

CAROLINA DESTRO DE ANGELIS

**CARACTERIZAÇÃO DE *Erwinia psidii* E AVALIAÇÃO DE PRODUTOS
NATURAIS PARA O CONTROLE NA CULTURA DO EUCALIPTO**

Botucatu

2025

CAROLINA DESTRO DE ANGELIS

**CARACTERIZAÇÃO DE *Erwinia psidii* E AVALIAÇÃO DE PRODUTOS
NATURAIS PARA O CONTROLE NA CULTURA DO EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Ciência Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Botucatu

2025

A582c Angelis, Carolina Destro de
Caracterização de Erwinia psidii e avaliação de produtos
naturais para o controle na cultura do eucalipto / Carolina
Destro de Angelis. -- Botucatu, 2025
89 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientador: Edson Luiz Furtado

1. Seca de ponteiros. 2. Fitopatologia. 3. Doenças Eucalipto.
4. Produtos Naturais. 5. Concentração Mínima Inibitória. I.
Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título:

CARACTERIZAÇÃO DE *Erwinia psidii* E AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS PARA O CONTROLE NA CULTURA DO EUCALIPTO

AUTORA: CAROLINA DESTRO DE ANGELIS

ORIENTADOR: EDSON LUIZ FURTADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência Florestal,
pela Comissão Examinadora:



Professor Doutor EDSON LUIZ FURTADO (Participação Presencial)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas - Unesp Botucatu



Pesquisadora Dr.^a CLARISSA HAMAIO OKINO DELGADO (Participação Virtual)
Pesquisa e Desenvolvimento / IkoVe Agro Bioinsumos Agrícolas Ltda.



Dr.^a VANESSA RAFAELA DE CARVALHO (Participação Presencial)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas

Botucatu, 13 de agosto de 2025.

*Às que são luz nos meus caminhos e abrigo nas
minhas tempestades — meu esposo, meus pais, meu
irmão e meus avós — dedico esta conquista, regada
por lágrimas, fé e amor. Cada página deste trabalho
carrega um pedaço do que sou, porque em cada um de
vocêis encontrei força, propósito e direção.*

AGRADECIMENTOS

Nenhuma trajetória se constrói sozinha. Este trabalho é o reflexo de muitas mãos estendidas, olhares atentos e corações generosos que me sustentaram ao longo do caminho.

À Deus, aos orixás e aos espíritos benfeitores — presentes nas encruzilhadas da vida, na intuição que guia, na força que sustenta e na fé que acalma. Agradeço pelas bênçãos silenciosas, pelos caminhos abertos e pela proteção constante ao longo desta jornada.

Ao meu esposo, Luís Thadeo, minha presença constante e meu refúgio. Obrigada por segurar minha mão com firmeza nos dias bons e com ternura nos dias difíceis. Sua fé em mim, mesmo nas minhas incertezas, foi a âncora que me manteve firme.

Aos meus pais, Maria Alcione e Marcos Roberto, por me ensinarem que o conhecimento transforma e que a força de vontade pode mover montanhas. Vocês são meu exemplo diário de coragem, ética e amor incondicional.

Ao meu irmão, João Pedro, com quem compartilho não só o sangue, mas também a admiração e o carinho sinceros. Sua alegria e incentivo me impulsionaram mais do que você imagina.

Aos meus avós, Neuza, Antônia e Osvaldo, presentes em cada lembrança, cada valor e cada gesto que carrego. Ao meu avô João, que partiu quando eu ainda era criança, deixo a certeza de que seu legado permanece vivo em mim. Suas histórias, orações e afetos são parte da minha identidade e desta conquista.

Aos meus amigos, que souberam acolher meu silêncio quando foi preciso e que celebraram comigo cada pequena vitória. Obrigada por entenderem minha ausência e me oferecerem leveza e apoio quando mais precisei.

Ao meu orientador, Edson Luiz Furtado, pela escuta atenta, pelas provocações necessárias e pela confiança no meu potencial. Sua orientação foi essencial para que este trabalho ganhasse forma, profundidade e sentido.

Aos colegas de pesquisa, da UNESP de Botucatu pela troca de ideias, pela parceria nos desafios diários e por construirmos juntos um espaço de aprendizado, amizade e crescimento.

À Ikove Agro, por acreditar no meu potencial e oferecer o suporte necessário para a continuidade e conclusão desta pesquisa. Sou profundamente grata pela confiança, pelo incentivo e pela oportunidade de integrar ciência e propósito em um ambiente tão acolhedor e inspirador.

In memoriam de àqueles que partiram antes de ver este sonho realizado, mas que permanecem vivos em mim — na saudade, nos ensinamentos e no amor que nunca se apaga.

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

A todos vocês, meu mais sincero e eterno agradecimento. Esta vitória é nossa.

“Um livro, uma caneta, uma criança e um professor podem mudar o mundo.”

- *Malala Yousafzai*

RESUMO

O gênero *Eucalyptus* possui como ponto de origem à Austrália e outras ilhas oceânicas, há aproximadamente 730 espécies catalogadas, das quais apenas 20 são utilizadas para fins comerciais em todo o mundo. No ano de 2023, segundo o Relatório do IBÁ, haviam 10 milhões de hectares de florestas plantadas no Brasil, sendo 76% correspondente a área ocupada por eucalipto. Com essa expansão contínua, a incidência de doenças também aumentou significativamente nas plantações. Atualmente, devido à alta demanda por mudas, os ambientes de cultivo relatam diversas bacterioses, favorecidas pela elevada umidade e temperatura no local de propagação. Dentre as doenças bacterianas que afetam o eucalipto, destaca-se a seca de ponteiros, causada pela *Erwinia psidii*. Essa enfermidade caracteriza-se pela seca progressiva dos ramos das mudas e árvores de eucalipto, evoluindo no sentido ápice-base. Para evitar o desenvolvimento de doenças bacterianas, defensivos sintéticos como casugamicina e o Bion® (acibenzolar-S-metil, Syngenta, Basel Suíça) vem sendo utilizados no manejo, mas apesar de eficazes, esses produtos têm desvantagens, como eficácia limitada, destruição da microbiota benéfica, contaminação do solo e indução de resistência em patógenos. Assim produtos naturais vem se consolidando como alternativa sustentável, com destaque para os óleos essenciais com propriedades antifúngicas, bactericidas e inseticidas. O presente estudo buscou avaliar a eficácia do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, óleo de nim, por meio de testes de microdiluição em caldo e reações de sensibilidade por disco de difusão, além de investigar a possível resistência da bactéria ao sulfato de cobre. Para isso, foram caracterizadas cepas de *E. psidii* isoladas de plantas sintomáticas de seca de ponteiros por técnicas moleculares, utilizando *primers* específicos e sequenciamento da região 16S. Entre os métodos de manejo já descritos, o presente estudo destaca a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de *E. psidii* na utilização de produtos naturais como uma alternativa eficaz para o controle do fitopatógeno causador da seca de ponteiros em eucalipto. Os resultados obtidos ressaltam o potencial do óleo de eucalipto com efeito bactericida no controle de *E. psidii* e a importância da introdução de produtos naturais nos métodos de manejo para o controle de doenças em eucalipto, reduzindo a exposição com produtos químicos e minimizando o impacto ambiental.

Palavras-chave: *Erwinia psidii*; seca de ponteiros; produtos naturais; manejo; concentração inibitória mínima.

ABSTRACT

The genus *Eucalyptus* originates from Australia and other oceanic islands, with approximately 730 cataloged species, of which only about 20 are commercially exploited worldwide. In 2023, according to the IBÁ Report, Brazil had 10 million hectares of planted forests, with 76% of this area occupied by *Eucalyptus*. With this continuous expansion, the incidence of diseases has also significantly increased in plantations. Currently, due to the high demand for seedlings, cultivation environments frequently report bacterial diseases, favored by elevated humidity and temperature during propagation. Among the main bacterial diseases affecting *Eucalyptus*, tip blight caused by *Erwinia psidii* stands out. This disease is characterized by the progressive drying of shoots in seedlings and mature trees, advancing from the apex to the base. To prevent the development of bacterial diseases, synthetic pesticides such as casugamycin and Bion® (acibenzolar-S-methyl, Syngenta, Basel, Switzerland) have been used in management practices. However, despite their effectiveness, these products present drawbacks, including limited efficacy, disruption of beneficial microbiota, soil contamination, and induction of pathogen resistance. As a result, natural products are emerging as sustainable alternatives, with essential oils gaining attention for their antifungal, bactericidal, and insecticidal properties. The present study aimed to evaluate the efficacy of *Eucalyptus globulus* essential oil and neem oil through broth microdilution and disk diffusion sensitivity assays, as well as to investigate the potential resistance of *E. psidii* to copper sulfate. For this purpose, *E. psidii* strains were isolated from symptomatic plants showing tip blight and characterized using molecular techniques with specific primers and 16S rRNA sequencing. Among the management strategies described, this study emphasizes the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *E. psidii* using natural products as an effective alternative for controlling the pathogen responsible for tip blight in eucalyptus. The results highlight the bactericidal potential of eucalyptus oil in controlling *E. psidii* and underscore the importance of incorporating natural products into disease management strategies in eucalyptus, thereby reducing reliance on chemical products and minimizing environmental impact.

Keywords: *Erwinia psidii*; dieback; natural products; management; minimum inhibitory concentration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1 – Identificação bioquímica e molecular de *Erwinia psidii* em *Eucalyptus* spp.

- Figura 1 - Sintoma característico da doença de Seca de Ponteiros causada por *Erwinia psidii* em mudas de *Eucalyptus* spp. encontrada em viveiros parceiros.....40
- Figura 2 - Sintomatologia característica da seca de ponteiros em folhas e caules, podendo ser observado a exsudação de pus bacteriano e uma representação no microscópio de varredura da formação de biofilme bacteriano ocasionando a obstrução do xilema.....41
- Figura 3 - Demonstração da inoculação da *E. psidii* em folha de goiabeira destacada.....46
- Figura 4 - Ensaio de inoculação de *Erwinia psidii* em folha destacada de *Eucalyptus urophylla* AEC144 para fechamento do postulado de Koch.....51
- Figura 5 - Esquema sobre a restrição da gama de hospedeiro de uma determinada bactéria com ação de proteínas efetores do tipo III52
- Figura 6 - *Primer* Ep2R e Ep2F amplificados dos isolados e bandas de 200 pb visualizadas em gel de agarose por meio da eletroforese.....52

Capítulo 2 – Efeito dos testes de microdiluição em caldo e sensibilidade por disco de difusão com óleos essenciais e extrato de própolis em *Erwinia psidii*.

- Figura 1 - Exemplificação de como acontece a redução da Resazurina para Resorufina.....64
- Figura 2 – Exemplificação resultado microdiluição em caldo com a aplicação da resazurina.....64
- Figura 3 – Concentração Inibitória Mínima (CIM/ppm) de supressão do crescimento de *Erwinia psidii* em óleo de *Eucalyptus globulus* utilizado em comparação ao Sulfato de Cobre como controle positivo67
- Figura 4 – Concentração Inibitória Mínima (CIM/ppm) de supressão do crescimento de *Erwinia psidii* em óleo de Nim utilizado em comparação ao Sulfato de Cobre como controle positivo.....68
- Figura 5 – Concentração Inibitória Mínima (CIM/ppm) de supressão do crescimento de *Erwinia psidii* em extrato de própolis utilizado em comparação ao Sulfato de Cobre como controle positivo.....69
- Figura 6 – Placas NA estriadas a partir da microdiluição em caldo para verificação da ação bacteriostática e bactericida dos produtos testados70

Figura 7 - Formação de halos no teste de disco de difusão com óleo de eucalipto, nim, extrato de própolis e sulfato de cobre.....	76
--	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 – Identificação bioquímica e molecular de *Erwinia psidii* em *Eucalyptus* spp.

Tabela 1 - *Primer* específico e universal, gene alvo e pares de bases utilizados para identificação da *Erwinia psidii*.....48

Tabela 2 – Resultado obtidos com identificação morfológica, teste de Gram, teste de Ryu, teste de catalase e hipersensibilidade em folhas de fumo.....50

Tabela 3 – Resultado sequenciamento *Sanger* das cepas de *Erwinia psidii* causando seca de ponteiros em *Eucalyptus urophylla* AEC144 identificados com acesso ao *Genbank*.....53

Tabela 4 – Resultado sequenciamento *Sanger* das cepas não patogênicas ao *Eucalyptus urophylla* AEC144 identificados com acesso ao *Genbank*.....54

Capítulo 2 – Efeito do teste de microdiluição em calda e teste de sensibilidade por disco de difusão com óleos essenciais e extrato em *Erwinia psidii*.

Tabela 1 – Grau de inibição bacteriana ao óleo ou extrato de acordo com o tamanho do halo em mm.....66

Tabela 2 – Grau de inibição da atividade de crescimento de *Erwinia psidii* pelo óleo de eucalipto.....72

Tabela 3 – Grau de inibição da atividade de crescimento de *Erwinia psidii* pelo óleo de nim.....73

Tabela 4 – Grau de inibição da atividade de crescimento de *Erwinia psidii* pelo extrato de própolis.....74

Tabela 5 – Grau de inibição da atividade de crescimento de *Erwinia psidii* pelo Sulfato de cobre.....75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRAF	Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
C.I.M.	Concentração Mínima Inibitória
CO ₂	Dióxido de Carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FCA	Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP
ha	Hectare
HR	Hipersensibilidade
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
KOH	Hidróxido de potássio
LPS	Lipopolissacarídeos
mm	Milímetros
m ³ /ha/ano	Metros quadrados/hectare/ano
NA	Ágar nutriente
NaCl	Cloreto de sódio
PCR	Polimerase chain reaction
pv.	Patovar
O ₂	Oxigênio
RNA	Ácido ribonucleico
SP	São Paulo
sp.	Espécie
spp.	Espécies
Taq	Taq polimerase
TBE	Tampão Tris-borato-EDTA

T3E	Proteína efetora
UFC	Unidades formadoras de colônia
UNESP	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
mL	Mililitros
ng/μL	Nanogramas por microlitro
nm	Nanomol
°C	Graus célsius
pH	Potencial hidrogeniônico
pm/L	Picomol por litro
μg/ml	Microgramas por mililitro
μL	Microlitros
mm	Milímetros
ppm	Parte por milhão
pb	Pares de bases
nm	Nanometros
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	25
CAPÍTULO 1 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE <i>Erwinia psidii</i> EM <i>Eucalyptus</i> spp.....	37
RESUMO.....	37
1.1 INTRODUÇÃO.....	38
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	56
CAPÍTULO 2 – EFEITO DO TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO E TESTE DE SENSIBILIDADE POR DISCO DE DIFUSÃO COM PROUTOS NATURAIS EM <i>Erwinia psidii</i>.....	58
RESUMO.....	58
2.1 INTRODUÇÃO.....	59
2.2 REVISÃO SOBRE O MANEJO COM PRODUTOS NATURAIS NO SETOR DA AGRICULTURA E FLORESTAL.....	61
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
REFERÊNCIAS.....	85

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Eucalyptus*, nativo da Austrália, pertence à família *Myrtaceae* e compreende mais de 700 espécies já catalogadas, incluindo diversas variedades. O início de seu cultivo no Brasil ocorreu em 1904, com o objetivo de suprir a demanda por lenha para caldeiras de locomotivas (Longue Júnior; Colodette, 2013). As espécies lenhosas, são amplamente utilizada nos setores de papel e celulose, energia e produtos à base de madeira. No Brasil, o eucalipto se destaca em relação ao *Pinus* spp. e a teca, especialmente na região Sudeste, onde sua utilização se torna relevante devido à alta produtividade desse insumo (Longue Júnior; Colodette, 2013). Segundo a Indústria Brasileira de Árvores (2023), o Brasil ganha espaço no mercado devido à sua alta produtividade, alcançando uma média de 33,7 m³/ha/ano, além da curta rotação do plantio, que varia entre cinco e sete anos.

As áreas de plantio de florestas de eucalipto apresentam crescimento exponencial, sendo a região Sudeste concentrando 44% da área plantada no país. Destacam-se os estados de Minas Gerais, com 2.200.351 ha, Mato Grosso do Sul, com 1.329.132 ha e São Paulo, com 997.543 ha (Ibá, 2023). Dados mais recentes, apresentados pela empresa Canopy (2024), indicam que, em 2023, a área ocupada por florestas plantadas no Brasil atingiu 10,3 milhões de hectares, sendo o eucalipto responsável por 76,1% desse total (7.541.725 ha).

Devido à rápida expansão das plantações de eucalipto e à incorporação de novas áreas para cultivo, diversos fatores ambientais, como temperatura elevada, alta umidade e precipitações frequentes, características do clima tropical, tornam-se determinantes para a proliferação de fitopatógenos (Alfenas *et al.*, 2004). Atualmente, o cultivo de eucalipto é afetado por diversos fungos e bactérias fitopatogênicas, principalmente em mudas e plantas jovens. No entanto, fitopatógenos agressivos podem acometer plantas adultas, especialmente quando estas se encontram debilitadas (Moraes *et al.*, 2014). Assim, diversos fatores podem influenciar negativamente as plantações, afetando tanto a qualidade da madeira quanto a produção de mudas.

O surgimento de doenças que afetam o eucalipto tem sido amplamente documentado, sendo muitas delas resultantes da expansão do cultivo e possivelmente nativas dos países onde a planta ocorre naturalmente (Truman, 1974).

Arriel *et al.* (2014) relataram que a incidência de patógenos fúngicos na cultura do eucalipto tem sido documentada desde a década de 1970. Já as doenças causadas por bactérias fitopatogênicas foram identificadas a partir da década de 1980 (Sudo *et al.*, 1983). A seca de ponteiros, causada por *Erwinia psidii*, foi relatada pela primeira vez em 2009 como uma doença recorrente em plantações de eucalipto no Brasil. Entretanto, apenas em 2011 Coutinho *et al.* confirmaram a identificação da bactéria e sua associação com a seca de ponteiros.

Em função da expansão da cultura do eucalipto no Brasil, é crescente a necessidade de monitorar a sanidade das plantas cultivadas. A introdução de novos patógenos, devido à exploração de novos ambientes, é um risco inevitável, uma vez que, processos de expansão agrícola ou florestal resultam em desmatamento alteram ecossistemas naturais e ocorre desregulações o que se tornam fatores para o aparecimento de microrganismos fitopatogênicos que podem causar prejuízos significativos e imprevisíveis às culturas (Almeida, 2001).

Além dos patógenos, bactérias endofíticas (não causam doenças) também estão presentes em todas as espécies vegetais, colonizando tecidos ou em estado de latência. Normalmente, essas bactérias produzem substâncias benéficas para a planta (De Melo, 2021).

As bactérias fitopatogênicas são classificadas como parasitas facultativos, sendo capazes de sobreviver fora da planta hospedeira. No entanto, ao acessarem a planta, iniciam o processo de patogênese, penetrando em regiões específicas e proliferando-se, levando ao aparecimento de sintomas (Reis; Olivares, 2006).

Para que uma bactéria fitopatogênica cause efeitos negativos em uma planta suscetível, ela precisa colonizar órgãos vegetais, como folhas, caules ou raízes. Isso ocorre principalmente por meio de aberturas naturais, como estômatos e hidatódios, que servem como porta de entrada para infecções. As bactérias

saprofíticas e fitopatogênicas podem alcançar o limbo foliar através do vento, da chuva, do contato entre copas ou da irrigação. Se estiverem próximas a aberturas naturais, podem se multiplicar e penetrar nos espaços intercelulares. Além disso, podem se deslocar em gotículas de água presentes no limbo foliar, facilitando a colonização (Kaku, 2004; Reis; Olivares, 2006).

Lesões no caule e na folhagem também podem atuar como porta de entrada para fitopatógenos, sendo exemplos disso o uso de ferramentas de poda não higienizadas, chuvas intensas, ventos e o manuseio inadequado das mudas. Quando a colonização bacteriana atinge os espaços intercelulares do mesófilo, ocorre a ação de enzimas degradativas como pectinases, celulasas, xilanases, proteases e lipases, que comprometem a integridade da membrana plasmática, resultando em alterações metabólicas e, conseqüentemente, na morte celular (Collmer; Keen, 1986; Brett; Waldron, 1996; Annis; Goodwin, 1997; Ghozlan *et al.*, 2020).

A bactéria *Erwinia psidii* foi descrita pela primeira vez em 1987 por Rodrigues Neto *et al.*, causando sintomas severos e levando à morte de goiabeiras (*Psidium guajava*). Os sintomas observados incluíam infecção de ramos e galhos, levando à obstrução dos tecidos vasculares e, posteriormente, à seca e morte da planta (Rodrigues Neto *et al.*, 1987). Segundo Teixeira *et al.* (2009), *E. psidii* já era considerada um dos patógenos mais importantes da cultura da goiabeira e possivelmente sofreu uma mudança de hospedeiro. Em 2011, pela primeira vez, houve a confirmação da presença dessa bactéria causando seca de ponteiros em eucaliptos nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul (Arriel *et al.*, 2014; Coutinho *et al.*, 2011).

O agente causador da seca de ponteiros tem sido identificado em eucaliptos com até dois anos de idade, período em que a planta jovem apresenta grande quantidade de tecido vegetal em expansão (Arriel *et al.*, 2014; Coutinho *et al.*, 2011). Nos estágios mais avançados da doença, outros fitopatógenos saprófitos também podem se aproveitar da debilitação da planta, agravando ainda mais os danos (Coutinho *et al.*, 2011; Costa, 2021).

Entre 2010 e 2016, na região Sul do Brasil, registrou-se a perda de aproximadamente 314 hectares de eucalipto devido à seca de ponteiros em níveis de média e alta severidade, o que resultou na redução significativa no crescimento em altura e circunferência das árvores (Furtado; Silva, 2023).

O gênero *Erwinia* pertence à família *Enterobacteriaceae* e suas espécies são caracterizadas por bacilos retos, gram-negativos, anaeróbios facultativos e com flagelos peritríquios (Mariano *et al.*, 2005). As espécies desse gênero são divididas em três principais grupos: *E. amylovora* (não causadoras de podridão mole), *E. herbícola* (bactérias amareladas) e *E. carotovora* (causadoras de podridão mole). A *Erwinia psidii*, patógeno em questão, pertence ao grupo *amylovora* e, portanto, não produz enzimas pectinolíticas responsáveis pela podridão mole do tecido vegetal (Mariano *et al.*, 2005).

O controle alternativo de fitopatógenos tem se destacado como uma estratégia de reduzir a dependência de defensivos agrícolas químicos convencionais e minimizar impactos ambientais (Fontes; Valadares-Inglis, 2020). Entre as alternativas disponíveis, destacam-se o uso de biocontroles, como bactérias e fungos antagonistas, óleos essenciais, extratos e indutores de resistência (Compant *et al.*, 2005; Walters *et al.*, 2013).

Diante da importância da doença de seca de ponteiros, surge a necessidade de avaliar o uso de produtos naturais como uma alternativa de manejo integrado de doenças, por meio de testes "*in vitro*". Estratégias alternativas, quando associadas ao programa de manejo, podem contribuir significativamente para a manutenção da produtividade florestal (Romanazzi *et al.*, 2016).

O presente estudo teve como objetivo geral identificar os fitopatógenos associados à seca de ponteiros em eucalipto e avaliar alternativas de controle com produtos naturais. Para isso, buscou-se: Identificar, por meio de testes bioquímicos e moleculares, os fitopatógenos envolvidos; Confirmar a ação patogênica bacteriana pelo Postulado de Koch; Analisar a ação bactericida e/ou bacteriostática de produtos naturais (óleo de eucalipto, óleo de nim e extrato de própolis) sobre *Erwinia psidii*; Investigar, em testes "*in vitro*", o potencial de

produtos naturais no controle de *E. psidii* como alternativa de manejo; Avaliar a possível resistência de *E. psidii* ao sulfato de cobre.

REVISÃO DE LITERATURA

GÊNERO *Eucalyptus*, IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E UTILIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS NO SETOR FLORESTAL

O *Eucalyptus* sp. tem sua origem na Austrália, Tasmânia e outras ilhas da Oceania. Até o ano de 2014, foram classificadas 730 espécies, das quais apenas 20 possuem utilização comercial em todo o mundo, se destacando quanto a adaptação em ambiente tropicais e subtropicais, alta qualidade da madeira, maior resiliência ou capacidade de ser melhorada geneticamente e tempo curto de rotação variando de 6 a 8 anos para corte (Wingfield *et al.*, 2008; Booth, 2013). Relatos indicam que os primeiros exemplares foram plantados entre os anos de 1825 e 1868 no Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Os primeiros estudos com a espécie no Brasil tiveram início em 1904, conduzidos por Edmundo Navarro de Andrade, em Rio Claro, São Paulo. No entanto, a expansão significativa das áreas reflorestadas ocorreu apenas a partir de 1966.

Atualmente, a eucaliptocultura está concentrada, principalmente, nos estados de Minas Gerais (24,5%), São Paulo (16,6%) e Mato Grosso do Sul (15,4%) (Consufor, 2018). Dentro da composição das áreas de florestas plantadas no Brasil, o eucalipto se destaca como a espécie predominante, representando 76,1% do total (Canopy, 2024).

Quanto um panorama econômico, a cadeia produtiva florestal representa 0,9% do PIB brasileiro, sendo o Brasil o principal exportador de celulose do mundo arrecadando 7,9 bilhões de dólares no ano de 2023 (IBA, 2023).

A cultura do eucalipto apresenta uma ampla diversidade de pragas, incluindo fungos e bactérias que provocam reduções diretas na produtividade (Alfenas, 2009). Entre essas doenças, destaca-se a seca de ponteiros, cuja incidência tem avançado de forma significativa em plantios de clones altamente suscetíveis, especialmente durante o verão, quando as condições climáticas de

temperatura elevada e alta umidade favorecem o desenvolvimento bacteriano, podendo afetar até 100% das mudas (Coutinho *et al.*, 2011; Arriel *et al.*, 2014).

De acordo com a análise realizada por Ramos (2020), a severidade da seca de ponteiros foi mais elevada no período de novembro a abril, coincidindo com a predominância de altas temperaturas e umidade relativa do ar. O estudo ainda evidenciou que a doença, causada por *Erwinia psidii*, resultou em uma redução de 5,3% no volume de madeira dos talhões plantados, o que corresponde a uma perda aproximada de 32.055 m³ de madeira, representando um impacto econômico expressivo para o setor florestal (Ramos, 2020).

Os produtos de origem natural destinados ao controle de pragas e doenças agrícolas e florestais foram amplamente utilizados até a metade do século XIX, atuando como inseticidas e fungicidas. No entanto, com o desenvolvimento da Segunda Guerra Mundial, grandes áreas dedicadas ao cultivo desses defensivos naturais foram dizimadas, resultando em uma superprodução de defensivos sintéticos (Morais, 2009).

No século XVII, um dos primeiros registros do uso de biopesticidas agrícolas ocorreu no controle de besouros da ameixeira, por meio da aplicação de extratos vegetais nicotina (BPIA, 2017). Já no início do século XX, com a expansão institucional da pesquisa agrícola, intensificaram-se os estudos sobre agentes biológicos de controle, destacando-se a bactéria *Bacillus thuringiensis*, considerada o primeiro pesticida microbiana e ainda amplamente utilizada na atualidade (UC ANR, 2018).

O avanço da pesquisa acadêmica e industrial voltada ao desenvolvimento de produtos naturais ocorreu, sobretudo, em resposta aos elevados custos e aos impactos ambientais associados ao uso excessivo de defensivos sintéticos. Como resultados, desde a década de 1990 observa-se um crescimento contínuo no desenvolvimento e registro de novos bioinsumos, consolidando esse setor como alternativa viável e sustentável para o manejo agrícola (UC ANR, 2018).

Entre os principais aspectos negativos do uso de defensivos sintéticos, destacam-se a incapacidade de garantir o controle prolongado de pragas e fitopatógenos, a eliminação de organismos benéficos ao ambiente, a seleção e o

desenvolvimento de populações resistentes, impactos na saúde humana, contaminação ambiental, impacto de papéis outros ecossistêmicos, desequilíbrio ecológico, além de diversos outros impactos ambientais e agrônômicos adversos (Mariconi, 1981; Bass *et al.*, 2014).

Diante dessas problemáticas, a partir da década de 1970, tornou-se evidente a necessidade de resgatar e aprimorar o uso de substâncias naturais. Esse movimento impulsionou avanços significativos na busca por práticas agrícolas mais sustentáveis (Morais, 2009).

CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO *Erwinia*

A primeira espécie do gênero *Erwinia* foi descrita inicialmente por Burrill, em 1880, sob o nome de *Micrococcus amylovorus*. Em 1920, Winslow *et al.* reclassificaram o gênero como *Erwinia*, sendo *Erwinia amylovora* a espécie-tipo. Com o avanço das técnicas moleculares, em 1998, Hauben *et al.* realizaram a amplificação e o sequenciamento completo da região 16S de 29 cepas. Com isso, foi possível organizar as espécies que compunham o gênero, permanecendo apenas as verdadeiras *Erwinia* sp., como *E. amylovora*, *E. maliotivora*, *E. persicinus*, *E. psidii*, *E. rhapontici* e *E. tracheiphila*.

A espécie *Erwinia psidii* foi descrita em 1987 por Rodrigues Neto, Robbs e Yamachiro em goiabeiras no estado de São Paulo (Rodrigues Neto, 1987). Atualmente, essa bactéria possui grande relevância devido às significativas perdas de produtividade na cultura da goiaba no Brasil (Coelho *et al.*, 2002).

E. psidii é o agente causal da murcha e da seca de ponteiros do eucalipto (Coutinho *et al.*, 2011; Arriel *et al.*, 2014). Pertence ao filo *Pseudomonadota*, à classe *Gammaproteobacteria*, à ordem *Enterobacterales* e à família *Erwiniaceae* (BacDive, 2025). O primeiro relato de sua ocorrência em *Eucalyptus* spp. ocorreu no município de Lençóis Paulista, estado de São Paulo, em 2009. Posteriormente, o mesmo fitopatógeno foi identificado nos estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul (Arriel *et al.*, 2014).

O gênero *Erwinia* compreende um grupo de bactérias caracterizadas morfológicamente como bastonetes Gram-negativos, podendo ser encontradas isoladamente, em pares ou em cadeias (Caires, 2017).

Quanto à sua caracterização bioquímica, *E. psidii* é uma bactéria anaeróbia facultativa, dotada de flagelos peritríquios e incapaz de formar esporos. Esse microrganismo infecta órgãos foliares do eucalipto, além de acometer o sistema lenhoso (Caires, 2017).

Em goiabeiras, *E. psidii* causa um sintoma característico denominado seca de ponteiros, levando à morte do hospedeiro pela progressão da necrose da extremidade para a base da planta (Rodrigues Neto, 1987). Inicialmente, esse fitopatógeno apresentava incidência restrita à goiabeira. No entanto, em 2011, *E. psidii* foi identificada como o principal agente causal da seca de ponteiros em *Eucalyptus* spp. no Uruguai por Coutinho *et al.* (2011). Posteriormente, Arriel *et al.* (2014) confirmaram sua presença no Brasil. Atualmente, a infecção de *Eucalyptus* spp. por *Erwinia psidii* tem sido relatada com frequência considerável.

Em relação às perdas causadas pela seca de ponteiros, Borges Júnior (2017) relatou que, entre os anos de 2010 e 2016, a região Sul do Brasil registrou uma perda de 314 hectares de plantios de eucalipto, com incidência variando entre média e alta severidade. Além disso, *E. psidii* pode estar associada a outras bactérias fitopatogênicas, como *Pseudomonas cichorii*, *Xanthomonas campestris* e *Xanthomonas axonopodis*, atuando como agente causal da mancha bacteriana.

Com o aumento dos casos de bacterioses afetando a eucaliptocultura, e considerando que as abordagens fenotípicas e bioquímicas que ainda são amplamente utilizadas para a identificação de gêneros bacterianos, é fundamental destacar que, atualmente, existem metodologias alternativas que complementam essas abordagens. Tais metodologias permitem a identificação não apenas do gênero, mas também das espécies bacterianas e fúngicas, oferecendo uma forma mais assertiva para o manejo e tratamento de doenças que acometem as culturas.

Quanto à diferenciação genética em relação a outras espécies do gênero *Erwinia*, o estudo de Hemenergildo (2015) demonstrou que, após coletas realizadas em diferentes regiões do Brasil, as variações genéticas entre os

isolados de *E. psidii* foram mínimas, indicando elevada similaridade entre eles. De forma consistente, Teixeira *et al.* (2009) observaram que isolados de *E. psidii* provenientes de goiabeira em distintas localidades brasileiras também apresentaram resultados semelhantes. Esses achados sugerem que a infecção de *E. psidii* em eucalipto pode estar associada a um processo de adaptação recente do patógeno à cultura (Hemenergildo, 2015).

SINTOMATOLOGIA DA SECA DE PONTEIROS

Caires *et al.* (2020) ressaltaram que *Erwinia psidii* coloniza vasos do xilema, produz biofilme e é capaz de realizar sua translocação tanto acropetal quanto basipetal pelo caule. Os autores também destacam que a bactéria possui propriedades que permitem a colonização de células do esclerênquima, parênquima e xilema de caules e folhas. No entanto, é importante destacar que não há relatos de sua presença em vasos do floema.

Quando o fitopatógeno é inoculado em sistema radicular, pesquisas demonstram que *E. psidii* consegue penetrar e colonizar raízes primárias e secundárias, atingindo assim o xilema. Contudo, a bactéria não se movimenta em direção ao ápice caulinar (Montoya-Estrada *et al.*, 2019).

A infecção por *E. psidii* acomete principalmente a copa das árvores, apresentando como principais sintomas a ocorrência de lesões nas inserções de galhos com a haste terminal e nos pontos de inserção de ramos e pecíolos foliares. Com o tempo, as lesões podem evoluir para anelações, causando a morte ou a seca a partir do órgão afetado (Krugner; Auer, 1997).

Estudos também demonstraram que a infecção pelo patógeno está relacionada a diversos impactos fisiológicos na planta, como a redução significativa da taxa de assimilação de CO₂, da taxa de transpiração e do rendimento fotossintético. Além disso, observa-se alteração na abertura e fechamento dos estômatos, além de outros déficits morfológicos em comparação com plantas sadias (Caires, 2017). A infecção compromete a fisiologia

fotossintética da planta, resultando em baixos rendimentos na produção, bem como na qualidade da madeira e da celulose.

A incidência da doença depende da idade da planta, do ano e da localização do plantio. A seca de ponteiros apresenta maior severidade entre o verão e o outono, períodos em que a umidade e a temperatura estão elevadas. Em viveiros onde as minicepas e mudas encontram-se adensadas e há grande acúmulo de matéria orgânica no solo, a ocorrência da doença pode aumentar exponencialmente (Krugner; Auer, 1997).

MANEJO DA SECA DE PONTEIROS EM *Eucalyptus* spp.

Além dos plantios de *Eucalyptus* spp., a cultura de goiabeiras também sofre os efeitos da doença da seca de ponteiros causada por *E. psidii*. Uma das principais medidas adotadas para o controle da doença é a poda e queima dos ramos doentes (Marques *et al.*, 2007). No entanto, na eucaliptocultura, essas medidas são consideradas inviáveis devido ao porte das árvores e às grandes extensões de plantio. Diante desse cenário, a seleção de clones resistentes tem se tornado uma estratégia válida para o manejo da doença (Ferraz *et al.*, 2016). Contudo, *E. psidii* tem se mostrado persistente a diversas espécies de *Corymbia* e *Eucalyptus* (Caires *et al.*, 2019).

Em um estudo de Lanna-Filho *et al.* (2021), foi reportado que o fitopatógeno consegue sobreviver de maneira epífita e saprofítica em restos de folhas de eucalipto por até 90 dias, e de 5 a 15 dias no solo.

Quanto ao período de sobrevivência de *E. psidii* em eucaliptos, Costa (2021) relata que, quando o fitopatógeno é inoculado em gemas axilares apicais das mudas, ele se associa a infecções nas folhas após um período de 30 a 60 dias. Já quando *E. psidii* é inoculada nos ramos laterais e caules, os sintomas são observados entre 30 e 150 dias. O mesmo ocorre com a inoculação em raízes, onde a bactéria atinge os tecidos radiculares, e os sinais de bacteriose podem ser identificados entre 60 a 180 dias após a inoculação.

No caso de minicepas (sistemas de brotação de eucalipto), Costa (2021) destaca que, em um período de 4 anos, raízes e caules apresentam sintomas de bacterioses associadas à presença de *E. psidii*. Esses efeitos incluem tanto minicepas e mudas suscetíveis quanto resistentes.

Atualmente, os métodos de manejo em casas de vegetação englobam o descarte de plantas doentes e a poda de ramos com sinais de bacterioses. Entre as formas de prevenção da doença, é importante ressaltar as seguintes práticas: evitar a introdução de mudas doentes; realizar a higienização dos materiais de poda com hipoclorito de sódio à 3% e álcool 70%; efetuar a limpeza das bandejas onde as mudas são armazenadas; evitar e controlar o acúmulo de restos de matéria orgânica no solo, entre as mudas e talhões; revisar o sistema de irrigação por aspersão, que é o principal meio de disseminação da bacteriose; e controlar a temperatura e umidade dos ambientes (Coelho *et al.*, 2002). Outra estratégia adicional para tentar evitar o surgimento da doença é o uso do melhoramento genético com clones tolerantes à infecção (Krugner; Auer, 1997).

O campo da fitopatologia bacteriana ainda apresenta pontos que necessitam de melhorias, especialmente no que se refere ao manejo. Atualmente, não existem métodos químicos seguros e eficazes para evitar perdas significativas em plantações acometidas por bacterioses (Mondal; Shanmugam, 2013; Santos, 2020).

Considerando a escassez de estudos que avaliem o uso de produtos alternativos no manejo de fitopatógenos bacterianos, o presente estudo teve com objetivos isolar e identificar, por meio de testes bioquímicos convencionais e análises moleculares, as bactérias associadas à seca de ponteiros em eucalipto, bem como avaliar seu potencial patogênico por inoculação em folhas saudáveis, permitindo a confirmação direta da relação causa-sintoma. A utilização de métodos moleculares representa uma vantagem significativa, pois possibilita maior sensibilidade e precisão na identificação dos fitopatógenos, enquanto o teste de patogenicidade assegura a validação biológica da infecção. Além disso foram conduzidos ensaios “in vitro” utilizando a Concentração Inibitória Mínima (C.I.M.) e o teste de sensibilidade por disco de difusão com produtos naturais, a

fim de verificar o potencial de controle de *Erwinia psidii*, agente causal da seca de ponteiros em eucalipto.

CAPÍTULO 1

IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE *Erwinia psidii* em *Eucalyptus* spp.

Carolina. D. de Angelis; Luís T.P. Silva; Lucas A. Benso; Vanessa R. de Carvalho; Bruno C. Rossini; Edson L. Furtado.

RESUMO

O setor da eucaliptocultura no Brasil apresenta crescimento exponencial e, paralelamente, a emergência de novos fitopatógenos tem comprometido o desempenho produtivo e impactado o mercado global. No contexto brasileiro, o clima tropical e úmido favorece a ocorrência de doenças bacterianas, tornando fundamental o avanço em pesquisas voltadas para a identificação desses agentes. Entre as enfermidades de maior relevância, destaca-se a seca de ponteiros, causada por *Erwinia psidii*, cuja incidência tem aumentado de forma preocupante em viveiros e áreas de cultivo. Diante disso, torna-se indispensável o uso de técnicas inovadoras e precisas para a identificação do fitopatógeno, permitindo a aplicação de estratégias de manejo mais eficazes. Este capítulo teve como objetivo avaliar a precisão e confiabilidade dos testes bioquímicos tradicionalmente utilizados na identificação bacteriana em comparação com metodologias moleculares, empregando primers específicos para *E. psidii* associados a primers universais 16S, seguidos de sequenciamento Sanger. Além disso, ensaios de patogenicidade evidenciam que as cepas isoladas de eucalipto não foram capazes de reproduzir sintomas em folhas de goiabeira, hospedeiro original da bactéria. Os resultados demonstram que, embora a triagem os testes bioquímicos sejam limitados, eles foram fundamentais para direcionar a triagem das cepas, possibilitando uma identificação mais precisa dos fitopatógenos de interesse.

Palavras-chave: *Erwinia psidii*; seca de ponteiros; teste patogenicidade; postulado de Koch.

1.1 INTRODUÇÃO

O crescimento da eucaliptocultura nos últimos anos não se limitou ao Brasil. O mercado internacional, que reúne os principais produtores de celulose, também registrou um amplo crescimento. Segundo dados da Indústria Brasileira de Árvores (IBA), entre os anos de 2013 e 2023, as áreas destinadas às florestas plantadas no Brasil apresentaram um crescimento de 41% (IBA, 2023), e a expansão de novas áreas faz com que doenças bacterianas se tornem um problema real e significativo. O clima tropical do Brasil é um fator que deve ser considerado ao discutir as doenças fitopatogênicas e seu avanço. Devido às altas temperaturas e à elevada umidade presentes no país, esses fatores facilitam a proliferação de microrganismos, agravando doenças e facilitando a disseminação em determinadas culturas (Walker; Patel, 1964).

No caso da cultura do eucalipto, diversas doenças podem se tornar recorrentes, como a seca de ponteiros em eucalipto, causada pela fitobactéria *Erwinia psidii*, pode resultar em efeitos graves e até à morte da planta quando a doença se encontra em estágio avançado. Segundo Caires (2017), a seca de ponteiros é uma doença recentemente descrita, e os estudos sobre o fitopatógeno ainda fornecem poucas elucidações em relação às medidas de controle. Quando o hospedeiro da bactéria é o eucalipto, a colonização ocorre principalmente nos vasos do xilema, no sentido acropetal. Outros efeitos negativos que podem ser evidenciados no hospedeiro incluem a colonização de espaços intercelulares e tecidos do parênquima. Nesses espaços e tecidos, as células bacterianas formam agregados devido à produção de biofilme, o que determina a agressividade da doença (Caires, 2017).

Para que a fitobactéria seja identificada de forma correta e um diagnóstico assertivo seja fornecido ao produtor, métodos envolvendo testes bioquímicos simples associados com técnicas moleculares podem ser usados, com diferentes níveis de confiabilidade. Quanto aos testes bioquímicos comumente utilizados, várias metodologias são rápidas e de fácil aplicação como o teste de Gram, catalase, e Ryu. Contudo, há uma dificuldade em obter um resultado preciso quanto ao nível de gênero e espécie. Outros métodos, que utilizam tecnologias de

genética molecular, complementam os testes bioquímicos, proporcionando maior confiabilidade e um diagnóstico mais assertivo.

O teste de coloração de Gram, descrito em 1884, tem como objetivo classificar as bactérias em dois grandes grupos, com base na diferença na composição da camada de lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa dos microrganismos. As bactérias do grupo Gram-positivas possuem uma camada espessa de LPS e espaços intersticiais maiores, enquanto as Gram-negativas apresentam uma camada delgada de LPS e espaços intersticiais menores. A coloração de Gram consiste na aplicação de cristal violeta, lugol, lavagem com álcool e aplicação de safranina. Quando o esfregaço bacteriano fixado em lâmina é exposto ao cristal violeta, o corante adere a todas as estruturas da célula bacteriana, colorindo-a de roxo. Com a aplicação do lugol, ocorre a formação do complexo cristal violeta-lugol, chamado de iodopararosanilina, que atua como fixador do corante nas estruturas celulares. Após esse processo, é realizada a lavagem com álcool 70%. Durante essa lavagem, as células Gram-negativas perdem a coloração do cristal violeta, enquanto as células Gram-positivas mantêm a coloração roxa, devido à camada espessa de LPS e poros menores. Após a lavagem, é aplicada a safranina, um corante que colora as células Gram-negativas de rosa a avermelhado (Marigoni, 2010; Ministério da Saúde, 2001). Sendo possível identificar a *Erwinia* spp. como Gram-negativa (Pereira, 2019).

O teste de Ryu ou Gram de Ryu explora a espessura da camada de LPS da membrana celular. Quando a célula bacteriana Gram-negativa entra em contato com uma solução de KOH 3%, a camada delgada de LPS se rompe, causando o extravasamento do conteúdo celular. Esse processo resulta na formação de um fio viscoso, que indica uma reação positiva para o teste de Ryu (Marigoni, 2010; Powers, 1995). Como *Erwinia psidii* é uma bactéria do grupo das Gram-negativas, o teste de Ryu será positivo, ou seja, haverá a formação do fio viscoso (Teixeira, 2009).

O teste de enzima catalase é utilizado para a identificação e classificação de bactérias. Consiste em expor a colônia bacteriana sobre uma gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%. Se a colônia produzir a enzima catalase, será possível observar a liberação de oxigênio, pois a catalase, ao entrar em contato com o

H₂O₂, catalisa a quebra do peróxido, formando água (H₂O) e oxigênio (O₂) (Jorgensen, 2015). *Erwinia psidii* é caracterizada como catalase positiva (Maringoni, 2010; Teixeira *et al.*, 2009).

As cepas bacterianas foram isoladas com o objetivo de identificar o principal patógeno associado à seca de ponteiros em eucalipto, *Erwinia psidii*. Para a triagem inicial, empregaram-se testes bioquímicos simples e acessíveis, que permitem descartar isolados que não apresentam características compatíveis com o gênero *Erwinia*. Essa abordagem sequencial possibilita uma filtragem preliminar eficiente, direcionando apenas os isolados compatíveis para análises mais específicas com a utilização de *primers* específicos (*Ep_2L* e *Ep_2R*) e generalista (*16S*). Considerando que métodos moleculares apresentam maior custo (Aparecido; Rosa, 2019), mas elevada assertividade, as cepas previamente selecionadas foram submetidas à análise molecular, seguida de sequenciamento pelo método Sanger.

Este capítulo também apresenta o teste de patogenicidade em folhas destacadas de eucalipto, empregado para confirmar a capacidade das cepas isoladas de reproduzir os sintomas característicos da doença, consolidando a identificação do agente causal. De forma complementar, foi realizado o teste de inoculação em folhas destacadas de goiabeira, com o intuito de verificar a capacidade do isolado proveniente de eucalipto em induzir sintomas também nessa espécie, ampliando a compreensão sobre seletividade de gama de hospedeiros do patógeno.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 OBTENÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS

As mudas de *Eucalyptus* spp. coletadas para a construção do banco de isolados da presente pesquisa foram obtidas a partir de viveiros localizados nos municípios de Botucatu e Bofete, ambos no estado de São Paulo. Para cada muda analisada, foram observados sintomas de seca de ponteiros e manchas foliares localizadas na região do nervo central foliar (Figura 1).

Figura 1 – Sintoma característico da doença de Seca de Ponteiros causada por *Erwinia psidii* em mudas de *Eucalyptus* spp. encontrada em viveiros parceiros



Fonte: Carolina Destro de Angelis - 2025

As mudas coletadas foram acondicionadas em sacos de papel ou plásticos com o objetivo de manter a umidade. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas e processadas em um período de até 24 horas, sendo mantidas a uma temperatura aproximada de 5°C no Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo da Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp de Botucatu.

Com o intuito de estabelecer uma colaboração entre a Faculdade de Ciências Agronômicas e o Instituto Biológico, localizado em Campinas – SP, a Professora Doutora Suzete Aparecida Lanza Destéfano, responsável pela Coleção de Culturas de Fitobactérias, cedeu uma cepa de *Erwinia psidii*. Esta cepa foi utilizada no estudo como controle positivo.

1.2.2 CONSTRUÇÃO DO BANCO DE DADOS BACTERIOLÓGICO

Após a coleta das mudas, as amostras enviadas ao laboratório foram submetidas a uma triagem minuciosa. As mudas que apresentavam sintomas

evidentes de seca de ponteiros ou murcha passaram por uma secção do caule. O corte anatômico foi então dividido ao meio, com o objetivo de isolar apenas a região do xilema escurecido, onde o sintoma causado por *Erwinia psidii* pode ser identificado mais facilmente. Para as folhas que apresentavam sintomas característicos de mancha ou necrose na região da nervura central, também foi realizada a secção da área afetada e posterior isolamento (Figura 2).

Figura 2 – Sintomatologia característica da seca de ponteiros em folhas e caules, podendo ser observado a exsudação de pus bacteriano e uma representação no microscópio de varredura da formação de biofilme bacteriano ocasionando a obstrução do xilema



Fonte: (Arriel *et al.*, 2014; Caires *et al.*, 2019)

Após a triagem, as regiões lesionadas coletadas passaram pelo processo de desinfecção. A metodologia envolveu a imersão dos órgãos foliares selecionados em álcool 70% por 1 minuto, seguida de imersão em hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos e lavagem com água destilada estéril por 1 minuto. Após o procedimento, as partes desinfetadas foram dispostas em papel de filtro autoclavado para secagem. O objetivo desse procedimento de desinfecção é garantir que as bactérias saprófitas presentes no limbo foliar ou na superfície do caule não cresçam no meio de cultivo Nutriente Ágar, permitindo que apenas as bactérias de interesse, localizadas nos espaços intracelulares de cada tecido, sobrevivam.

Concluída a desinfecção dos órgãos lesionados, o material foi macerado em água destilada para que as bactérias fitopatogênicas presentes nos espaços intracelulares ficassem em suspensão. A suspensão bacteriana foi inoculada em placas de Petri contendo meio de cultivo NA, por meio de estria de isolamento. As placas foram incubadas por 24 a 48 horas a 28°C.

Com o crescimento bacteriano evidenciado, as colônias bacterianas de coloração branco-cremoso com bordas regulares de superfície lisa foram selecionadas para identificação. Para a preservação das cepas bacterianas de *E. psidii*, foi realizada criopreservação em microtubos contendo 500µL de glicerol 30% autoclavado. Todas as suspensões foram armazenadas a -20°C.

1.2.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ISOLADOS BACTERIANOS

1.2.3.1 TESTE DE COLORAÇÃO DE GRAM

O teste de coloração de Gram foi realizada segundo o protocolo descrito por Gram (1884), com adaptações. As bactérias isoladas foram cultivadas em meio ágar nutriente, a 28°C por 24 horas. Um esfregaço bacteriano foi preparado em lâmina de vidro, fixado por calo e submetido à sequência de reagente: Cristal violeta (1 minuto), solução de lugol (1 minuto), lavagem com álcool 95% e coloração com safranina (30 segundos). As lâminas foram lavadas com água destilada, secas ao ar e observadas em microscópio óptico. O resultado foi registrado conforme a coloração obtida: roxo/azul (Gram-positivo) ou rosa/vermelho (Gram-negativo) (Marigoni, 2010; Ministério da Saúde, 2001).

O gênero *Erwinia* spp. é composto por bactérias Gram-negativas. Assim, todas as estirpes bacterianas coletadas neste estudo foram submetidas ao teste de Gram, sendo selecionadas aquelas que apresentaram coloração rosa/vermelha (Pereira, 2019).

1.2.3.2 TESTE DE HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO (KOH) OU GRAM DE RYU

O teste de Ryu, foi um método alternativo utilizado para confirmar o resultado do teste de Gram. Um esfregaço de colônia bacteriana é submetido a uma suspensão de KOH a 3% e homogeneizada com uma alça bacteriana. De uma forma qualitativa, a formação de fios viscosos indicou reação positiva, característica de bactérias Gram-negativas, enquanto a ausência de viscosidade foi interpretada como resultado para Gram-positivas (Maringoni, 2010; Powers, 1995). Como *Erwinia psidii* é uma bactéria do grupo das Gram-negativas, o teste de Ryu será positivo, ou seja, haverá a formação do fio viscoso (Teixeira, 2009).

1.2.3.3 TESTE DE PRODUÇÃO DA ENZIMA CATALASE

Foi realizado teste qualitativo de atividade de enzima catalase, para isso uma amostra de cada isolado foi exposta a 1 gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%, o resultado foi considerado positivo quando houve reação de formação de bolhas (Jorgensen, 2015). A confirmação da atividade de catalase corrobora a identificação como *Erwinia* spp. e a negativa elimina o isolado (Maringoni, 2010; Teixeira *et al.*, 2009).

1.2.4 TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE EM FOLHAS DE FUMO (*Nicotiana tabacum*)

O teste de hipersensibilidade consiste na inoculação de uma suspensão bacteriana em uma folha de uma planta modelo não hospedeira da doença. Para esse procedimento, as folhas de *Nicotiana tabacum* são comumente usadas, por ser uma planta modelo amplamente empregada. No presente estudo, foram preparadas suspensões bacterianas puras na concentração de 3×10^8 UFC, conforme a escala de McFarland. Utilizando uma seringa hipodérmica, 1mL da suspensão foi aplicada entre os espaços internervais, e o período de 24 horas foi aguardado para o surgimento dos sintomas. Se uma lesão se formar, isso ocorre devido à ação da bactéria nos tecidos do hospedeiro, com a morte das células no local da inoculação após esse período (Romeiro, 2005). Caso a lesão seja observada após o tempo esperado, a hipersensibilidade é considerada positiva. O

teste aplicado tem como objetivo identificar se a bactéria isolada é fitopatogênica, não patogênica ou endofítica/saprofítica. Quando *E. psidii* é inoculada em *Nicotiana tabacum*, o fitopatógeno não provoca reação de hipersensibilidade (Silva, 2019).

1.2.5 TESTE DE PATOGENICIDADE DE *Erwinia psidii* EM FOLHAS DE *Eucalyptus urophylla*

A confirmação da patogenicidade dos isolados foi realizada conforme os postulados de Koch (1876). Para reproduzir os sintomas observados em campo, as cepas bacterianas foram inoculadas em folhas sadias de eucalipto, em um procedimento conhecido como teste de patogenicidade. Para preparar o material, as folhas foram submetidas à assepsia com álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos, seguidas de lavagem com água destilada autoclavada por 1 minuto e secagem em papel de filtro autoclavado.

Após a assepsia do limbo foliar, foi preparada uma solução bacteriana com uma concentração padronizada, de acordo com a escala Nefelométrica de McFarland, a 3×10^8 UFC. Após o preparo da suspensão em água autoclavada, 500 µL da solução foram aplicados com o auxílio de uma seringa de 1 mL e agulha de insulina, pelo método de injeção direta na base do caule e na nervura central da folha. As folhas de eucalipto foram destacadas com bisturi esterilizado e mantidas em placas de Petri autoclavadas, com algodão umedecido em água esterilizada (adaptado de Fonseca *et al.*, 2016 e Santos, 2020).

As amostras foram incubadas à 26°C e avaliadas após 168 horas da inoculação quanto a presença de sintomas característicos da doença. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram sintomas característicos de necrose na região da nervura central da folha. As amostras positivas foram encaminhadas para estudo de reisolamento para confirmação e fechamento do Postulado de Koch (Koch, 1876).

1.2.6 TESTE DE PATOGENICIDADE DE *Erwinia psidii* EM FOLHA DE GOIABEIRA

Após o isolamento da *Erwinia psidii* de mudas de eucalipto com efeitos negativos, a cepa foi submetida a inoculação por meio do método de picada em folhas de goiabeira, com o objetivo de evidenciar os sintomas de seca de ponteiros. Isso se deve ao fato de que o patógeno em questão não possui um patovar específico para eucaliptos.

As folhas de goiabeira foram coletadas com materiais devidamente higienizados e passaram por um processo de assepsia, que incluiu imersão em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio por 30 segundos e lavagem com água destilada autoclavada por 1 minuto. Em seguida, as folhas foram secas em papel de filtro autoclavado, com o procedimento sendo realizado em fluxo laminar.

Para a aplicação do fitopatógeno nas folhas de goiabeira, a cultura de *E. psidii* foi cultivada em meio NA. Utilizando agulhas de insulina, foram feitas picadas espaçadas no limbo foliar, depositando a cultura bacteriana nos ferimentos. Após as picadas, gotas de suspensão bacteriana (3×10^8 UFC, conforme a escala Nefelométrica de McFarland) foram aplicadas nos locais das lesões (Figura 3). O objetivo foi criar um ambiente favorável para que o patógeno pudesse penetrar adequadamente no limbo foliar.

Todas as folhas foram mantidas em placas de Petri autoclavadas com algodão umedecido com água destilada autoclavada, para garantir a umidade do ambiente, incubadas a 26°C e o acompanhamento dos sintomas foi realizado durante um período de duas semanas (adaptado de Fonseca *et al.*, 2016 e Santos, 2020).

Figura 3 – Demonstração da inoculação da *E. psidii* em folha de goiabeira destacada



Foto: Carolina Destro de Angelis – 2025

1.2.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

1.2.7.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR PRIMERS ESPECÍFICOS E UNIVERSAIS

Além das técnicas bioquímicas utilizadas, a biologia molecular constitui uma ferramenta essencial para o diagnóstico preciso de doenças em plantas. No presente estudo, a identificação fitopatogênica não se restringiu às características fenotípicas e bioquímicas, uma vez que essas abordagens apresentam limitações quanto à especificidade. A utilização de marcadores moleculares, por meio de *primers* direcionados a regiões conservadas do DNA bacteriano, permitiu confirmar de forma mais assertiva a identidade dos isolados, possibilitando a distinção em nível de espécie. Dessa forma, os teste moleculares tiveram como objetivo complementar a triagem inicial, fornecendo maior precisão na identificação de *Erwinia psidii* e reduzindo o risco de equívocos diagnósticos.

Das 49 cepas isoladas a partir de plantas de eucalipto com sintomas de seca de ponteiros, 16 apresentaram características fenotípicas e bioquímicas compatíveis com o gênero *Erwinia*. No entanto, apenas 6 cepas demonstraram patogenicidade ao eucalipto, confirmada pelo postulado de Koch. Todas as cepas foram preservadas no Laboratório de Microbiologia e Patologia Florestal da

FCA/UNESP, em Botucatu – SP e mantidas em meio NA a 28 °C, em estufa BOD, por 48 horas, antes de serem submetidas à caracterização molecular.

1.2.7.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a realização da extração, foi utilizado o protocolo padrão com adaptações do kit *Trans Direct Plant Tissue PCR Kit – Transgen Biotech Co.* Inicialmente, preparou-se uma suspensão bacteriana com 200 µL de água purificada, dos quais 50 µL foram utilizados em uma centrífuga para a formação do *pellet*, a 10.000 rpm por 5 minutos. Com o *pellet* formado, retirou-se o sobrenadante e adicionaram-se 40 µL do *Buffer* PD1. A amostra foi então colocada em banho seco a 95 °C por 15 minutos. Após esse período, adicionaram-se 40 µL do *Buffer* PD2 para finalizar o processo de extração.

1.2.7.3 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA

Para confirmar a concentração de DNA, a quantificação do produto genético foi realizada por meio do espectrofotômetro *Nanodrop*, da *Thermo Scientific*. Para isso, utilizou-se 1 µL de DNA, e o aparelho realizou a leitura. A concentração de ácidos nucleicos foi calculada automaticamente, com base nos valores de absorbância medidos a 260 nm, conforme o manual do fabricante.

1.2.7.4 AMPLIFICAÇÃO POR PCR

Após a finalização da extração, foi preparado o mix de reação, contendo 12,5 µL de *Taq DNA polimerase* do kit *Trans Direct Plant Tissue PCR Kit – Transgen Biotech Co.*, 0,4 µL de *primer* reverso (R), 0,4 µL de *primer* direto (F), 4 µL de DNA extraído e 7,7 µL de H₂O livre de *nuclease*. A quantidade do mix foi ajustada de acordo com o número de amostras. Os *primers* utilizados para a identificação do fitopatógeno foram *recA* e 16S para sequenciamento.

Os pares de *primers* escolhidos para o presente estudo foram específicos para *E. psidii*, sendo *Ep2L* (5' CCA AAA AGC TTG GTG TGG AT 3') e *Ep2R* (5' CAT GTG CGA GTC ACC AAT TT 3') (Silva *et al.*, 2015), com o produto de amplificação esperado de aproximadamente 200 pb. A amplificação foi realizada em termociclador *Applied Biosystems*, modelo *Veriti*, com o seguinte ciclo padronizado: 95 °C por 3 minutos para desnaturação inicial, seguido de 32 ciclos de 94 °C por 1 minuto para desnaturação, 64 °C por 1 minuto e 30 segundos para amplificação, e 72 °C por 2 minutos para alongação, finalizando em 72 °C por 5 minutos para alongação final e permanecendo em 16 °C para finalização (Silva *et al.*, 2015).

Além disso, foi utilizado um par de *primers* 16S, sendo *16S_F* (5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA CCT TA 3') e *16S_R* (5' CGG TGT GTA CAA CGC CCG GGA ACG 3') (Halsey, 2012) para amplificação da região V6 do rDNA conservada entre os gêneros bacterianos. O produto da amplificação com o *primer* universal foi submetido ao sequenciamento das regiões específicas do gene codificante do RNA funcional da subunidade 16S. O ciclo para esta amplificação foi padronizado em 95 °C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 40 segundos, 72 °C por 40 segundos, e finalizando em 72 °C por 5 minutos. A concentração do *primer* foi de 10 pm/L.

O produto da amplificação por PCR foi analisado em gel de agarose 1% com TBE 1%, acrescido de 1 µL de *Gel Red Unisafe da Uniscience*. O resultado foi visualizado utilizando o sistema *GE Healthcare Life Science, ImageQuant LAS 500*.

Tabela 1 – *Primer* específico e universal, gene alvo e pares de bases utilizados para identificação da *Erwinia psidii*

<i>Primers</i>	Gene alvo	Pares de base	Referência
<i>Ep_2L</i>	Região conservada entre a espécie <i>E. psidii</i>	200 pb	Silva <i>et al.</i> (2015)
<i>Ep_2R</i>			
<i>16S_F</i>	Região conservada entre os gêneros bacterianos	410 pb	Halsey (2012)
<i>16S_R</i>			

Fonte: Carolina Destro de Angelis (2025).

1.2.7.5 PURIFICAÇÃO POR BEADS MAGNÉTICAS E SEQUENCIAMENTO SANGER DAS AMOSTRAS

Após a conclusão da amplificação, as amostras do produto da PCR com o *primer* 16S foram utilizadas para realizar o sequenciamento, devido à região amplificada ser conhecida e suficientemente grande para possibilitar a diferenciação de gênero. Todas as amostras que amplificaram com o *primer* 16S foram submetidas à purificação do DNA por meio de *beads* magnéticas. As amostras foram dispostas em placas de 96 poços, contendo o dobro do volume de *beads* magnéticas. A homogeneização foi realizada por 10 vezes com a pipeta, e as amostras foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, a placa de poços foi colocada em um suporte magnético para que as *beads* magnéticas se aderissem ao DNA. Ao encaixar a placa no suporte magnético, as *beads* ficaram presas em um dos lados da placa.

Em seguida, o líquido foi removido da placa sem retirar o suporte magnético, preservando o *pellet* formado pelas *beads* e pelo DNA. A seguir, 180µL de etanol 70% foram adicionados a cada poço com amostra, com o objetivo de remover qualquer impureza residual. O álcool foi retirado com o auxílio de uma pipeta, e esse processo foi repetido duas vezes para garantir a remoção completa do etanol.

Após a lavagem, a placa foi retirada do suporte magnético e 40 µL de água livre de nucleases foram adicionados para soltar as *beads* do DNA. Para remover as *beads*, a placa foi colocada novamente no suporte magnético e, após a separação, a solução restante (DNA + água) foi transferida para um novo microtubo.

A etapa seguinte foi a quantificação do DNA usando o *Thermo Nanodrop 1000 Spectrophotometer*. Todas as amostras foram observadas na faixa de 260 a 280nm, com uma relação de absorbância entre 1 e 2, indicando pureza adequada. Além disso, as concentrações das amostras precisavam estar entre 10-20 ng/µL.

Ao final do procedimento, as amostras foram enviadas para sequenciamento *Sanger* no Instituto de Biotecnologia da Unesp de Botucatu – SP. O processo de sequenciamento consiste na determinação das bases de nucleotídeos em uma região específica do DNA. No caso, o fragmento sequenciado foi o 16S, uma região altamente conservada entre os gêneros bacterianos de interesse.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As coletas realizadas nos municípios de Botucatu e Bofete, ambos no estado de São Paulo, resultaram na formação de um banco de dados contendo um total de 49 amostras bacterianas isoladas, todas associadas ao sintoma de seca de ponteiros em eucaliptos. Todas as 49 amostras passaram por testes bioquímicos clássicos, como o teste de Gram, teste de Ryu, teste de catalase e teste de hipersensibilidade em folhas de *Nicotiana tabacum*. Observou-se que, do total de amostras, apenas 16 estavam associadas às características morfológicas e bioquímicas do gênero *Erwinia*. Os dados podem ser confirmados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultado obtidos com identificação morfológica, teste de Gram, teste de Ryu, teste de catalase e hipersensibilidade em folhas de fumo

Cepas	Morfologia	Gram	Ryu	Catalase	HR em <i>Nicotiana tabacum</i>
C1	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
C2	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
C3	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
C4	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
C5	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
C6	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
C7	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
C8	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
C9	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
C10	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
C11	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
C12	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
C13	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo

C14	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
C15	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
C16	Bacilo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo

Fonte: Carolina Destro de Angelis (2025).

Quanto à inoculação em folhas de eucaliptos destacadas, apenas 6 amostras apresentaram a reprodução de sintomas característicos da seca de ponteiros, iniciando com a necrose da nervura central foliar. Com isso, foi possível observar, após 168 horas, os sintomas característicos da seca de ponteiros causados por *E. psidii*, como o escurecimento da nervura central seguido de necrose em 6 cepas. A execução do teste também permitiu a finalização do Postulado de Koch, que prevê o isolamento e identificação do patógeno, seguido de sua reinoculação no hospedeiro para a reprodução dos sintomas (Figura 4).

Figura 4 – Ensaio de inoculação de *Erwinia psidii* em folha destacada de *Eucalyptu urophylla* AEC144 para fechamento do postulado de Koch

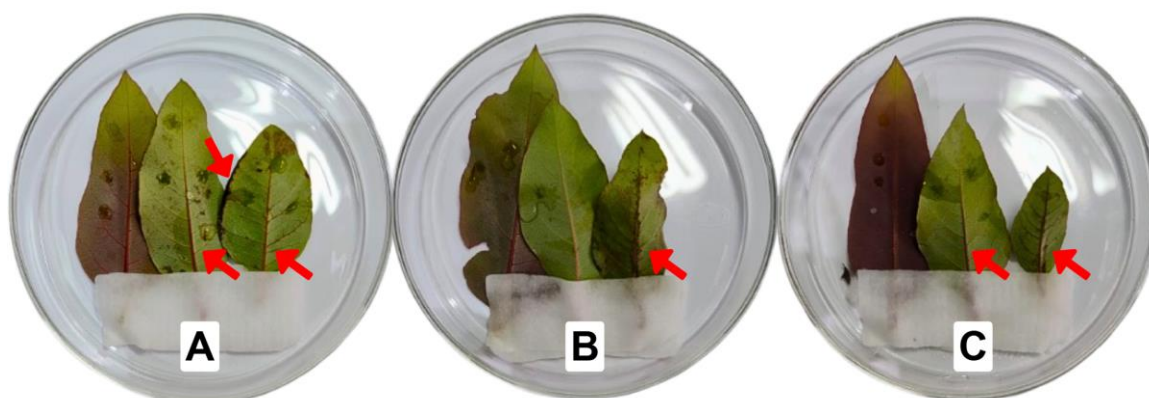
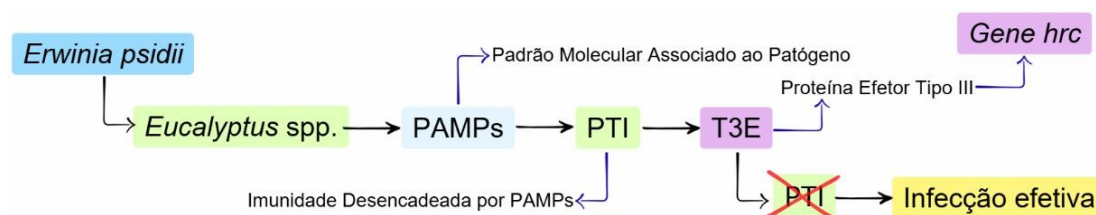


Foto: Carolina Destro de Angelis - 2025

As cepas bacterianas isoladas e inoculadas em folhas de goiabeira não apresentaram reprodução dos sintomas característicos da seca de ponteiros, sugerindo que *Erwinia psidii*, que tem o eucalipto como hospedeiro, não infecta folhas de goiabeira (Figura 4). Isso se deve à especificidade e derivação das cepas patogênicas que acometem a cultura do eucalipto. Segundo Pereira (2019), muitas bactérias patogênicas utilizam mecanismos de patogenicidade, como as proteínas efetoras tipo III (T3E), que deprimem o sistema imunológico do hospedeiro e promovem o desenvolvimento dos sintomas patogênicos (Figura 5). *E. psidii* é um

fitopatógeno que possui o gene *hrc*, responsável pela produção de T3E, permitindo que o patógeno suprima as defesas imunológicas do eucalipto (hospedeiro), mas não consiga reproduzir sintomas em folhas de goiabeira (hospedeiro não relacionado) (Jones; Dangl, 2006; Büttner; Bonas, 2010).

Figura 5 – Esquema sobre a restrição da gama de hospedeiro de uma determinada bactéria com ação de proteínas efetores do tipo III



Fonte: Adaptado de Jones; Dangl (2006); Büttner; Bonas, (2010).

Após a reprodução dos sintomas da doença em eucalipto, as 6 cepas bacterianas foram submetidas a testes moleculares com *primers* específicos (Ep2R e Ep2F), *primers* universais (16S) e sequenciamento *Sanger*. Como resultado, todas as 6 cepas bacterianas confirmaram a identidade de *E. psidii*, corroborando com a identificação e fechando o Postulado de Koch (Figura 5).

Figura 6 – Primer Ep2R e Ep2F amplificados dos isolados e bandas de 200 pb visualizadas em gel de agarose por meio da eletroforese

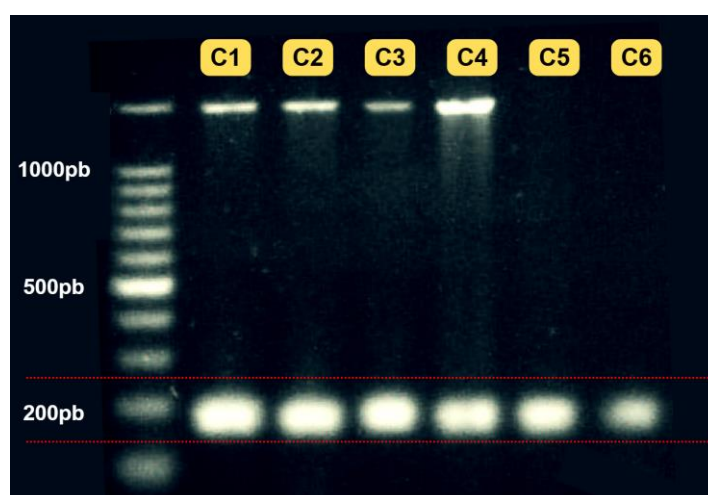


Foto: Carolina Destro de Angelis - 2025

Tabela 3 – Resultado sequenciamento *Sanger* das cepas de *Erwinia psidii* causando seca de ponteiros em *Eucalyptus urophylla* AEC144 identificados com acesso ao *Genbank*

Cepas	Identificação sequenciamento	Acesso <i>Genbank</i>	Cepa referência	País
C1	<i>Erwinia psidii</i>	PX230296	A2	Brasil
C2	<i>Erwinia psidii</i>	PX230121	LMG 7039	Brasil
C3	<i>Erwinia psidii</i>	PX230166	ICMP 8426	Brasil
C4	<i>Erwinia psidii</i>	PX230210	A6	Brasil
C5	<i>Erwinia psidii</i>	PX230209	G4	Brasil
C6	<i>Erwinia psidii</i>	PX232301	LMG 7034	Brasil

Fonte: Carolina Destro de Angelis (2025).

No presente capítulo, foi possível isolar cepas bacterianas associadas à seca de ponteiros em eucalipto, confirmando a presença de diferentes microrganismos na região afetada. Entre os isolados, os teste bioquímicos, morfológicos e moleculares permitiram a identificação de *Erwinia psidii* como principal agente causal da doença, corroborando com relatos anteriores sobre sua ocorrência em plantios de eucalipto no Brasil (Rodrigues Neto, 1987; Arriel *et al.*, 2014; Furtado; Silva *et al.*, 2023).

A utilização de *primers* universais para a região 16S rRNA, em associação com *primers* específicos para *E. psidii*, possibilitou uma identificação mais assertiva em nível de espécie, superando as limitações dos métodos bioquímicos e de observação morfológica. Além disso, a patogenicidade foi confirmada pelo Postulado de Koch, fortalecendo a associação entre os isolados e os sintomas observados em viveiros, o que garante maior robustez no diagnóstico.

De forma complementar, o sequenciamento das demais cepas não patogênicas ao eucalipto revelou a presença de bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Stenotrophomonas* (tabela 4). Esses microrganismos, embora não tenham demonstrado patogenicidade em folhas destacadas de eucalipto, possuem relevância ecológica e fitopatológica, podendo atuar como oportunistas ou estar associados a outras culturas (Ferreira *et al.*, 2008; Palladino *et al.*, 2016).

Tabela 4 – Resultado sequenciamento *Sanger* das cepas não patogênicas ao *Eucalyptus urophylla* AEC144 identificados com acesso ao *Genbank*

Cepa	Identificação sequenciamento	Acesso Genbank	Cepa referência	País
C7	<i>Pantoea</i> spp.	PX227564	MBWS3.(15)	Brasil
C8	<i>Pseudomonas</i> spp.	PX227286	JG10	Brasil
C9	<i>Pseudomonas</i> spp.	PX229486	2013000238	Brasil
C10	<i>Pantoea</i> spp.	PX229460	MBWS16.(15)	Brasil
C11	<i>Pantoea</i> spp.	PX230036	MBWS16.(15)	Brasil
C12	<i>Agrobacterium</i> spp.	PX229475	R8SCh-B12	Brasil
C13	<i>Pseudomonas</i> spp.	PX229996	JG10	Brasil
C14	<i>Pantoea</i> spp.	PX229497	LG-273.2B2	Brasil
C15	<i>Agrobacterium</i> spp.	PX230046	S3D11	Brasil
C16	<i>Stenotrophomonas</i> spp.	PX230059	D2I6	Brasil

Fonte: Carolina Destro de Angelis (2025).

Assim, os objetivos propostos para esse capítulo foram plenamente alcançados fornecendo uma base sólida para uma identificação detalhada das cepas bacterianas associadas à seca de ponteiros em eucalipto. Os procedimentos aplicados mostraram-se eficazes e reprodutíveis, podendo ser adaptados para estudos de outras doenças bacteriana em diferentes culturas florestais e agronômicas.

REFERÊNCIAS

- APARECIDO, C.C.; ROSA, E.C. Avaliação morfológica e molecular para identificação de *Fusarium* spp.. **Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, p.1-7, 2019.
- ARRIEL, D.A.A., *et al.* Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. **Forest Pathology**, v.44, n.4, p.255-265, 2014.
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of Xanthomonas virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, v.34, ed.2, p. 107-133, 2010.
- CAIRES, N. P. **Interação *Erwinia psidii* – *Eucalyptus* spp.: infecção, alterações fisiológicas e fontes de resistência**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.
- CAIRES, N.P.; HERMENEGILDO, O.S.; GUIMARÃES, L.M.S.; MAFIA, R.G.; ZAUZA, E.Â.V.; JÚNIOR, N.B.; BADEL, J.L.; ALFENAS, A.C.. Host range of *Erwinia psidii* and genetic resistance of *Eucalyptus* and *Corymbia* species to this pathogen. **Forest Pathology**, v.49, e.12527, 2019.
- FERREIRA, A., *et al.* Diversidade de bactérias endofíticas em sementes de espécies de *Eucalyptus* e colonização de plântulas por *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiol Lett**, v.287, ed.1, p.8-14, 2008.
- FONSECA, N. R.; OLIVEIRA, L. S. S.; GUIMARÃES, L M. S.; 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**, Brasília, DF, v.41, n.1, p.42-47, 2016.
- FURTADO, E.L.; SILVA, L.T.P. Manejo das doenças de origem bacteriana no eucalipto. **Revista Opniões**, v.20, n.70, p.54-55, 2023.
- HALSEY, J. A. **Diversidade de bactérias associadas aos cogumelos de Mata Atlântica no estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- IBA (Indústria Brasileira de Árvores). **Relatório Anual**, 2024. Disponível em:<<https://iba.org/publicacoes/relatorios-anuais/>> Acesso em: 10 de ago. 2025.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, ed.16, p.323-329, 2006.
- JORGENSEN, J.H., *et al.*. **Manual of Clinical Microbiology**. 11th Ed. ASM Press, Washington, DC, 2015.
- KOCH, R. The etiology of anthrax, based on the life history of *Bacillus anthracis*. **Beiträge zur Biologie der Pflanzen**, v.2, p.277–310, 1876.

MARINGONI, A. C. Técnicas em fitobacteriologia. **Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais**, 2010.

MARQUES, A.S.A; COELHO, M.V.S.; FERREIRA, M.A; SILVA, V.; DAMASCENO, J.P.S.; MENDES, A.P.; VIEIRA, T. M. Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: níveis de incidência e aspectos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 488–493, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Técnica de Coloração de GRAM**. Brasília, 2001.

PALLADINO, C.; PÉREZ, G.; PÉREZ, C.A. Enfermidades bacterianas de eucaliptos: Estado atual do conhecimento. **Bosque**, v.37, ed.3, p.451-461, 2016.

PEREIRA, I. C.. **Evolutionary analysis of pathogenicity genes from *Erwinia psidii* infecting *Eucalyptus* spp.**. 2019. 99 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2019.

POWERS, E. M. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3756–3758, out. 1995.

RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C.F.; YAMASHIRO, T. A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p. 354–350, 1987.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias Fitopatogênicas**. 5ª ed. Viçosa-MG. Editora UFV. 417p. 2005.

SANTOS, C. C. D. **Métodos de inoculação, avaliação da resistência e manejo de *Ralstonia solanacearum* em viveiros de produção de mudas**. Doutorado—Botucatu - SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2020.

SILVA, C. F. *et al.* PCR-based methods for detection of *Erwinia psidii* on guava. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n. 4, p. 251–259, ago. 2015.

SILVA, D. F. S. H. S. **Caracterização das doenças causadas por bactérias em viveiros e plantios florestais de *Eucalyptus* spp.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP, 2019.

TEIXEIRA, A.C.O.; MARQUES, A.S.A.; FERREIRA, M.A.S.V. Baixa diversidade genética entre linhagens patogênicas de *Erwinia psidii* do Brasil. **Braz. J. Microbiol.** v.40, p.678 – 684, 2009.

WALKER, J. C.; PATEL, P. N.. Splash dispersal and wind as factors in epidemiology of halo blight on bean. **Phytopathology**, v.54, n.2, p.140-141, 1964.

CAPÍTULO 2
EFEITO DO TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO E TESTE DE
SENSIBILIDADE POR DISCO DE DIFUSÃO COM PRODUTOS NATURAIS EM
***Erwinia psidii*¹**

Carolina D. de Angelis; Luís T. P. Silva; Mariana dos S. Hypólito; Lucas A.
Benso; Edson L. Furtado.

RESUMO

O eucalipto é amplamente utilizado no setor florestal devido às suas características favoráveis para a produção de madeira, papel e celulose. Embora sua origem seja australiana, a espécie demonstrou excelente adaptação às condições climáticas brasileiras. Contudo, a expansão das áreas cultivadas favoreceu o surgimento e a disseminação de novos fitopatógenos. Entre as doenças emergentes, destaca-se a seca de ponteiros, causada pela bactéria *Erwinia psidii*, cada vez mais frequente em viveiros e plantios comerciais. Nesse contexto, torna-se essencial o desenvolvimento de estratégias de manejo alternativas e sustentáveis para a prevenção e o controle de doenças. O presente capítulo avaliou metodologias inovadoras, por meio de ensaios de microdiluição em caldo e disco de difusão, utilizando produtos naturais como óleo essencial de eucalipto, óleo de nim e extrato de própolis, a fim de verificar seu efeito bactericida ou bacteriostático sobre *E. psidii*. Para isso, foram analisadas seis cepas bacterianas previamente caracterizadas por técnicas moleculares com a utilização de *primers* específicos e universais seguidos de sequenciamento Sanger. Os resultados evidenciaram que o óleo essencial de eucalipto apresentou efeito bactericida, promovendo a morte do fitopatógeno, com a formação de halos de inibição e concentração inibitória mínima de 5%. Esses resultados ressaltam o potencial dos produtos naturais como alternativas promissoras para o controle de fitopatógenos no setor florestal, contribuindo para a redução do uso de defensivos sintéticos e para a sustentabilidade da produção de eucalipto.

Palavras-chave: *Erwinia psidii*; seca de ponteiros; produtos naturais; manejo; concentração mínima inibitória.

¹ Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico **Forest Pathology**

2.1 INTRODUÇÃO

As áreas destinadas ao cultivo de eucalipto no Brasil continuam a expandir significativamente a cada ano. Para atender a essa demanda crescente do mercado de mudas, as casas de vegetação têm aumentado sua capacidade de produção, e com isso, a higiene, a fitossanidade e os acometimentos por doenças precisam ser cada vez mais observados e gerenciados (Santarora *et al.*, 2014).

O acometimento de doenças, como a seca de ponteiros, causada pela fitobactéria *Erwinia psidii*, pode resultar em perdas substanciais no mercado. O fitopatógeno em questão causa danos foliares, seguidos pela necrose da nervura central foliar. Além dos sintomas foliares, um efeito característico da doença é a morte da planta no sentido basipetal (de cima para baixo), causada pela obstrução dos tecidos vasculares, devido à ação bacteriana (Rodrigues Neto *et al.*, 1987).

Considerando os danos causados por microrganismos fitopatogênicos, o uso indiscriminado de defensivos sintéticos que afetam negativamente o ecossistema continua a ser um problema recorrente. Além disso, o uso de antibióticos na agricultura tem levado à seleção de microrganismos multirresistentes, o que pode agravar ainda mais o controle de patógenos (Nascimento *et al.*, 2021).

Recentemente o uso de óleos essenciais e extratos vegetais são alternativas no controle de doenças agrícolas e florestais e tem ganhado destaque frente a crescente preocupação com impactos ambientais e a busca por métodos mais sustentáveis. Com propriedades naturais antimicrobianas eficazes contra diversos fitopatógenos, incluindo bactérias e fungos, além de atuarem na indução de resposta de defesa das plantas.

Estudos recentes apontam que os efeitos antibacterianos dos produtos naturais estão diretamente relacionados à presença de compostos bioativos produzido pelas plantas, bem como à síntese de peptídeos antimicrobianos, que atuam inibindo a formação de diversas biomoléculas de bactérias fitopatogênicas (Zhao *et al.*, 2022). Além disso, diferentes mecanismos de ação podem estar

envolvidos, incluindo a ruptura da membrana bacteriana, a inibição da produção de fatores de virulência e a indução de estresse oxidativo, os quais comprometem a viabilidade e a patogenicidade dos microrganismos (Dai *et al.*, 2022).

Pesquisas demonstram que o óleo de eucalipto possui propriedades antimicrobianas significativas contra diversos fitopatógenos, incluindo cepas resistentes (Dumont *et al.*, 2024). O óleo de nim, também conhecido por conta de seus bioativos, demonstrou eficácia contra diversos tipos de microrganismos, sugerindo assim, potencial contra *E. psidii* (Altayb *et al.*, 2022). O extrato de própolis é reconhecido devido suas propriedades antimicrobianas, com destaque contra bactérias produtoras de biofilme (Gondim *et al.*, 2013). O sulfato de cobre tem sido em diversos setores agrícolas e florestais pela propriedade antimicrobiana, incluindo a *E. psidii* (Salah *et al.*, 2021).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação antibacteriana e bacteriostática do óleo de eucalipto, do óleo de nim e do extrato de própolis, utilizando testes “*in vitro*” por meio do método de microdiluição em caldo, com concentrações de até 50.000ppm (Tarakanov; Dzhililov, 2022). O fitopatógeno utilizado para o estudo foi *E. psidii* (cepas variadas), visando avaliar o comportamento do patógeno diante da exposição aos óleos e ao extrato, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o crescimento bacteriano e sugerindo alternativas para o manejo da seca de ponteiros. Também foi verificado se os óleos e o extrato apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre *E. psidii*.

Testes de sensibilidade por meio de discos de difusão também foram realizados para medir os halos de inibição da ação dos óleos essenciais e extratos, submetendo *E. psidii* à exposição dos mesmos. O sulfato de cobre, uma substância antimicrobiana amplamente utilizada no setor florestal para o controle de fitopatógenos, foi usado como controle no estudo para avaliar a resistência entre as cepas de *E. psidii*.

2.2 REVISÃO SOBRE MANEJO COM PRODUTOS NATURAIS NO SETOR DA AGRICULTURA E FLORESTAL

Os óleos essenciais ganham destaque no setor da agricultura e florestal por diversas vantagens por ser uma prática sustentável no controle e manejo de praga e doenças. Esses compostos são extraídos de várias partes de plantas aromáticas (Nascimento *et al.*, 2021) e Basak e Guha (2017) definem os óleos essenciais como misturas complexas compostas por compostos voláteis e semivoláteis, solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água. Eles são compostos principalmente por terpenos hidrocarbonetos e terpenos oxigenados (Kayode; Afolayan, 2015).

Estudos que evidenciam a eficácia dos óleos essenciais e extratos vegetais mostram como exemplo o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) apresentou controle de 53% sobre a mancha bacteriana do tomateiro, induzindo também atividades enzimáticas (quitinases e peroxidases) ligadas com a indução de defesa da planta (Lucas *et al.*, 2012).

Os óleos essenciais e extratos vegetais por atuar de diversas formas para que o controle do fitopatógeno seja bem sucedido como por exemplo: Ação direta inibindo o crescimento de microrganismos com a produção de terpenos, fenóis, aldeídos e álcoois que atuam diretamente na destruição de membranas celulares bacterianas e fúngicas (Burt, 2004; Nazzaro *et al.*, 2013); Indução de resistência estimulando o sistema imunológico da planta e aumentando a produção de enzimas degradativas ligadas a defesa como peroxidases, quitinases e beta-1,3-glucanases (Walters *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014); e atividades antioxidantes (compostos fenólicos e flavonóides) protegendo as células vegetais contra o estresse oxidativo causado por patógenos e auxiliando na recuperação do metabolismo (Rice-Evans *et al.*, 1997; Hossain; Al-Raqmi, 2011).

Schwan-Estrada e Stangarlin (2005) destacam que a atividade antimicrobiana e a propriedade de defesa dos compostos secundários presentes nos óleos essenciais são características promissoras no controle de agentes fitopatogênicos. Além disso, a extração de óleos essenciais é um método de baixo

custo e de fácil acesso, tornando-se uma alternativa interessante para o manejo e controle de doenças (Mota *et al.*, 2015).

Entre os óleos selecionados que possuem ação bactericida ou bacteriostática, destaca-se o óleo extraído das folhas de eucalipto, associado a efeitos que podem ser aplicados no controle e manejo de doenças foliares e vasculares de plantas (Warnke *et al.*, 2009). Mota *et al.* (2015) realizaram cultivos “*in vitro*” para comprovar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, demonstrando que ele possui atividade antimicrobiana superior à clorexidina. Esses estudos sugerem que o óleo essencial de eucalipto pode se tornar uma ferramenta eficaz no controle de bactérias fitopatogênicas, com um crescente interesse no mercado atual.

Outro óleo utilizado no controle de doenças e pragas é o óleo extraído das folhas de nim (*Azadirachta indica*), conhecido por suas propriedades inseticidas. A planta produz a azadiractina, uma substância tóxica solúvel em água e álcool, e sensível aos raios ultravioletas (Martinez, 2002; Carvalho *et al.*, 2008). Sua ação ocorre na inibição da biossíntese de quitina, deformação da anatomia de pupas e adultos, redução da longevidade dos insetos, alteração de feromônios e efeitos negativos na reprodução dos insetos. Além de sua ação inseticida, estudos apontam que o óleo de nim também possui atividades antimicrobianas contra bactérias patogênicas, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp., tornando-o uma alternativa para o manejo integrado de doenças (Menezes *et al.*, 2023).

Além disso, foram realizados testes “*in vitro*” com extrato de própolis, uma resina natural coletada e modificada pelas abelhas, amplamente utilizada para fins terapêuticos devido às suas propriedades farmacológicas (Barreto *et al.*, 2020). De acordo com uma revisão de Vargas *et al.* (2004), pesquisas indicam que o própolis possui um espectro amplo de atividades, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, antivirais e antifúngicas. Quando testado em bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Nocardia asteroides* e *Rhodococcus equi*, o extrato de própolis em concentrações de 5% a 50% apresentou atividade antimicrobiana em 92,6% dos isolados e em Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*) apresentou inibição de crescimento de 42,5%

(Vargas *et al.*, 2004). A composição do extrato de própolis pode variar conforme o local de coleta e os tecidos vegetais usados pelas abelhas. Cerca de 200 compostos foram identificados no própolis, muitos dos quais estão envolvidos nas suas atividades antimicrobianas, abrangendo ácidos graxos, fenóis, ésteres, flavonóides, terpenos e aldeídos (Banskota *et al.*, 1998; Vitti; Brito, 2003; Vargas *et al.*, 2004).

Atualmente, não existem registro na literatura sobre o uso de óleos essenciais e extratos vegetais no controle direto de *Erwinia psidii* tanto em eucaliptos quanto em goiabeira. Entretanto, os estudos com patógenos bacterianos similares são base para entender o potencial dos produtos naturais como alternativa sustentável no manejo de doenças bacterianas.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação antibacteriana e bacteriostática do óleo de eucalipto, do óleo de nim e do extrato de própolis, utilizando testes “*in vitro*” por meio do método de microdiluição em caldo, com concentrações de até 50.000ppm. O fitopatógeno utilizado para o estudo foi *Erwinia psidii* (cepas variadas), visando avaliar o comportamento do patógeno diante da exposição aos óleos e ao extrato, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o crescimento bacteriano e sugerindo alternativas para o manejo da seca de ponteiros. Também foi verificado se os óleos e o extrato apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre *E. psidii*.

Testes de sensibilidade por meio de discos de difusão também foram realizados para medir os halos de inibição da ação dos óleos essenciais e extratos, submetendo *E. psidii* à exposição dos mesmos. O sulfato de cobre, uma substância antimicrobiana amplamente utilizada no setor florestal para o controle de fitopatógenos, foi usado como controle no estudo para avaliar a resistência entre as cepas de *E. psidii*.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E IDENTIFICAÇÃO

As amostras das bactérias fitopatogênicas utilizadas neste estudo foram coletadas de mudas de *Eucalyptus* spp. que apresentaram sintomas de seca de

ponteiros, localizadas em viveiros nos municípios de Botucatu e Bofete – SP. Para cada muda afetada, foram coletadas as folhas e ramos com os sintomas de seca. Os órgãos coletados foram acondicionados em sacos de papel e processados logo em seguida, de modo a preservar a integridade dos tecidos. O processamento das amostras e sua preservação foram realizados no Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo, situado na Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp de Botucatu – SP.

Ao todo, foram isoladas 49 bactérias associadas aos sintomas de seca de ponteiros em mudas de *Eucalyptus* spp. provenientes dos viveiros. No entanto, apenas 16 cepas apresentaram morfologia característica do gênero *Erwinia* em meio NA, e após identificação molecular 6 cepas foram pareadas com o grupo de *E. psidii*. Durante o desenvolvimento do estudo, foram estabelecidas parcerias essenciais para o controle positivo de *Erwinia psidii*.

2.3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CIM) POR MEIO DA MICRODILUIÇÃO EM CALDO

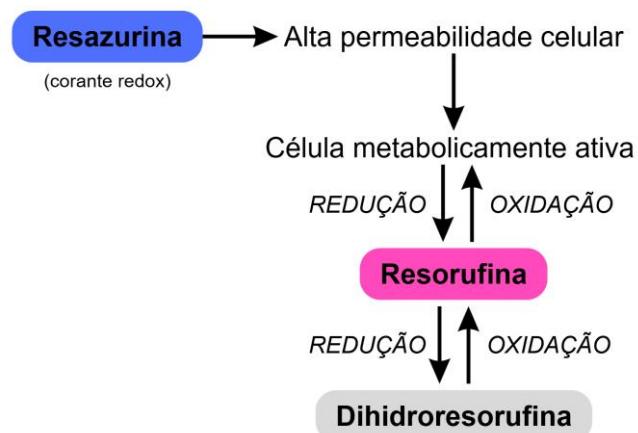
Foi utilizado o método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) conforme aplicado pelo NCCLS (2003). Os testes de sensibilidade de um patógeno microbiano são comumente realizados por meio de experimentos *in vitro*, como um método de determinação de quais substâncias podem afetar o crescimento do microrganismo. Para isso foi utilizada uma placa de 96 poços autoclavada, e o meio caldo nutriente foi preparado, proporcionando condições adequadas para o crescimento do fitopatógeno estudado. As substâncias testadas para a bactéria em questão foram óleo essencial de eucalipto, óleo de nim, extrato de própolis e sulfato de cobre. A determinação da CIM foi realizada por meio de microdiluição em caldo, com o objetivo de relacionar os efeitos bactericidas ou bacteriostáticos dos produtos naturais utilizados nos testes contra o microrganismo *Erwinia psidii*, causador da seca de ponteiros em *Eucalyptus* spp..

O óleo essencial de eucalipto utilizado foi adquirido da empresa Bioessência, obtido por destilação a vapor de folhas e ramos. O óleo de nim foi fornecido pela empresa Citromax, contendo 0,12% de azadiractina e 99,88% de componentes inertes. Já extrato de própolis foi obtido pela marca Alvorada. A seleção desses produtos naturais baseou-se em suas reconhecidas propriedades bactericidas (Nazzaro *et al.*, 2013), sendo inicialmente preparados em concentração de 50.000ppm (equivalente a 5%).

Essas concentrações foram escolhidas com base em estudos anteriores (Hillen *et al.*, 2012), considerando o amplo espectro de concentrações usuais a serem testadas. Com o auxílio de uma pipeta, 100 µL do meio caldo nutriente foram distribuídos em todos os poços, exceto no primeiro, onde foi adicionada 200 µL da solução de 50.000ppm do óleo ou extrato de interesse. A partir daí, foi realizada uma diluição seriada, retirando 100 µL do primeiro poço com a solução a 50.000ppm e transferindo para o próximo poço, repetindo o processo até o último poço (NCCLS, 2003). Sendo as concentrações analisadas de 50.000ppm (5%), 25.000ppm (2,5%), 12.500ppm (1,25%), 6.250ppm (0,625%), 3.125ppm (0,312%), 1562,5ppm (0,156%), 781,25ppm (0,078%), 390,62ppm (0,039%), 195,3ppm (0,019%), 97,65ppm (0,009%), 48,82ppm (0,004%) e 24,41ppm (0,002%). Vale ressaltar que, ao preparar o meio caldo nutriente, sua concentração deve ser calculada para o dobro do valor final desejado, pois a suspensão bacteriana é inoculada nos poços e a concentração do meio adicionado será reduzida à metade.

Após concluir a diluição, foi adicionado 100 µL de suspensão bacteriana a $0,5 \times 10^8$ UFC, conforme a escala Nefelométrica de McFarland, em todos os poços. A placa foi incubada por 24 horas em BOD a 27°C. Para confirmação do crescimento bacteriano após o período de incubação, foi adicionado 50 µL de resazurina em cada poço. A resazurina é um corante enzimático redox, de cor azul, que indica o crescimento bacteriano a partir da atividade metabólica celular. O corante é permeável à célula e, quando reduzido, se transforma em resorufina, um corante rosa fluorescente (Figura 1 e 2). A redução ocorre apenas em células viáveis, com metabolismo ativo (De Castro, 2017).

Figura 1 – Exemplificação de como acontece a redução do corante Resazurina para Resorufina



Fonte: Carolina Destro de Angelis (2025)

Figura 2 – Exemplificação resultado microdiluição em caldo com a aplicação da resazurina

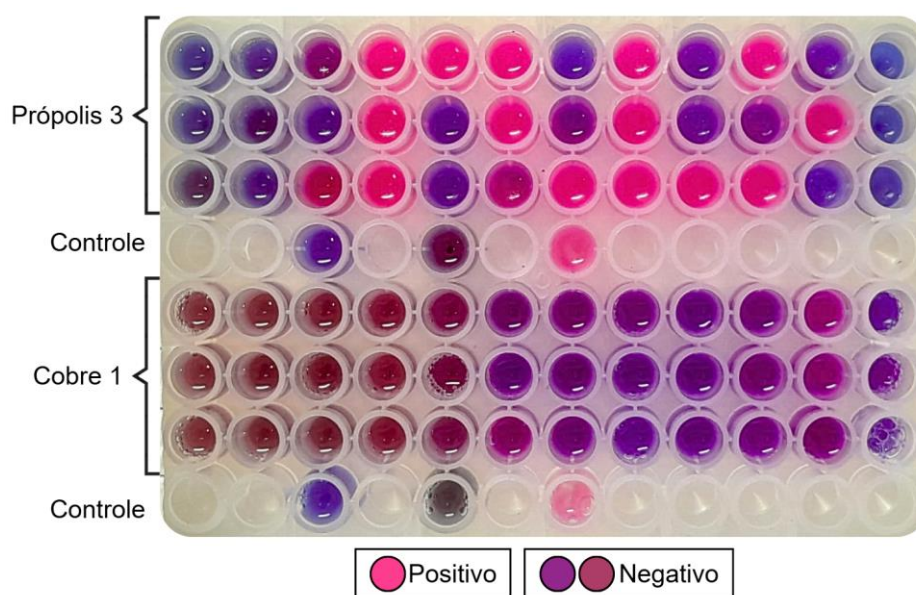


Foto: Carolina Destro de Angelis - 2025

Como controle, foram utilizados três tratamentos: dois negativos e um positivo. O primeiro tratamento consistiu apenas de meio caldo nutriente, o segundo tratamento foi meio caldo nutriente com o óleo utilizado no experimento, e o terceiro foi o controle positivo, com apenas o meio e a bactéria. Para cada diluição, os tratamentos foram repetidos três vezes.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada em placas de 96 poços, utilizando o corante resazurina como indicador de crescimento bacteriano, evidenciado pela mudança para a coloração rosa. Em seguida, o conteúdo dos poços foi plaqueado em meio NA, a fim de validar a inibição observada e distinguir se o efeito da substância testada foi bactericida ou apenas bacteriostático, com base no retomada de crescimento bacteriano nas placas.

2.3.3 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE POR DISCOS DE DIFUSÃO

A metodologia de sensibilidade por disco de difusão foi adaptada do material do NCCLS (2002) para a realização do teste. Inicialmente, as concentrações dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*, *Azadirachta indica* (nim) e extrato de própolis foram padronizadas em 80.000ppm/disco. A suspensão bacteriana foi preparada a 0,5 na escala Nefelométrica de McFarland e alíquota de 50 µL foi distribuída em placas de Petri contendo meio de cultivo NA, autoclavado e pronto para uso.

Com o auxílio de uma alça de Drigalski, a suspensão bacteriana foi espalhada uniformemente por toda a superfície da placa. Discos de papel filtro, com 6 mm de diâmetro, foram posicionados de maneira uniforme nas placas. As placas foram então incubadas em B.O.D. por um período de 24 a 48 horas, a 27°C. Os halos formados ao redor dos discos foram medidos com uma régua, e o grau de sensibilidade foi classificado conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Grau de inibição bacteriana ao óleo ou extrato de acordo com o tamanho do halo em mm

Diâmetro zona de inibição (mm)	Inibição à ação bacteriana	Classificação Da inibição
< 12	-	Nenhuma inibição
< 20 – 12	+	Atividade moderada
> 20	++	Forte atividade

Fonte: Adaptado de Rota *et al.* (2008).

De acordo com a Tabela 1, os microrganismos que apresentaram halos menores do que 12 mm foram classificados não havendo atividade de inibição por parte da substância testada. Halos entre menores que 20 à 12 mm indicam atividade de inibição moderada, enquanto halos superiores a 20 mm indicam forte atividade inibitória.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

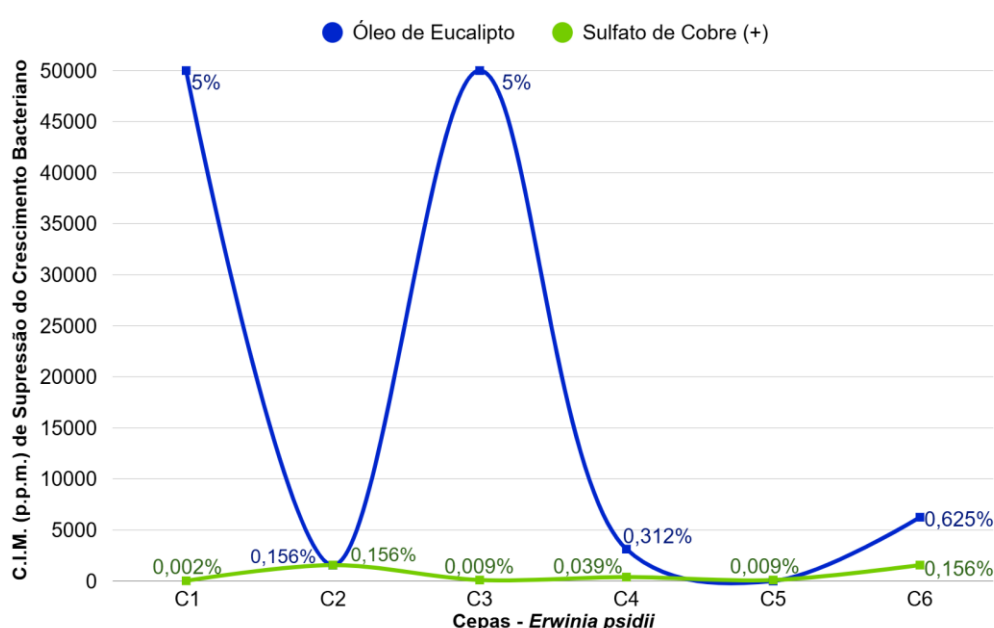
2.4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CIM) POR MEIO DA MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Para os teste com óleo de *Eucalyptus globulus*, observou-se que as cepas 1 e 3 apresentaram crescimento significativo na concentração máxima aplicada. No entanto, as cepas 2, 4, 5 e 6 não apresentaram crescimento em concentrações altas do óleo, com os seguintes valores para as concentrações: 781ppm (0,078%), 1562ppm (0,156%), 0ppm (0%) e 3125ppm (0,312%), respectivamente (Figura 3). Assim, a CIM de *E. psidii* em óleo de eucalipto foi maior do que 50.000ppm, o equivalente a 5%. Isso indica que algumas cepas de *E. psidii* são mais sensíveis ao óleo de eucalipto do que outras.

O sulfato de cobre foi utilizado como controle positivo e em comparação em todos os produtos testados. Sendo assim as cepas 2 e 6 apresentaram crescimento em concentrações de 1562ppm (0,156%), enquanto as demais cepas

criaram apenas em concentrações abaixo de 390ppm (0,039%) (Figura 6). Em relação à CIM de *E. psidii* frente ao sulfato de cobre, foi observado que, em baixas concentrações de 15.600ppm (ou 1,56%), o fitopatógeno não apresentou crescimento. Vale ressaltar que, até o momento, as cepas de *E. psidii* utilizadas não demonstraram resistência ao sulfato de cobre.

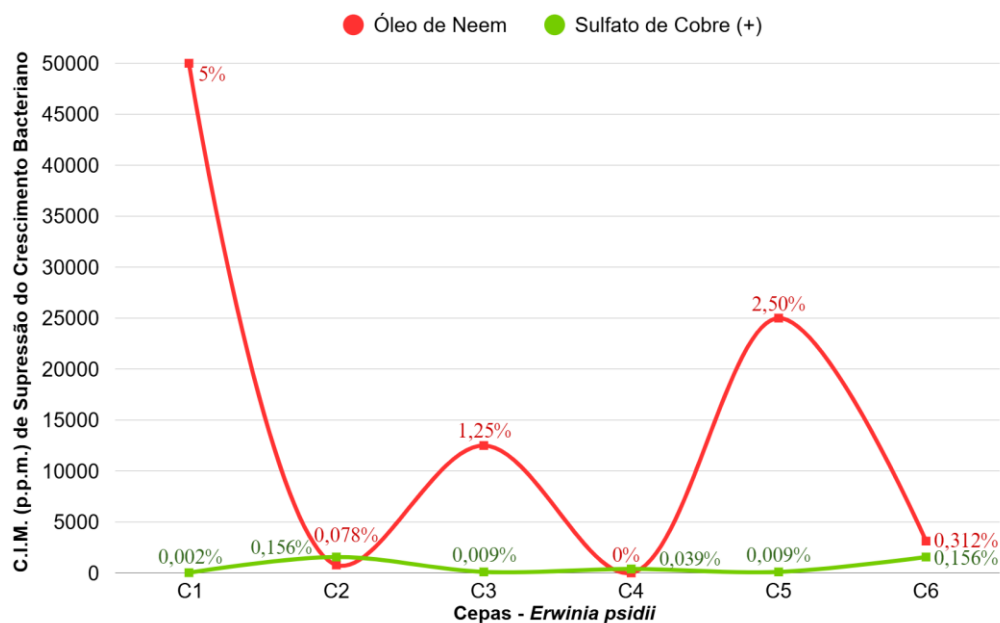
Figura 3 – Concentração Inibitória Mínima (CIM/ppm) de supressão do crescimento de *Erwinia psidii* em óleo de *Eucalyptus globulus* utilizando em comparação ao Sulfato de Cobre como controle positivo



Fonte: Carolina Destro de Angelis (2025).

Quanto ao óleo de Nim (*Azadirachta indica*), observou-se que a cepa 1 foi a única que apresentou crescimento amplo até a concentração de 50.000ppm. Já as cepas 2, 3, 4, 5 e 6 demonstraram crescimento em concentrações de 781ppm (0,078%), 12500ppm (1,25%), 0ppm (0%), 25.000ppm (2,5%) e 3152ppm (0,312%), respectivamente (Figura 4). Com base nesses resultados, a CIM da maioria das cepas de *E. psidii* em relação ao óleo de Nim foi de 12.500ppm, ou seja, 1,25%. No entanto, algumas cepas apresentaram resistência até 50.000ppm, estabelecendo a CIM mínima em 5%.

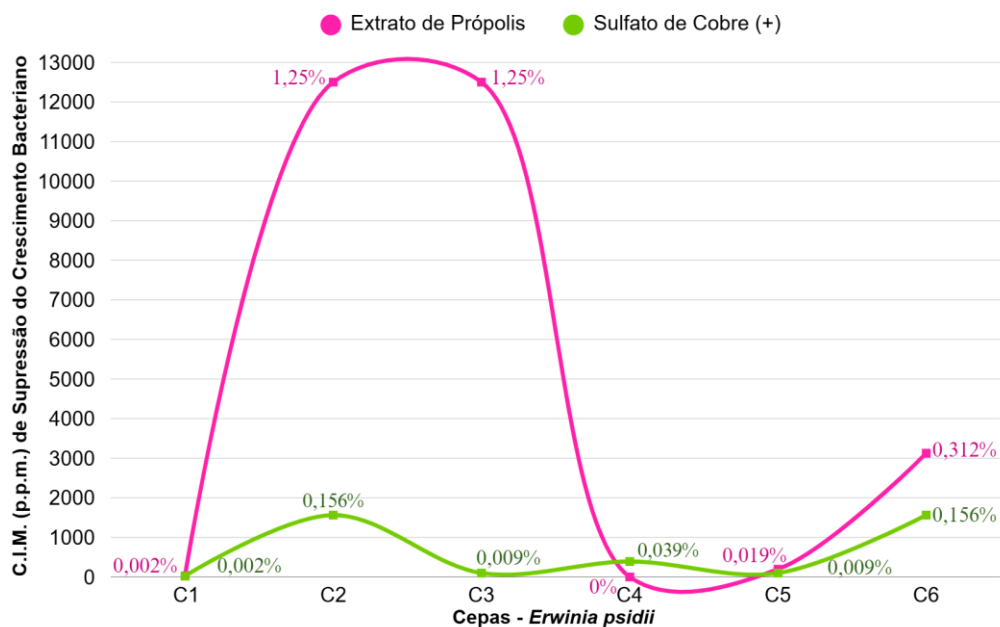
Figura 4 – Concentração Inibitória Mínima (CIM/ppm) de supressão do crescimento de *Erwinia psidii* em óleo de Nim utilizando em comparação ao Sulfato de Cobre como controle positivo



Fonte: Carolina Destro de Angelis (2025).

Para o crescimento em extrato de própolis, as cepas 2 e 3 apresentaram crescimento até as concentrações de 12.500ppm (1,25%). Já as cepas 1, 4, 5 e 6 mostraram taxas de crescimento até 24ppm (0,002%), 0ppm (0%), 195ppm (0,019%) e 3125ppm (0,312%), respectivamente (Figura 5). Com isso, a CIM de *E. psidii* em relação ao extrato de própolis foi de 12.500ppm, ou seja, 1,25%. Essa baixa concentração demonstra o alto rendimento do própolis, o que o torna um potencial método de controle contra a causadora da seca de ponteiros.

Figura 5 – Concentração Inibitória Mínima (CIM/ppm) de supressão do crescimento de *Erwinia psidii* em extrato de própolis utilizando em comparação ao Sulfato de Cobre como controle positivo



Fonte: Carolina Destro de Angelis (2025).

Após os resultados obtidos nas placas de 96 poços, todos os ensaios foram repetidos em placas de Petri para verificar se o efeito dos óleos essenciais, extrato e sulfato de cobre foi bactericida ou bacteriostático (Figura 7)

Figura 6 – Placas NA estriadas a partir da microdiluição em caldo para verificação da ação bacteriostática e bactericida

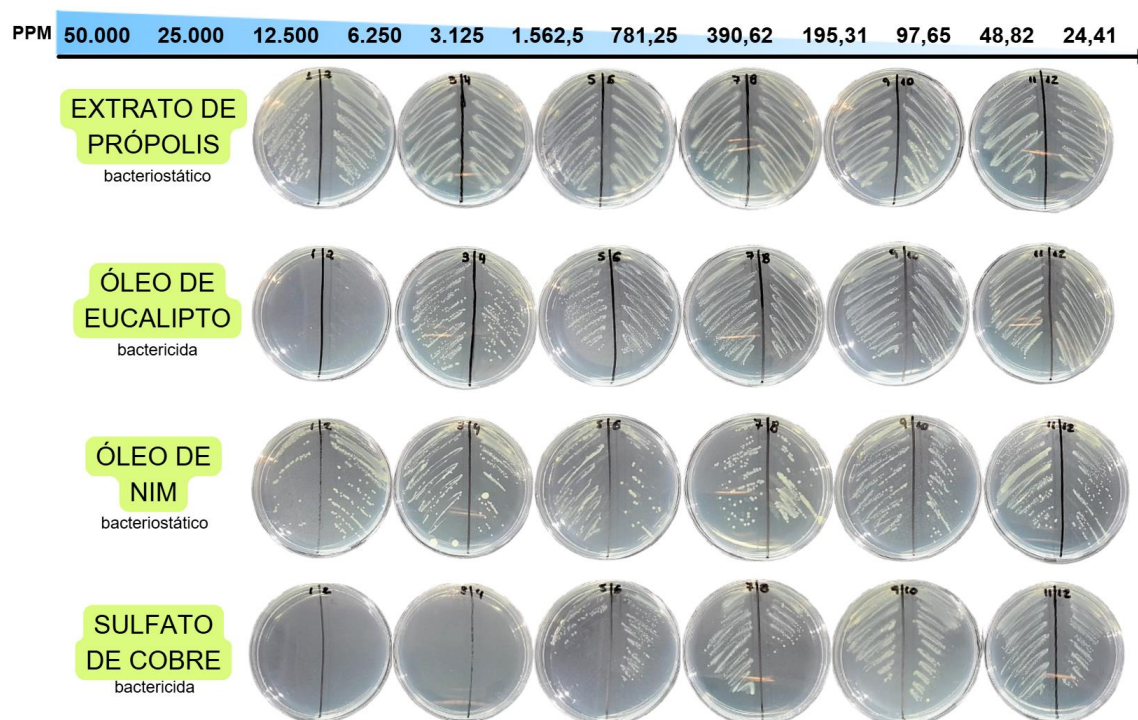


Foto: Carolina Destro de Angelis - 2025

Com base nos resultados apresentados, os óleos de *Eucalyptus globulus* e o extrato de própolis mostraram-se eficazes em testes preliminares no controle de *Erwinia psidii* *in vitro*, devido aos efeitos das substâncias secundárias com propriedades antibacterianas. Dentre os métodos de manejo sugeridos, além da higienização das bandejas, limpeza dos viveiros e prevenção do molhamento das copas das mudas, o presente estudo destaca a CIM da *E. psidii* em relação ao uso de óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, óleo de *Nim* e extrato de própolis como produtos com potencial controle para inibir o crescimento do fitopatógeno causador da seca de ponteiros em eucalipto.

A partir do uso adequado dos óleos e com base na CIM que impede o crescimento de *E. psidii*, é importante observar que todos os óleos e extrato testados apresentaram resultados satisfatórios e fornecem uma referência sobre a dosagem necessária para cada substância. O óleo de *Eucalyptus globulus*, embora possua características antimicrobianas, demonstrou que para um controle eficaz de *E. psidii*, as concentrações de dosagem devem ser superiores a 5%. Já

o óleo de *Nim*, que além de efeitos negativos para a reprodução e desenvolvimento de insetos, também apresenta ação bactericida e mostrou que para ser eficaz no controle da seca de ponteiros, a CIM para *E. psidii* é de 5%.

Os testes aplicados com extrato de própolis evidenciaram a atividade antimicrobiana descrita por Vargas *et al.* (2004), com uma CIM de 1,25% contra *E. psidii*. Isso reforça o papel fundamental do extrato de própolis, cujos 200 compostos ativos têm forte ação antimicrobiana, tornando-o uma alternativa viável no controle de *E. psidii* em mudas de eucalipto. A ação direta do extrato de própolis atua diretamente na destruição da membrana celular bacteriana ocasionando o extravasamento do conteúdo celular e desnaturação de proteínas (Nazzaro *et al.*, 2013).

Por fim, os tratamentos com sulfato de cobre apresentaram uma CIM de 0,0156% para *E. psidii*, confirmando sua reconhecida eficácia como bactericida de amplo uso no controle fitossanitário. Entretanto, os resultados obtidos com os produtos naturais testados revelam alternativas promissoras e inovadoras. O extrato de própolis demonstrou efeito bacteriostático com concentrações próximas às do sulfato de cobre, evidenciando seu potencial como estratégia de manejo menos agressiva ao ambiente e ao cultivo. De forma ainda mais expressiva, o óleo essencial de eucalipto apresentou efeito bactericida em concentração de 5%, indicando não apenas alta eficiência contra o patógeno, mas também a possibilidade de aplicação prática como bioinsumo no controle de seca de ponteiros. Esse resultado reforçam a viabilidade de alternativas naturais na redução do uso de insumos químicos convencionais, alinhando-se às demandas atuais por soluções sustentáveis no manejo de doenças florestais.

2.4.2 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE POR DISCO DE DIFUSÃO

As análises relacionadas ao teste de sensibilidade por disco de difusão demonstraram uma diferença acentuada quando comparado com o teste de microdiluição em caldo. Com base na classificação do grau de inibição de acordo com tamanho do halo em milímetros seguindo os parâmetros estabelecidos por

Rota *et al.* (2008) presentes na Tabela 1 adaptada, o óleo de eucalipto apresentou forte atividade inibitória contra a *Erwinia psidii* com uma média de halos de 20,90 mm (Tabela 2). A ação antibacteriana do óleo de eucalipto, em alguns aspectos, pode ser atribuída ao baixo peso molecular de seus compostos ativos (Sharifi-Rad *et al.*, 2017), o que resulta em uma atividade bactericida em teste de disco de difusão.

Tabela 2 – Grau de inibição da atividade de crescimento de *Erwinia psidii* pelo óleo de eucalipto

Óleo de <i>Eucalyptus globulus</i>				
Amostra	Concentração	Halo em mm	Inibição da ação bacteriana	Classificação da inibição
1	80.000 ppm	27,45	++	Forte atividade
2	80.000 ppm	11	+	Atividade moderada
3	80.000 ppm	20	++	Forte atividade
4	80.000 ppm	5	-	Nenhuma inibição
5	80.000 ppm	36	++	Forte atividade
6	80.000 ppm	26	++	Forte atividade

Fonte: Carolina Destro de Angelis (2025). (-): Nenhuma inibição; (+): Atividade moderada; (++):
Forte atividade

Para o óleo de nim, a *E. psidii* não apresentou sensibilidade, sendo a média de halos de 1,08 mm (Tabela 3). Em comparação com a microdiluição em caldo, esse comportamento pode ser explicado devido a diferença do meio em que bactéria foi submetida (com ágar e sem ágar); como é a taxa de crescimento da bactéria nos dois meios de cultura e a volatilidade do óleo. Segundo Burt (2004), alguns óleos essenciais podem apresentar compostos ativos com solubilidade em água reduzida e uma alta volatilidade, com isso, podem se difundir de maneira limitada no ágar, o que resulta em halos menores.

Tabela 3 – Grau de inibição da atividade de crescimento de *Erwinia psidii* pelo óleo de nim

Óleo de Nim				
Amostra	Concentração	Halo em mm	Inibição da ação bacteriana	Classificação da inibição
1	80.000 ppm	1,5	-	Nenhuma inibição
2	80.000 ppm	0	-	Nenhuma inibição
3	80.000 ppm	2	-	Nenhuma inibição
4	80.000 ppm	0	-	Nenhuma inibição
5	80.000 ppm	2,5	-	Nenhuma inibição
6	80.000 ppm	0,5	-	Nenhuma inibição

Fonte: Carolina Destro de Angelis (2025). (-): Nenhuma inibição; (+): Atividade moderada; (++)
Forte atividade.

Quanto a ação do extrato de própolis sob a *E. psidii*, não apresentou atividade inibitória, com a média de halos de 5,16 mm (Tabela 4). Apesar do seu bom desempenho em teste de microdiluição em caldo na inibição do crescimento de *E. psidii*, para os teste com discos de difusão o extrato devido seus componentes ativos como flavonoides e ácidos fenólicos, possuem alta massa molecular sendo assim insolúveis em água e de difícil difusão no meio sólido (Hammer *et al.*, 1999).

Tabela 4 – Grau de inibição da atividade de crescimento de *Erwinia psidii* pelo extrato de própolis

Extrato de própolis				
Amostra	Concentração	Halo em mm	Inibição da ação bacteriana	Classificação da inibição
1	80.000 ppm	5	-	Nenhuma inibição
2	80.000 ppm	4	-	Nenhuma inibição
3	80.000 ppm	5,5	-	Nenhuma inibição
4	80.000 ppm	4	-	Nenhuma inibição
5	80.000 ppm	6	-	Nenhuma inibição
6	80.000 ppm	6,5	-	Nenhuma inibição

Fonte: Carolina Destro de Angelis (2025). (-): Nenhuma inibição; (+): Atividade moderada; (++)
Forte atividade

Os teste de sensibilidade de *E. psidii* ao sulfato de cobre revelaram halos médias de 4,91 mm (Tabela 5), não indicando inibição de crescimento bacteriano. Esse resultado sugere que o fitopatógenos não apresenta resistência completa, mas também não possui elevada suscetibilidade, de modo que o cobre atua apenas de forma parcial na inibição de crescimento bacteriano, especialmente em concentrações mais elevadas. É importante considerar que a ação do cobre depende de sua forma iônica livre para interagir com componentes celulares e enzimáticos da bactéria, o que pode reduzir sua efetividade em ensaios realizados em meio sólidos (Yruela, 2005). Além disso, o tempo de exposição ao sulfato de cobre pode favorecer a ativação de mecanismos adaptativos, possibilitando a retomada do crescimento bacteriano após o contato inicial (Lamichhane, *et al.*, 2018).

Tabela 5 – Grau de inibição da atividade de crescimento de *Erwinia psidii* pelo Sulfato de cobre

Sulfato de Cobre				
Amostra	Concentração	Halo em mm	Sensibilidade à ação antimicrobiana	Classificação
1	100%	5	-	Nenhuma inibição
2	100%	5	-	Nenhuma inibição
3	100%	3,5	-	Nenhuma inibição
4	100%	5	-	Nenhuma inibição
5	100%	6	-	Nenhuma inibição
6	100%	5	-	Nenhuma inibição

Fonte: Carolina Destro de Angelis (2025). (-): Nenhuma inibição; (+): Atividade moderada; (++)
Forte atividade

A formação de halos em teste de disco de difusão (Figura 8) fornece informações relevantes não apenas sobre a presença de atividade antimicrobiana mas também sobre as características físico-químicas do agente testado. Compostos voláteis ou de alta massa molecular, por exemplo, podem apresentar difusão limitada em meios sólidos, resultando em halos reduzidos mesmo quando possuem atividade antimicrobiana significativa. Além disso, a sensibilidade bacteriana pode variar entre cepas do mesmo microrganismo, refletindo diferenças genéticas ou mecanismos de resistência adquirida, o que contribui para a heterogeneidade nos resultados observados.

Figura 7 – Formação de halos no teste de disco de difusão com óleo de Eucalipto, óleo de nim, extrato de própolis e sulfato de cobre

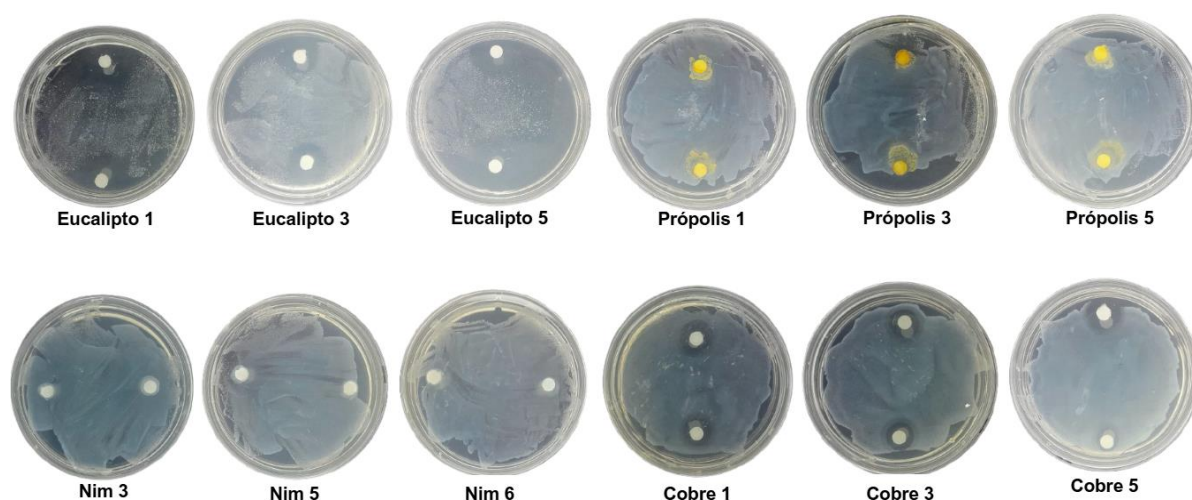


Foto: Carolina Destro de Angelis - 2025

Incluir o sulfato de cobre como controle positivo permitiu, além de monitorar a atividade bacteriana da *E. psidii* em sua presença, como também mensurar uma maior atividade antimicrobiana com a formação de halos e a comparação com testes de microdiluição em caldo.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam o potencial promissor do óleo essencial de eucalipto no controle de *E. psidii* apresentando efeito bactericida mesmo em concentrações relativamente baixas (5%). Essa atividade sugere que o óleo de eucalipto pode ser explorada como uma potencial alternativa natural aos produtos químicos convencionais, oferecendo uma solução sustentável, de menor impacto ambiental e economicamente viável para o manejo da seca de ponteiros em eucalipto. Diante do crescente interesse do mercado por bioinsumos inovadores, a pesquisa reforça a importância do óleo de eucalipto como uma possível ferramenta estratégica para o controle de fitopatógenos, podendo integrar programas de manejo integrado de doenças em plantações florestais.

REFERÊNCIAS

- ALTAYB, H.N., *et al.* In-nitro and in-silico antibacterial activity of *Azadirachta indica* (Neem), methanolic extract, and identification of Beta.d-Mennofuranoside as a promising antibacterial agent. **BMC Plant Biol**, v.22, p.262, 2022.
- BANSKOTA, A. *et al.* Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activity. **J Nat Prod**, Downers Grove, v.61, n.7, p.896–900, 1998.
- BARRETO, A. L. H. *et al.* **Controle de Qualidade da Própolis**. Embrapa, 2020.
- BASAK, S.; GUHA, P.. Betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil microemulsion characterization and antifungal activity on growth, and apparent lag time of *Aspergillus flavus* in tomato paste. **LWT**, v. 75, p.616–623, 2017.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, ed.3, p.223-253, 2004.
- CARVALHO, G. A. *et al.* Eficiência do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no controle de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) e *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (*Hemiptera: aphididae*) em couve-manteiga *Brassica oleracea* Linnaeus var. *acephala*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.2, p.181–186, 2008.
- DAI, C., *et al.* O produto natural curcumina como agente antibacteriano: conquistas e problemas atuais. **Antioxidants (Basel)**, v.11, ed.3, p.459, 2022.
- DE CASTRO, C. H. D. F. **Padronização e análise da atividade microbicida de células mononucleares de sangue periférico contra *Mycobacterium tuberculosis* utilizando a resazurina**. Monografia—Vitória - ES: Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.
- DUMONT, E. *et al.* Solução de folha de *Eucalyptus major* (Miden) Blakely e *Melaleuca alternifolia* (Maiden e Betché) Cheel inibem o crescimento de patógenos bacterianos sensíveis a antibióticos e resistentes a beta-lactâmicos. **Pharmacognosy Communication**, v. 14, ed. 3, p. 121-130, 2024.
- GONDIM, B. L. C. Atividade antimicrobiana de produtos naturais frente a bactérias formadoras de biofilme dentário. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v.17, n. 1, p. 79-84, 2013.
- HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, ed.6, p.985-990, 1999.
- HILLEN, T., *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. **Revista brasileira plantas medicinais**, v.14, ed.3, p.439-445, 2012.

HOSSAIN, M. A.; AL-RAQMI, K. A. S. Biological activities of essential oils and their active compounds: Antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and anticancer activities. **Plants**, v.10, ed.3, p.402, 2021.

KAYODE, R.M.O.; AFOLAYAN, A.J.. Cytotoxicity and effect of extraction methods on the chemical composition of essential oils of *Moringa oleifera* seeds. **Journal of Zhejiang University, SCIENCE B**, v.16, p.680–689, 2015.

LAMICHHANE, J.R., *et al.* Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture: A review. **Agronomy of Sustainable Development**, v.38, ed.3, n.28, 2018.

LUCAS, G. C. *et al.* Indian clove essential oil in the control of tomato bacterial spot. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 45-51, 2012.

MARTINEZ, S.S. (Ed.). *O nim – Azadirachta indica: natureza, usos múltiplos, produção*. Londrina: **IAPAR**, 2002. 142p.

MENEZES, R. M. S.; ARANHA, C. P. M.; VIANA, A. C. **Avaliação do efeito bactericida do óleo essencial da folha de Nim (*Azadirachta indica*)**. Em: 15º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DA CIÊNCIA DE ALIMENTOS. Campinas - SP, 2023.

MOTA, V. de S., *et al.* Antimicrobial activity of Eucalyptus globulus oil, xylitol and papain: a pilot study. **Revista da Escolar de Enfermagem da USP**, v.49, ed.2, p.0216-0220, 2015.

NASCIMENTO, D. M. D. *et al.* Óleos essenciais no tratamento de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 27, n. 1, p. 77–90, 2021.

NAZZARO, F. *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v.6, ed. 12, p. 1451-1474, 2013.

NCCLS. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos: Norma Aprovada. **NCCLS documento M38-A**. v.22, nº16, 2002.

OLIVEIRA, D. F. *et al.* Essential oils induce resistance in plants against pathogens. **Scientia Agricola**, v.71, ed.5, p. 320-327, 2014.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v.2, ed.4, p.152-159, 1997.

RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C.F.; YAMASHIRO, T. A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p. 354–350, 1987.

ROTA, M.C., *et al.* Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v.19, p.681-687, 2008.

SALAH, I., *et al.* Copper as an antimicrobial agent: recent advances. **RSC Adv.**, v.11, p.18179-18186, 2021.

SANTAROSA, E., *et al.* Transferência de tecnologia florestal: cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda – Brasília, DF: **Embrapa Florestas**, 2014.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. 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, c.5, p. 125-138, 2005.

SHARIFI-RAD, J., *et al.* Atividades biológicas dos óleos essenciais: da quimioecologia vegetal aos sistemas tradicionais de cura. **Moléculas**, v.22, ed.1, p.70, 2017.

TARAKANOV, R.I.; DZHALILOV, F.S. Using of essential oils and plants extracts against *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean. **Plants (Basel)**, v.22, ed.21, p.2989, 2022.

VARGAS, A. C. *et al.* Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.159-163, 2004.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial do Eucalipto**. Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2003.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v.64, ed.5, p.1263-1280, 2013.

WARNKE, P.H.; BECKER, S.T.; PODSCHUN, R.; SIVANANTHAN, S.; SPRINGER, I.N.; RUSSO, P.A., *et al.* The battle against multi-resistant strains: renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. **J Craniomaxillofac Surg.**, v.37, ed.7, p.392-397, 2009.

YRUELA, I. Cobre em plantas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.17, ed.1, p.145-156, 2005.

ZHAO, Y., *et al.* A comprehensive review on mechanism of natural products against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Future Foods**, v.2, p.25-33, 2022.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos destacam a importância da utilização de técnicas bioquímicas associadas com a genética molecular para a identificação de fitopatógenos que trazem prejuízos consideráveis para a produção de mudas de eucalipto. Quanto antes a identificação for realizada, ações mais direcionadas podem ser indicadas para que a contenção dos efeitos negativos sejam amenizados.

Quanto aos teste com óleos essenciais e extratos no controle de *E. psidii*, demonstram que o uso de óleos essenciais de eucalipto, nim e extrato de própolis, apresentam potencial para o controle de *E. psidii* com efeito bactericida e bacteriostático dependendo da concentração utilizada e o método de avaliação. A associação do teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração mínima inibitória do microrganismo, com o teste de disco de difusão por halo de inibição, possibilitou que fosse observado o comportamento preliminar das substâncias utilizadas em meios de cultura diferentes. O óleo de eucalipto se mostrou promissor no controle de *E. psidii* em concentrações de 80.000 ppm (8%) com atividades superiores ao sulfato de cobre (100%) em teste de halos de inibição superiores a 20mm, sendo possível interpretar que seu desempenho em meio sólido é significativo e a alta sensibilidade da *E. psidii*. Já nos teste de microdiluição em caldo o óleo de eucalipto apresentou controle bactericida contra *E. psidii* em concentrações de 50.000 ppm (5%) e o extrato de própolis apresentou efeito bacteriostático contra o fitopatógeno em concentrações de 12.500 ppm (1,25%). Com a diversidade de teste, foi essencial identificar que o efeito do extrato de própolis é evidenciado apenas em meio de cultura líquido devido à alta massa molecular os compostos majoritários com ação bacteriostática.

As diferenças de sensibilidade observada principalmente nos teste de disco de difusão destaca a importância da utilização de metodologias complementares, como a concentração inibitória mínima, para resultados mais precisos sobre a concentração e eficácia da substância testada. Os resultados destacam o potencial de compostos naturais como uma ferramenta alternativa no manejo de bactérias fitopatogênicas em viveiros florestais, visando a substituição de

defensivos agrícola. A utilização de produtos de origem natural como parte do manejo integrado de doenças bacterianas aplicadas em viveiros de produção de eucaliptos, representa uma alternativa ecologicamente mais sustentável com comparação com os defensivos agrícolas utilizados tradicionalmente, cujo está diretamente associado com a contaminação de solos, lençóis freáticos e a seleção de cepas bacterianas resistentes (Nazzaro *et al.*, 2013; Lamichhane *et al.*, 2018).

O uso de óleos essenciais por produtores florestais se encaixa como uma alternativa sustentável e com eficácia comprovada. Apesar da sua volatilidade, o uso de óleos essenciais pode estar associada com o nano encapsulamento ou substâncias que estabilize a molécula e viabilize o contato com óleo com a planta por mais tempo. Visando o uso do óleo essencial tanto em materiais ou formulações sólidas, quanto em formulações líquidas o óleo de *Eucalyptus globulus* mostrou alta eficiência para efeito bactericida. E o extrato de própolis, em meio líquido, proporcionou em baixas concentrações efeito bacteriostático. No entanto, pesquisas complementares precisam ser desenvolvidas afim de confirmar a viabilidade dessas práticas em uma escala operacional e teste in vivo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, I. M.G. de. Bactérias Fitopatogênicas Exóticas. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1-2, p. 45-47, 2001.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MÁFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, Brasil: Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2004.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MÁFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, Brasil: Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2009.
- ANNIS, S. L.; GOODWIN, P. H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.1-14, 1997.
- ARRIEL, D.A.A., *et al.* Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. **Forest Pathology**, v.44, n.4, p.255-265, 2014.
- BACDIVE in 2025. **Nucleic Acids Research**; database issue 2025. Disponível em: < <https://bacdive.dsmz.de/> >
- BASS, C. *et al.* The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.51, p.41-51, 2014.
- BPIA. **Aliança da indústria de produtos biológicos**: História dos pesticidas, 2017. Disponível em: <<http://www.bpia.org/history-of-biopesticides/>> Acesso em: 24. Jun. 2025
- BOOTH, T. H. Eucalypt plantations and sustainable forestry. **Forest Ecology and Management**. v.301, p.28-34, 2013.
- BORGES JUNIOR, N. Manejo de pragas e doenças na CMPC. Belo Horizonte: **Sociedade de Investigações Florestais**, 2017.
- BRETT, C.; WALDRON, K. Cell-wall degradation. In: **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. Topics in Plant Physiology. 1. ed., v. 2, p. 168–179, 1996.
- CAIRES, N. P. **Interação *Erwinia psidii* – *Eucalyptus* spp.: infecção, alterações fisiológicas e fontes de resistência**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.
- CAIRES, N.P.; HERMENEGILDO, O.S.; GUIMARÃES, L.M.S.; MAFIA, R.G.; ZAUZA, E.Â.V.; JÚNIOR, N.B.; BADEL, J.L.; ALFENAS, A.C.. Host range of *Erwinia psidii* and genetic resistance of *Eucalyptus* and *Corymbia* species to this pathogen. **Forest Pathology**, v.49, e.12527, 2019.

CAIRES, N.P.; GUIMARÃES, L.M.S.; HERMENEGILDO, P.S.; RODRIGUES, F.A.; BADEL, J.L.; ALFENAS, A.C.. Bidirectional colonization and biofilm formation by *Erwinia psidii* in eucalyptus plants. **Plant Pathology**. v.69, p. 549–558, 2020.

CANOPY. **Mapeamento e Caracterização dos plantios florestais do Brasil**, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/florestas-plantadas/2024/63a-ro-11-09-2024-1/apresentacao_resultados_2023_mapa_cfp.pdf>. Acesso em: 20 de Dez. 2024.

COELHO, M. V. S.; MENDES, A. P.; MARQUES, A. S. DOS A. Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: levantamento e caracterização. **Embrapa**, Brasília - DF, 2002.

COLLMER, A.; KEEN, N. T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.383-409, 1986.

COMPANT, S. *et al.* Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, p.4951-4959, 2005.

CONSUFOR. Exportações Florestais. Disponível em: <<https://www.consufor.com/wp-content>> 2018. Acesso em 13 de maio de 2025.

COSTA, C. R. **Sobrevivência e herança da resistência a *Erwinia psidii* em eucalipto**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2021.

COUTINHO, T.A., *et al.* A new shoot and stem disease of Eucalyptus species caused by *Erwinia psidii*. **Australasian Plant Pathology**, v.40, p.55-60, 2011.

DE MELO, I. S. **Bactérias endofíticas - Portal Embrapa**, 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agricultura-e-meio-ambiente/manejo/recursos-geneticos/bacterias-endofiticas>>. Acesso em: 6 jan. 2025.

FERRAZ, H.G.M.; DEMUNER, G.A.; GUIMARÃES, L.M.S.; ARRIEL, D.A.A.; DA SILVA, A.C.; JUNIOR, N.B.; MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.. Methods of inoculation and evaluation of *Erwinia psidii* in eucalypt. **Forest Pathology** v. 46, p.240–247, 2016.

FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. Controle Biológico de Pragas da Agricultura. *In*: MONNERAT, R. G. *et al.* **Controle de artrópodes-praga com bactérias entomopatogênicas**. 1. ed. Brasília – DF: Embrapa, cap. 6, p.167-200, 2020.

FURTADO, E.L.; SILVA, L.T.P. Manejo das doenças de origem bacteriana no eucalipto. **Revista Opniões**, v.20, n.70, p.54-55, 2023.

GHOZLAN, M.; ARGAWWY, E. L.; TOKGÖZ, S.; LAKSHMAN, D. e MITRA, A. Defesa de plantas contra patógenos necrotróficos. **American Journal of Plant Sciences**, v.11, p.2122-2138, 2020.

HAUBEN, L., *et al.* Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.21, ed.3, p.384-397, 1998.

HERMENEGILDO, P. da S. **Seca de ponteiros causada por *Erwinia psidii***: Diversidade genética do patógeno e resistência em *Eucalyptus* spp. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2015.

IBA (Indústria Brasileira de Árvores). **Relatório Anual**, 2024. Disponível em:<<https://iba.org/publicacoes/relatorios-anuais/>> Acesso em: 10 de ago. 2025.

KAKU, H. Histopathology of red stripe of rice. **Plant Disease**, St.Paul, v. 88, p. 1304-1309, 2004.

KRUGNER, T. L.; AUER, C.G.. Doenças do Eucalipto. in: KIMATI, H. *et al.* **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. Piracicaba – SP: v. 2, 1997.

LAMICHHANE, J.R., *et al.* Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture: A review. **Agronomy of Sustainable Development**, v.38, ed.3, n.28, 2018.

LANNA-FILHO, R.; BIELER, F.L.; JUNIOR, N.B. Survival of *Erwinia psidii* in epiphytic, soil and eucalyptus leaf debris conditions. **Forest Pathology**, 2021.

LONGUE JÚNIOR, D.; COLODETTE, J. L. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Jornal de Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 429-438, 2013.

MARIANO, R. DE L. R.. Bactérias fitopatogênicas pectinoliticas dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas**. Recife, v. 2, P. 121-153, 2005.

MARICONI, F.A.M. Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas. **Defensivos**, v.1, ed.5, 1981.

MARINGONI, A.C. Técnicas em Fitobacteriologia. **Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais (FEPAF)**, Botucatu - SP, 2010.

MARQUES, A.S.A; COELHO, M.V.S.; FERREIRA, M.A; SILVA, V.; DAMASCENO, J.P.S.; MENDES, A.P.; VIEIRA, T. M. Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: níveis de incidência e aspectos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 488–493, 2007.

MONDAL, K. K.; SHANMUGAM, V. Advancements in the diagnosis of bacterial plant pathogens: An overview. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.8, n.1, p.1-11, 2013.

MONTOYA-ESTRADA, C.N.; COSTA, C.R.; BADEL, J.L.; GUIMARÃES, L.M.S.; ALFENAS, A.C. Root infection and aerial colonization of eucalypt host plants by *Erwinia psidii*. **Tropical Plant Pathology**, v.44, p. 251–257, 2019.

MORAES, W.B., *et al.* Potencial impact of the global climate changes on the spatial distribution of risk for the occurrence of eucalyptus rust in Brazil. **Summa Phytopathologica**, v.40, e2, p.144-152, 2014.

MORAIS, L.A.S. Óleos Essenciais no Controle Fitossanitário. *In*: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.139-152, 2009.

NAZZARO, F. *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v.6, ed. 12, p. 1451-1474, 2013.

RAMOS, L.F.N. **Impacto da seca-dos-ponteiros sobre a produção de eucalipto no Mato Grosso do Sul**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2020.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. **Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias**. Embrapa Agrobiologia, 2006.

RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C.F.; YAMASHIRO, T. A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p. 354–350, 1987.

ROMANAZZI, G. *et al.* Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. **Postharvest Biology and Technology**, v.113, p. 69–76, 2016.

SANTOS, C. C. D. **Métodos de inoculação, avaliação da resistência e manejo de *Ralstonia solanacearum* em viveiros de produção de mudas**. Doutorado—Botucatu - SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2020.

SUDO, S.; OLIVEIRA, G.H.N.; PEREIRA, A.C. Eucalipto (*Eucalyptus spp.*) e bracatinga (*Mimosa scabrella Penth*), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* EF SMITH. **Fitopatol.** Sutiãs, v. 8, p. 631, 1983.

TEIXEIRA, A.C.O.; MARQUES, A.S.A.; FERREIRA, M.A.S.V. Baixa diversidade genética entre linhagens patogênicas de *Erwinia psidii* do Brasil. **Braz. J. Microbiol.** v.40, p.678 – 684, 2009.

TRUMAN, R. Die-back of *Eucalyptus citriodora* caused by *Xanthomonas eucalypti*. **PhytopathologyAPS**, v.64, ed.1, 1974.

UC ANR (University of California: Agriculture and Natural Resources). Breve histórico dos pesticidas botânicos e microbianos e seu mercado atual. **E-Journal entomology and biologicals**, 2018.

WALTERS, D. R. *et al.* Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 1263-1280, 2013.

WINGFIELD, M. *et al.* Eucalyptus pests and diseases: Growing threats to plantation productivity. **Southern Forest: A Journal of Forest Science**. v. 70, p. 139-144, 2008.