necessárias para a interpretação dos resultados, possibilitando a caracterização dos conjuntos de variáveis. Foram identificados dois grandes conjuntos de variáveis, portanto dois componentes principais.

Figura 23 – Análise de componentes principais (PCA), mapeamento fatorial da relação hospedeiro-patógeno-agrotóxico.



Fonte: próprio autor.

Os componentes principais identificados explicam 71,8% da variabilidade total para os fatores testados. A análise apresentou correlação negativa para UFC ($R = -0,95$) e correlação positiva para altura ($R = 0,75$), ambas com p -valor $< 0,01$ na componente principal 1 (CP₁).

Devido às correlações significativas encontradas, a CP₁ 1 foi caracterizada neste estudo como indisponibilidade de GLY no solo (Tabela 12).

Sendo assim possível notar que, na ausência e menores doses de GLY, há menos UFC do patógeno no solo, diminuindo a probabilidade de ataque ao eucalipto e aumentando potencialmente a capacidade de desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, ocasionando maior altura de plantas.

Com relação à componente principal 2 (PC_{II}), a análise de correlação apresentou correlação positiva para biomassa ($R = 0,90$), com p -valor $< 0,01$ e para geração de CO₂, ($R = 0,80$), com p -valor $< 0,05$, explicando assim que quanto maior a biodegradação do GLY no solo, maiores as quantidades de biomassa e respiração no solo, portanto a CP_{II} foi caracterizada neste estudo como biodegradação (Tabela 12).

Relacionando os resultados obtidos, no que se refere ao aumento de UFC e CO₂ com o aumento de doses de GLY, a *R. solanacearum* mostra fortes indícios para um potencial patógeno de plantas capaz de metabolizar o herbicida presente no solo, utilizando-o como substrato para seu desenvolvimento. Os resultados obtidos para atividades enzimáticas relacionadas à defesa das plantas também indicam relação em potencial entre o patógeno e o GLY agindo diretamente nas plantas de eucalipto.

Em aspecto geral, os resultados revelaram a possível relação entre a bactéria e o agrotóxico, além de efeitos adversos avaliados em atividades enzimáticas e morfofisiológicas. De acordo com as análises realizadas, é possível estabelecer a relação entre a bactéria e o herbicida, indicando que a bactéria pode preferir degradar o GLY ao invés de atacar as plantas de eucalipto, pois o número de UFC aumenta com o aumento das doses, além do aumento das taxas de CO₂ no solo, enquanto a planta ainda apresenta bons valores para suas características morfofisiológicas.

Também foi possível observar o melhor desenvolvimento das plantas nos tratamentos que também apresentaram melhores valores para atividade da POD, indicando que o sistema de resistência das plantas exerceu função crucial para o desenvolvimento das mesmas, principalmente sob condições estressantes. Apesar da FAL também ser uma enzima de suma importância para a resistência, sua atividade é diretamente prejudicada pela ação do GLY, portanto ela aparece como fortemente relacionada aos tratamentos onde não há aplicação do herbicida.

Tabela 12 – Pontos ortogonais latentes no complexo solo-bactéria-planta-agrotóxico.

Item	Ponto ortogonal latente	
	CPI, indisponibilidade de GLY	CPII, biodegradação
Autovalor	3.25 *	2.85 *
Porcentagem de variância	40.70	35.65
Porcentagem de variância acumulativa	40.70	76.35
Carregamento		
Altura	0.75 **	0.55
Biomassa	0.20	0.90 **
Unidade Formadora de Colônia	-0.95 **	0.15
Proteína	0.70	0.40
Peroxidase	-0.65	0.30
Fenilalanina amônia-liase	0.65	-0.40
Geração de CO ₂	-0.55	0.80 *
Contribuição, %		
Altura	18.40	10.15
Biomassa	2.30	52.45
Unidade Formadora de Colônia	27.15	1.00
Proteína	15.10	6.35
Peroxidase	13.60	2.90
Fenilalanina amônia-liase	13.75	5.35
Geração de CO ₂	9.60	21.80
Solo	1.55	65.95
Solo + <i>R. solanacearum</i>	7.50	2.95
Solo + <i>R. solanacearum</i> + x glyphosate	21.60	3.20
Solo + <i>R. solanacearum</i> + 2 x glyphosate	14.60	24.70
Solo + <i>R. solanacearum</i> + 4 x glyphosate	7.30	1.25
Solo + <i>R. solanacearum</i> + 8 x glyphosate	23.75	0.95
Solo + <i>R. solanacearum</i> + 16 x glyphosate	23.75	0.95

Código de significância: ** p < 0.01; * p < 0.05.

Fonte: próprio autor.

Diversos trabalhos utilizando diferentes doses de GLY e diferentes produtos comerciais não apresentaram grandes impactos na biomassa microbiana no solo (ABDEL-MALLEK *et al.*, 1994; RATCLIFF *et al.*, 2006; LANE *et al.*, 2012; ROSE *et al.*, 2016). Entretanto, avaliando especificamente o comportamento de *R. solanacearum*, em solo sem a presença de outros microrganismos, e utilizando a PCA para relacionar todos os fatores analisados de maneira mais abrangente, foi possível notar o desenvolvimento evidente do patógeno *R. solanacearum*.

Com relação ao tempo, pesquisas prévias apontam que o GLY possui efeito variável no que se refere ao estímulo ou inibição de desenvolvimento da microbiota geral no solo, apresentando aumento, diminuição e até mesmo efeito nulo (ABDEL-MALLEK *et al.*, 1994). Nesta pesquisa, o número de UFC e a respiração do solo aumentaram ao longo do experimento.

Os resultados obtidos por Andrighetti *et al.* (2014), enfatizam que os microrganismos em solos com menor tempo de interação com o GLY possuem maior capacidade para a degradação, quando comparados com os existentes em solos onde a aplicação foi realizada a mais tempo. De maneira similar, nos primeiros dias após a aplicação do GLY houveram maiores respostas para UFC e CO₂.

Análises cromatográficas do solo para a detecção da presença do AMPA seriam de grande valia, pois permitiriam de fato, comprovar a biodegradação das moléculas de glyphosate pela bactéria patogênica.

5 CONCLUSÃO

Doses de glyphosate no solo contendo plantas de eucalipto sob presença de *Ralstonia solanacearum* apresentaram interação, aumentando a população da bactéria no solo. A presença do glyphosate também aumentou as taxas de CO₂ na respiração do solo inoculado com a bactéria, além de interferir na atividade das enzimas analisadas, relacionadas ao sistema de defesa das plantas, diminuindo a atividade da FAL e aumentando a atividade da POD.

Apesar de ser um fitopatógeno, a bactéria possui potencial para a biodegradação do GLY em solos. A interação da bactéria com o herbicida pode estar produzindo compostos que estão favorecendo o desenvolvimento das plantas.

Sendo assim, são necessários estudos mais específicos com o objetivo de comprovar a utilização da molécula de glyphosate pelo patógeno de solo *Ralstonia solanacearum*.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MALLEK, A. Y.; ABDEL-KADER, M. I. A.; SHONKEIR, A. M. A. Effect of glyphosate on fungal population, respiration and the decay of some organic matters in Egyptian soil. **Microbiological Research**, Muenchen, v. 149, n. 1, p. 69-73, 1994.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Ed. da UFLA, 2004.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; SARTÓRIO, R. C.; BINOTI, D. H.; SILVA, R. R.; LAU, D.; VANETTI, C. A. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 357-366, 2006.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Ed. Da UFLA, 2009. 500 p.
- ALTMAN, J.; CAMPBELL, C. L. Effect of herbicides on plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 15, n. 1, p. 361-385, 1977.
- ÁLVAREZ ROMERO, P. I.; GRABOWSKI OCAMPOS, C.; CARPIO, C.; TORO, V. S.; FERREIRA E FERREIRA, A. F. T. A.; MIZUBUTI, E. S. First Report of *Ralstonia solanacearum* Causing Bacterial Wilt of *Eucalyptus* in Ecuador. **Plant Disease**, St. Paul, v. 105, n. 1, p. 211, 2021.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. D.; SANTOS, T. C. R. D.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- ANDRIGHETTI, M. S.; NACHTIGALL, G. R.; QUEIROZ, S. C. N. D.; FERRACINI, V. L.; AYUB, M. A. Z. Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 38, n. 5, p. 1643-1653, 2014.
- ASCOLANI YAEL, J.; FUHR, J. D.; BOCAN, G. A.; DAZA MILLONE, A.; TOGNALLI, N.; SANTOS, A. M.; MARTIARENA, M. L. Abiotic degradation of glyphosate into aminomethylphosphonic acid in the presence of metals. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 40, p. 9651-9656, 2014.
- ASSIS, T. F. Melhoramento genético de Eucalyptus: desafios e perspectivas. *In: 3º ENCONTRO BRASILEIRO DE SILVICULTURA*, 3, 2015, Campinas. **Anais [...]**. Campinas: [s.n.], 2015. p. 127-148.
- BANCO CENTRAL DO BRASIL. **Calculadora do cidadão**. c2021. Disponível em: <https://www3.bcb.gov.br/CALCIDADAOPublico/corrigirPorIndice.do?method=corrigirPorIndice> . Acesso em: 09 nov. 2021.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, New Jersey, v. 100 n. 1, n. 1, p. 68-70p, 1965.

BATTIE-LACLAU, P.; LACLAU, J. P.; DOMEQ, J. C.; CHRISTINA, M.; BOUILLET, J. P.; PICCOLO, M. C.; GONÇALVES, J. L. M.; MOREIRA, R. M.; KRUSCHE, A. V.; BOUVET, J. M.; NOUVELLON, Y. Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in *Eucalyptus grandis* plantations. **New Phytologist**, Chichester, v. 203, n. 2, p. 401-413, 2014.

BHATT, P.; JOSHI, T.; BHATT, K.; ZHANG, W.; HUANG, Y.; CHEN, S. Binding interaction of glyphosate with glyphosate oxidoreductase and C-P lyase: Molecular docking and molecular dynamics simulation studies. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 409, p. 124927, 2021.

BECKIE, H. J.; HALL, L. M. Genetically-modified herbicide-resistant (GMHR) crops a two-edged sword? An Americas perspective on development and effect on weed management. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 66, p. 40-45, 2014.

BOAVA, L. P.; KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F.; DI PIERO, R. M.; FURTADO, E. L. Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*. **Tropical Plant Pathology**, Heidelberg, v. 35, p. 124-128, 2010a.

BOAVA, L. P.; KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F.; DI PIERO, R. M.; FURTADO, E. L. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, p. 168-172, 2010b.

BOBIS, O.; MOISE, A. R.; BALLESTEROS, I.; REYES, E. S.; DURÁN, S. S.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, J.; CRUZ-QUINTANA S.; GIAMPIERI F.; BATTINO M.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M. Quality parameters, chemical composition and health-promoting properties. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 325, p. 126870, 2020.

BORGGGAARD, O. K.; GIMSING, A. L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 441-456, 2008.

BOTT, S.; TEFAMARIAM, T.; KANIA, A.; EMAN, B.; ASLAN, N.; RÖMHELD, V.; NEUMANN, G. Phytotoxicity of glyphosate soil residues re-mobilised by phosphate fertilisation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 342, n. 1, p. 249-263, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUSSE, M. D.; RATCLIFF, A. W.; SHESTAK, C. J.; POWERS, R. F. Non-target effects of glyphosate on soil microbes. **Proceedings Of The California Weed Science Society**, Salinas, v. 52, p. 146-150, 2000.

CAO, J. D. Investigation of bacterial wilt in *Eucalyptus saligna* and *E. grandis* introduced from Brazil. **Guangxi Forestry Science and Technology**, Nanning, v. 4, p. 30-31, 1982.

CARMONA, N. F. **Respirometria aplicada a solos contaminados por derivados de petróleo e fluorcarbonados em condições climáticas reais**. 2016. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2016.

CARVALHO, L. B.; ALVES, P. L. C. A.; ANDRADE, T. C. G R. Content and fluorescence of chlorophyll in eucalypt exposed to glyphosate. **Communications**, Zilina, v. 6, n. 1-2, p. 07-11, 2016.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R. S. (ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 81-124.

CERVEIRA JUNIOR, W. R.; COSTA, Y. K. S.; CARBONARI, C. A.; DUKE, S. O.; ALVES, P. L. C. A.; CARVALHO, L. B. Growth, morphological, metabolic and photosynthetic responses of clones of eucalyptus to glyphosate. **Forest Ecology and Management**, v. 470, p. 118218, 2020.

CETESB/SP. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Norma P4.230 – **Critérios para aplicação de biossólidos em áreas agrícolas**: critérios para projeto e operação. São Paulo: Cetesb, 1999. Manual Técnico.

CHANG, S. Y.; LIAO, C. Analysis of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with indirect fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 959, n. 1-2, p. 309-315, 2002.

CHRISTINA, M.; LE MAIRE, G.; NOUVELLON, Y.; VEZY, R.; BORDON, B.; BATTIE-LACLAU, P.; GONÇALVES, J. L. M.; DELGADO-ROJAS, J. S.; BOUILLET, J. P.; LACLAU, J. P. Simulating the effects of different potassium and water supply regimes on soil water content and water table depth over a rotation of a tropical *Eucalyptus grandis* plantation. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 418, p. 4-14, 2018.

CORREIA, B.; PINTÓ-MARIJUAN, M.; NEVES, L., BROSSA, R.; DIAS, M. C.; COSTA, A.; CASTRO, B. B.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C.; CHAVES, M. M.; PINTO, G. Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: physiological and biochemical profiles. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 150, n. 4, p. 580-592, 2014.

CORREIA, L. Q. **Avaliação comparativa de SNPs e microssatélites para identificação individual, determinação de parentesco e ancestralidade em espécie de Eucalyptus**. 2011. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas, Genética Molecular e de Populações, Biotecnologia Molecular) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2011.

COUTINHO, T. A.; ROUX, J.; RIEDEL, K. H.; TERBLANCHE, J.; WINGFIELD, M. J. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. **Forest Pathology**, Berlin, v. 30, n. 4, p. 205-210, 2000.

COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J. *Ralstonia solanacearum* and *R. pseudosolanacearum* on *Eucalyptus*: opportunists or primary pathogens? **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, p. 761, 2017.

DENNY, T. P. *Ralstonia solanacearum* – a plant pathogen in touch with its host. **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 11, p. 486-489, 2000.

DIANESE, J. C.; DRISTIG, M. C. G.; CRUZC, A. P. Susceptibility to wilt associated with *Pseudomonas solanacearum* among six species of *Eucalyptus* growing in equatorial Brazil. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 19, n. 3, p. 71-76, 1990.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.

DUKE, S. O. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and-susceptible crops and weeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Whashington, v. 59, n. 11, p. 5835-5841, 2011.

DUKE, S. O.; LYDON, J.; KOSKINEN, W. C.; MOORMAN, T. B.; CHANEY, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Whashington, v. 60, n. 42, p. 10375-10397, 2012.

EFSA. Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. **EFSA Journal**, Oxford, v. 11, n. 7, p. 3290, 2013.

EL-ARGAWY, E.; ADSS, I. A. Quantitative Gene Expression of Peroxidase, Polyphenoloxidase and Catalase as Molecular Markers for Resistance against *Ralstonia solanacearum*. **American Journal of Molecular Biology**, Irvine, v. 6, n. 2, p. 88-100, 2016.

ELPHINSTONE, J. G. The current bacterial wilt situation: a global overview. In: **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: American Phytopathological Society, 2005. p. 9-28.

EPPO. PM 7/21 (2) *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex). **EPPO Bulletin**, Chichester, v. 48, p. 32-63, 2018.

FEGAN, M.; HOLOWAY, G.; HAYWARD, A.C.; TIMMIS, J. Development of a diagnostic test based on the polymerase chain reaction (PCR) to identify strains of *Ralstonia solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype. In: PRIOR, P.; ALLEN, C. ;

ELPHINSTONE, J. (ed.). **Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects**. Berlin: Springer, 1998. p. 34-43.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia Solanacearum* Species Complex**, v. 1, p. 449-461, 2005. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/37628297_How_Complex_is_the_Ralstonia_Solanacearum_Species_Complex. Acesso em: 12 out. 2021.

FENG, J. C.; THOMPSON, D. G. Fate of glyphosate in a Canadian forest Watershed. 2: persistence in foliage and soil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, California, v.38, n.4, p.1118-1125, 1990.

FERREIRA, F. A.; MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. Mogi Guaçu: International Paper, 2002.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, M. A.; MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C. *Ralstonia solanacearum* decreases volumetric growth of trees and yield of kraft cellulose of *Eucalyptus spp.* **Forest Pathology**, Berlin, v. 48, n. 1, p. e12376, 2018.

FLORENTINE, S. K.; FOX, J. E. D. Competition between *Eucalyptus victrix* seedlings and grass species. **Ecological Research**, Richmond, v. 18, n. 1, p. 25-39, 2003.

FOLEY, W. J.; LASSAK, E. V. **The potential of bioactive constituents of Eucalyptus foliage as non-wood products from plantations**. Barton: Rural Industries Research and Development Corporation, 2004.

FONSECA, N. R.; GUIMARÃES, L. M. S.; HERMENEGILDO, P. S.; TEIXEIRA, R. U.; LOPES, C. A.; ALFENAS, A. C. Molecular characterization of *Ralstonia solanacearum* infecting *Eucalyptus spp.* in Brazil. **Forest Pathology**, Berlin, v. 44, n. 2, p. 107-116, 2014.

FONSECA, N. R.; OLIVEIRA, L. S.; GUIMARÃES, L. M.; TEIXEIRA, R. U.; LOPES, C. A., ALFENAS, A. C. An efficient inoculation method of *Ralstonia solanacearum* to test wilt resistance in *Eucalyptus spp.* **Tropical Plant Pathology**, Heidelberg, v. 41, n. 1, p. 42-47, 2016.

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. Uptake, transport and metabolism of glyphosate in plants. **Glyphosate: a unique global herbicide**, New York, v. 189, p. 143-181, 1997.

FREITAS, R. G.; HERMENEGILDO, P. S.; GUIMARÃES, L. M.; ZAUZA, E. A.; BADEL, J. L.; ALFENAS, A. C. Detection and characterization of *Ralstonia pseudosolanacearum* infecting *Eucalyptus sp.* in Brazil. **Forest Pathology**, Berlin, v. 50, n. 3, p. e12593, 2020.

FREITAS, R. G.; HERMENEGILDO, P. S.; CASCARDO, R. S.; GUIMARÃES, L. M.; SANTOS, S. A.; BADEL, J. L.; ALFENAS-ZERBINI, P.; ALFENAS, A. C. Validation and use of a qPCR protocol to quantify the spread of *Ralstonia solanacearum* in susceptible and resistant eucalypt plants. **Plant Pathology**, Chichester, v. 70, n. 7, p. 1708-1718, 2021a.

FREITAS, R. G.; HERMENEGILDO, P. S.; GUIMARÃES, L. M.; ZAUZA, E. A.; BADEL, J. L.; ALFENAS, A. C. Molecular characterization and aggressiveness of the *Ralstonia solanacearum* species complex from *Eucalyptus* spp. in Brazil. **Forest Pathology**, Berlin, p. e12704, 2021b.

FRIGOTTO, T.; NAVROSKI, M. C.; AGUIAR, N. S.; FELIPPE, D.; BORSOI, G. A.; PEREIRA, M. O.; LOVATEL, Q. C. Desempenho de espécies e procedências de *Eucalyptus* no Planalto Norte Catarinense, Brasil. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 48, n. 127, e3273, 2020.

GARAU, A. M.; GHERSA, C. M.; LEMCOFF, J. H.; BARAÑAO, J. J. Weeds in *Eucalyptus globulus* subsp. *maidenii* (F. Muell) establishment: effects of competition on sapling growth and survivorship. **New Forests**, Dordrecht, v. 37, n. 3, p. 251-264, 2009.

GENIN, S.; BOUCHER, C. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v. 3, n. 3, p. 111-118, 2002.

GENIN, S.; DENNY, T. P. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 67-89, 2012.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, p. 35-120, 2000.

GIYANTO, G.; SINAGA, M. S.; MUTAQIN, K. H.; TIAHJONO, B. The potential of endophytic bacteria from the root of *Eucalyptus pellita* as a biocontrol agent against *Ralstonia solanacearum*. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 22, n. 6, 2021.

GODED, S.; EKROOS, J.; DOMÍNGUEZ, J.; AZCÁRATE, J. G.; GUITIÁN, J. A.; SMITH, H. G. Effects of eucalyptus plantations on avian and herb species richness and composition in North-West Spain. **Global Ecology and Conservation**, Amsterdam, v. 19, p. e00690, 2019.

GOMEZ, E.; FERRERAS, L.; LOVOTTI, L.; FERNANDEZ, E. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. **European Journal of Soil Biology**, Issy les Moulineaux Cedex, v. 45, n. 2, p. 163-167, 2009.

GONZÁLEZ-VALENZUELA, L. E.; DUSSÁN, J. Molecular assessment of glyphosate-degradation pathway via sarcosine intermediate in *Lysinibacillus sphaericus*. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 25, n. 23, p. 22790-22796, 2018.

GORRINI, B.; POBLETE, H.; HERNÁNDEZ, G.; DUNN, F. Tableros de partículas y MDF de *Eucalyptus nitens*: Ensayos a escala industrial. **Bosque**, Valdivia, v. 25, n. 3, p. 89-97, 2004.

GRAVENA, R.; FILHO, R. V.; ALVES, P. L. C.; MAZZAFERA, P.; GRAVENA, A. R. Glyphosate has low toxicity to citrus plants growing in the field. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 92, n. 1, p. 119-127, 2012.

HADI, F.; MOUSAVI, A.; NOGHABI, K. A.; TABAR, H. G.; SALMANIAN, A. H. New bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with glyphosate-degrading activity. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, New York, v. 48, n. 3, p. 208-213, 2013.

HANEY, R. L.; SENSEMAN, S. A.; HONS, F. M.; ZUBERER, D. A. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. **Weed Science**, Cambridge, v. 48, n. 1, p. 89-93, 2000.

HAYWARD, A. C. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: HARTMAN, G. L.; HAYWARD, A. C. (ed.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, pseudomonas solanacearum**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 127-135.

HOPPE, J. M.; BRUN, E. J. **Produção de sementes e mudas florestais**. Santa Maria: [s.n], 2004. Caderno didático, v. 1, n. 2.

HOVE-JENSEN, B.; ZECHEL, D. L.; JOCHIMSEN, B. Utilization of glyphosate as phosphate source: biochemistry and genetics of bacterial carbon-phosphorus lyase. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 78, n. 1, p. 176-197, 2014.

IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. **Anuário estatístico IBÁ**. 2020. Brasília: [s.n.], 2020. 66 p.

JACOB, G. S.; GARBOW, J. R.; HALLAS, L. E.; KIMACK, N. M.; KISHORE, G. M.; SCHAEFER, J. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas sp.* strain LBr. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 12, p. 2953-2958, 1988.

KACZYNSKI, P.; LOZOWICKA, B.; WOLEJKO, E.; IWANIUK, P.; KONECKI, R.; DRAGOWSKI, W.; LOZOWICKI, J.; AMANBEK, N.; RUSILOWSKA, J. PIETRASZKO, A. Complex study of glyphosate and metabolites influence on enzymatic activity and microorganisms association in soil enriched with *Pseudomonas fluorescens* and sewage sludge. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 393, p. 122443, 2020.

KAFARSKI, P.; LEJCZAK, B.; FORLANI, G. **Biodegradation of pesticides containing carbon-to-phosphorus bond**. [New York]: American Chemistry Society Symposium Serial, 2001. V. 777, p. 145-163.

KANISSERY, R.; GAIKHE, B.; KADYAMPAKANI, D.; BATUMAN, O.; ALFEREZ, F. Glyphosate: Its environmental persistence and impact on crop health and nutrition. **Plants**, Basel, v. 8, n. 11, p. 499, 2019.

KATAN, J.; ESHEL, Y. Interactions between herbicides and plant pathogens. *In*: RESIDUE reviews. New York: Springer, 1973. p. 145-177.

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. **Phytopathology**, St. Paul, v. 44, n. 12, 1954.

KONAPPA, N. M.; MARIA, M.; UZMA, F.; KRISHNAMURTHY, S.; NAYAKA, S. C.; NIRANJANA, S. R.; CHOWDAPPA, S. Lactic acid bacteria mediated induction of defense enzymes to enhance the resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 207, p. 183-192, 2016.

KREMER, R.; MEANS, N.; KIM, S. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Abingdon, v. 85, n. 15, p. 1165-1174, 2005.

KRUSE, N. D.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores da EPSPS: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Londrina, v. 1, n. 2, p. 139-146, 2000.

LA CECILIA, D.; MAGGI, F. Analysis of glyphosate degradation in a soil microcosm. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 233, p. 201-207, 2018.

LANCASTER, S. H.; HANEY, R. L.; SENSEMAN, S. A.; HONS, F. M.; CHANDLER, J. M. Soil microbial activity is affected by Roundup WeatherMax and pesticides applied to cotton (*Gossypium hirsutum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 19, p. 7221-7226, 2006.

LANE, M.; LORENZ, N.; SAXENA, J.; RAMSIER, C.; DICK, R. P. The effect of glyphosate on soil microbial activity, microbial community structure, and soil potassium. **Pedobiologia**, Muenchen, v. 55, n. 6, p. 335-342, 2012.

LI, C.; BERNINGER, F.; KOSKELA, J.; SONNINEN, E. Drought responses of *Eucalyptus* microtheca provenances depend on seasonality of rainfall in their place of origin. **Functional Plant Biology**, Clayton, v. 27, n. 3, p. 231-238, 2000.

LI, S.; PI, J.; ZHU, H.; YANG, L.; ZHANG, X.; DING, W. Caffeic acid in tobacco root exudate defends tobacco plants from infection by *Ralstonia solanacearum*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 12, p. 1402, 2021.

LIU, C. M.; MCLEAN, P. A.; SOOKDEO, C. C.; CANNON, F. C. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 6, p. 1799-1804, 1991.

LIU, B.; LIN, Y. Z.; ZHU, Y. J.; GE, C. B.; CAO, Y. Attenuation Characteristics of Bacterial-wilt-disease Biocontrol Strain Anti-8098A (*Bacillus cereus*) to *Ralstonia*

solanacearum [J]. **Journal of Agricultural Biotechnology**, Cambridge, v. 3, p. 322-329, 2004.

LOPES, C. A.; ROSSATO, M. History and status of selected hosts of the *Ralstonia solanacearum* species complex causing bacterial wilt in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 1228, 2018.

LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; PORTZ, R. L. Induction of resistance to *Macrophomina phaseolina* in soybean treated with rosemary extract. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 44, n. 1, p. 45-50, 2018.

LU, T.; XU, N.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; DEBOGNIES, A.; ZHOU, Z.; SUN, L.; QIAN, H. Understanding the influence of glyphosate on the structure and function of freshwater microbial community in a microcosm. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 260, p. 114012, 2020.

LUCKEY, T. D. Radiation hormesis in growth and development. *In*: LUCKEY, T. D. **Radiation hormesis**. New York: CRC Press, 1991. p. 55-63.

LUSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, p. 244-249, 1999.

MAFIA, R. G. **Sintomatologia, etiologia e controle da Murcha Bacteriana do eucalipto**. 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MAMY, L.; BARRIUSO, E. Glyphosate adsorption in soils compared to herbicides replaced with the introduction of glyphosate resistant crops. **Chemosphere**, Oxford, v. 61, n. 6, p. 844-855, 2005.

MARIUTTO, M.; DUBY, F.; ADAM, A.; BUREAU, C.; FAUCONNIER, M.L.; ONGENA, M.; THONART, P.; DOMMES, J. The elicitation of a systemic resistance by *Pseudomonas putida* BTP1 in tomato involves the stimulation of two lipoxygenase isoforms. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2011.

MARKOVIĆ, S.; STANKOVIĆ, S.; ILIČIĆ, R.; VELJOVIĆ JOVANOVIĆ, S.; MILIĆ KOMIĆ, S.; JELUŠIĆ, A.; POPOVIĆ, T. *Ralstonia solanacearum* as a potato pathogen in Serbia: Characterization of strains and influence on peroxidase activity in tubers. **Plant Pathology**, Chichester, v. 70, n. 8, p. 1945-1959, 2021.

MASOTTI, F.; GARAVAGLIA, B. S.; PIAZZA, A.; BURDISSO, P.; ALTABE, S.; GOTTIG, N.; OTTADO, J. Bacterial isolates from Argentine Pampas and their ability to degrade glyphosate. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 774, p. 145761, 2021.

MEANS, N. E.; KREMER, R. J.; RAMSIER, C. Effects of glyphosate and foliar amendments on activity of microorganisms in the soybean rhizosphere. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, New York, v. 42, n. 2, p. 125-132, 2007.

- MENGISTU, A., REDDY, K. N., ZABLOTOWICZ, R. M., WRATHER, A. J. Propagule densities of *Macrophomina phaseolina* in soybean tissue and soil as affected by tillage, cover crop, and herbicide. **Plant Health Progress**, St. Paul, v. 10, n. 1, p. 28, 2009.
- MESKIMEN, G. F.; ROCKWOOD, D. L.; REDDY, K. V. Development of *Eucalyptus* clones for a summer rainfall environment with periodic severe frosts. **New Forests**, Dordrecht, v. 1, n. 3, p. 197-205, 1987.
- MESNAGE, R.; ANTONIOU, M. N. Computational modelling provides insight into the effects of glyphosate on the shikimate pathway in the human gut microbiome. **Current Research in Toxicology**, Amsterdam, v. 1, p. 25-33, 2020.
- MCDOWELL, N.; POCKMAN, W. T.; ALLEN, C. D.; BRESHEARS, D. D.; COBB, N.; KOLB, T.; PLAUT, J.; SPERRY, J.; WEST, A.; WILLIAMS, D. G.; YEPEZ, E. A. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? **New phytologist**, Chichester, v. 178, n. 4, p. 719-739, 2008.
- MORAES, P. V. D.; ROSSI, P. Comportamento ambiental do glifosato. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 9, n. 3, 2010.
- NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H.; TAKEBA, G.; KUBO, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, n. 3, p. 323-328, 2001.
- NAMBIAR, E. K. S.; SANDS, R. Competition for water and nutrients in forests. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 23, n. 10, p. 1955-1968, 1993.
- NASCENTES, R. F.; CARBONARI, C. A.; SIMÕES, P. S.; BRUNELLI, M. C.; VELINI, E. D.; DUKE, S. O. Low doses of glyphosate enhance growth, CO₂ assimilation, stomatal conductance and transpiration in sugarcane and eucalyptus. **Pest Management Science**, Oxford, v. 74, n. 5, p. 1197-1205, 2018.
- OBOJSKA, A.; LEJCZAK, B.; KUBRAK, M. Degradation of phosphonates by streptomycete isolates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 51, n. 6, p. 872-876, 1999.
- OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; SCHMIDT, J. M.; SETZER, W. N.; WALKER, T. M.; SILIFAT, J. T.; OLALEYE, O. N.; ABOABA, S. A. In Vitro Cytotoxicity Activitie of Essential Oils of *Eucalyptus Torreliana* F. v. Muell (Leaves and Fruits). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Abingdon, v. 8, n. 2, p. 110-119, 2005.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. V. 3, p. 417-453.
- PATIL, V. U.; GIRIMALLA, V.; SAGAR, V.; CHAUHAN, R. S.; CHAKRABARTI, S. K. Genome sequencing of four strains of Phylotype I, II and IV of *Ralstonia*

solanacearum that cause potato bacterial wilt in India. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 48, p. 193-195, 2017.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 156, n. 1, p. 61-66, 2008.

PICCOLO, A.; CELANO, G.; PIETRAMELLARA, G. Adsorption of the herbicide glyphosate on a metal-humic acid complex. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 123, p. 77-82, 1992.

PIPKER, R.; AMRHEIN, N. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 5, p. 1293-1296, 1988.

PONGPANICH, K. Eucalyptus pathology in Thailand. *Eucalyptus* disease and their management. Kasetsart University Bangkok. **ACIAR**, v. 9441, p. 6-8, 2000.

PRATA, F. **Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina**. 2002. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11140/tde-05022003-111013/publico/fabio.pdf>. Acesso em: 07 jan. 2021.

PRZEMIENIECKI, S. W.; KUROWSKI, T. P.; DAMSZEL, M. M.; KARWOWSKA, A.; ADAMIAK, E. Effect of roundup 360 sl on survival of *Pseudomonas* sp. SP0113 strain and effective control of phytopathogens. **Journal Agricultural Science and Technogy**, Tehran, v. 19, p. 1417-1427, 2018.

RAN, L. X.; LIU, C. Y.; WU, G. J.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 32, n. 1, p. 111-120, 2005.

RATCLIFF, A. W.; BUSSE, M. D.; SHESTAK, C. J. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 34, n. 2-3, p. 114-124, 2006.

ROCKWOOD, D. L.; NAIDU, C. V.; CARTER, D. R.; RAHMANI, M.; SPRIGGS, T.; LIN, C.; ALKER, G. A.; ISEBRANDS, J. G.; SEGREST, S. A. Short-rotation woody crops and phytoremediation: opportunities for agroforestry?. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 61/62, p. 51-63, 2004.

ROCKWOOD, D. L.; RUDIE, A. W.; RALPH, S. A.; ZHU, J. Y.; WINANDY, J. E. Energy product options for *Eucalyptus* species grown as short rotation woody crops. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 9, n. 8, p. 1361-1378, 2008.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 3. ed. Londrina: IAPAR, 1995. 696 p.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. C. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: IAPAR, 2005. 591 p.

ROSE, M. T.; CAVAGNARO, T. R.; SCANLAN, C. A.; ROSE, T. J.; VANCOV, T.; KIMBER, S.; KENNEDY, I. S.; KOOKANA, R. S.; VAN ZWIETEN, L. Impact of herbicides on soil biology and function. **Advances in Agronomy**, Madison, v. 136, p. 133-220, 2016.

SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; FEGAN, M.; SLY, L.; KAPPLER, U. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 64, n. Pt_9, p. 3087-3103, 2014.

SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: pathways to modern diseases. **Entropy**, Basel, v. 15, n. 4, p. 1416-1463, 2013.

SANTIAGO, T. R.; GRABOWSKI, C.; MIZUBUTI, E. S. G. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on *Eucalyptus* sp. in Paraguay. **New Disease Reports**, Reading, v. 29, n. 2, 2014.

SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil**: identificação e controle. Colombo: Embrapa Florestas, 2001. Circular Técnica (INFOTECA-E), 2001. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/15739/1/circ-tec45.pdf>. Acesso em: 07 jan. 2021.

SHARMA, S. D.; SINGH, M. Environmental factors affecting absorption and bio-efficacy of glyphosate in Florida beggarweed (*Desmodium tortuosum*). **Crop Protection**, Amsterdam, v. 20, n. 6, p. 511-516, 2001.

SHINABARGER, D. L.; BRAYMER, H. D. Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG2982. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 168, n. 2, p. 702-707, 1986.

SILVA, F. C. E.; SHVALEVA, A.; MAROCO, J. P.; ALMEIDA, M. H.; CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S. Responses to water stress in two *Eucalyptus globulus* clones differing in drought tolerance. **Tree Physiology**, Oxford, v. 24, n. 10, p. 1165-1172, 2004.

SILVA, V.; MONTANARELLA, L.; JONES, A.; FERNÁNDEZ-UGALDE, O.; MOL, H. G.; RITSEMA, C. J.; GEISSEN, V. Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 621, p. 1352-1359, 2018.

SMITH, E. F. A bacterial disease of the tomato, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.). **US Dept. Agric. Div. Veg. Phys. Path. Bull.**, v. 12, p. 1-26, 1896.

SON, L. T.; HAI, T. M.; LINH, D. T. Electrochemical Generation of Hydrogen Peroxide for Fenton Process for Glyphosate Herbicide Treatment. **VNU Journal of Science: Earth and Environmental Sciences**, Lisle, v. 33, n. 4, p. 1-8, 2017.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 10, n. 1, p. 18, 2011.

STRUGER, J.; VAN STEMPOORT, D. R.; BROWN, S. J. Sources of aminomethylphosphonic acid (AMPA) in urban and rural catchments in Ontario, Canada: glyphosate or phosphonates in wastewater? **Environmental Pollution**, Oxford, v. 204, p. 289-297, 2015.

SUDO, S.; OLIVEIRA, G. H. N.; PEREIRA, A. C. Eucalipto (*Eucalyptus sp.*) e bracinga (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* EF Smith. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 8, n. 3, p. 631, 1983.

SUN, L.; KONG, D.; GU, W.; GUO, X.; TAO, W.; SHAN, Z.; WANG Y.; WANG, N. Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1502, p. 8-13, 2017.

SUN, M.; LI, H.; JAISI, D. P. Degradation of glyphosate and bioavailability of phosphorus derived from glyphosate in a soil-water system. **Water Research**, Oxford, v. 163, p. 114840, 2019.

SVIRIDOV, A. V.; SHUSHKOVA, T. V.; ERMAKOVA, I. T.; IVANOVA, E. V.; EPIKTETOV, D. O.; LEONTIEVSKY, A. A. Microbial degradation of glyphosate herbicides. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, v. 51, n. 2, p. 188-195, 2015.

TOURNIER, V.; GRAT, S.; MARQUE, C.; EL KAYAL, W.; PENCHEL, R.; ANDRADE, G.; BOUDET, A. M.; TEULIERES, C. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*). **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 12, n. 4, p. 403-411, 2003.

UMESHA, S. Note: Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 68-71, 2006.

VALENTE, T. C. T. **Expressão gênica e atividade de catalase e fenilalanina amônia liase ativadas por indutores de resistência em cafeeiro**. 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012. Disponível em: http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/6765/Dissertacao_Thais%20Caina%20Teixeira%20Valente.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 9 nov. 2021.

VASSE, J.; FREY, P.; TRIGALET, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 8, n. 2, p. 241-251, 1995.

VARELLA, C. A. A. **Análise de componentes principais**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008. Disponível em: <https://portal.ufrj.br/>. Acesso em: 09 nov. 2021.

VITAL, M. H. F. Impacto ambiental de florestas de eucalipto. **Revista do BNDES**. v. 14, 235–276, 2007.

VEIGA, F.; ZAPATTA, J. M.; MARCOS, F.; ALVAREZ, E. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. **The Science of the Total Environment**, Orlando, v. 271, n.1-3, p.135-144, 2001.

VOMERO P. A. S. Z. **Intensidade de doenças fúngicas e bacterianas em diferentes etapas da produção de mudas de eucalipto em um viveiro clonal**. 2018. Tese (Doutorado em Ciência Florestal).- Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/180714>. Acesso em: 07 jan. 2021.

WAIMAN, C. V.; AVENA, M. J.; REGAZZONI, A. E.; ZANINI, G. P. A real time in situ ATR-FTIR spectroscopic study of glyphosate desorption from goethite as induced by phosphate adsorption: Effect of surface coverage. **Journal of Colloid and Interface Science**, Philadelphia, v. 394, p. 485-489, 2013.

WANG, Y.; ARNOLD, R.; LI, G.; XIE, Y.; ZHOU, X. Identification and rapid detection of bacterial wilt in plantation *Eucalyptus* in China. **Australian Forestry**, Melbourne, v. 77, n. 2, p. 133-139, 2014.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 122, n. 1, p. 21-28, 1990.

WICKER, E.; GRASSART, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D., GUILBAUD, C.; FEGAN, M.; PRIOR, P. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 21, p. 6790-6801, 2007.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Columbia, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Richmond, v. 39, n. 11, p. 897-904, 1995.

ZABALOY, M. C.; GÓMEZ, M. A. Microbial respiration in soils of the argentine pampas after metsulfuron methyl, 2, 4-D, and glyphosate treatments. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 39, n. 3-4, p. 370-385, 2008.

ZHANG, W.; FENGA, Y.; MA, L.; AN, J.; ZHANG, H.; CAO, M.; ZHU, H.; KANG, W.; LIAN, K. Degradation dynamics of glyphosate in different types of citrus orchard soils in China. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 1, p. 1161-1175, 2015.