

**CARLOS CARNEIRO DOS SANTOS**

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO, AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA E MANEJO DE  
*Ralstonia solanacearum* EM VIVEIRO DE PRODUÇÃO DE MUDAS**

**Botucatu**

**2020**



**CARLOS CARNEIRO DOS SANTOS**

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO, AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA E MANEJO DE  
*Ralstonia solanacearum* EM VIVEIRO DE PRODUÇÃO DE MUDAS**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Coorientador: Dr. Marcus Vinicius Masson

**Botucatu**

**2020**

S237m Santos, Carlos Carneiro dos  
Métodos de inoculação, avaliação da resistência e manejo de  
Ralstonia solanacearum em viveiro de produção de mudas / Carlos  
Carneiro dos Santos. -- Botucatu, 2020  
78 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu  
Orientador: Edson Luiz Furtado  
Coorientador: Marcus Vinicius Masson

1. Eucalyptus. 2. Manejo Integrado. 3. Murcha de Ralstonia. 4.  
Vasos xilemáticos. 5. Viveiro. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de  
Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

Título: MÉTODOS DE INOCULAÇÃO, AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA E MANEJO DE *Ralstonia solanacearum* EM VIVEIRO DE PRODUÇÃO DE MUDAS DE EUCALIPTO


AUTOR: CARLOS CARNEIRO DOS SANTOS  
ORIENTADOR: EDSON LUIZ FURTADO  
COORDENADOR: MARCUS VINICIUS MASSON

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA FLORESTAL, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO  
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu - UNESP

  
Dra. CRISTIANE DE PIERI  
Profa. Substituta/Departamento de Proteção Vegetal/FCA / FCA/Unesp Botucatu

  
Pesquisador Dr. (Voluntário) LEO ZIMBACK  
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu

  
Prof. Dr. QUELMO SILVA DE NOVAES  
Fitotecnia e Zootecnia / UESB

  
Dr. DAVID VITOR DOS SANTOS  
Agronomia / UNEMAT

Botucatu, 23 de outubro de 2020.



*Aos meus amados pais,*

*Maria e José*

*Aos meus queridos avós,*

*Maria, José, Evaristo (in memoriam) e Clarice*

*dedico*



## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ouvir minhas orações e sempre me abençoar com muitas graças;

Aos meus pais, pelo apoio em mais uma caminhada;

À minha namorada Rafaella pelo carinho, afeto e companheirismo;

À todos meus familiares pelo apoio;

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Furtado, pela orientação, apoio, paciência, por sempre estar disposto a dividir suas experiências com seus alunos e pelo grande amigo que ganhei;

Ao meu coorientador Dr. Marcus Vinicius Masson, pela dedicação, apoio, incentivo que foi me dado desde o início desta caminhada no doutorado e além de ser um grande amigo, é um profissional incrível que me inspira muito;

Ao Prof. Dr. Quelmo Silva de Novaes, pela força que me deu para dar sequência à pós graduação com o doutorado e por toda amizade;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane de Pieri, por ter me recebido tão bem em Botucatu e pela amizade de uma pessoa que está sempre disposta a ajudar;

Aos amigos e parceiros da Bracell Bahia Florestal Ltda., em especial àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho: Sr. Jacyr, Fabíola, Evany, Dilmara, Selma, Talita, Sidinei, Deivide, Iago, William, Jerônimo, Ricardo, Uashington, Edvaldo, Uelson, Adriano, Fabrício, Wellington, Israel, Elane, José Edson, Oscar, Maurício, Leonardo (RAPP), Mário Ladeira e a todos os colegas da Fábrica da Bracell que nos apoiou;

À Bracell Bahia Florestal Ltda., por ter me dado a oportunidade da realização das pesquisas em suas instalações e ter aberto as portas para minha carreira profissional;

A todos os professores que aceitaram fazer parte da banca e contribuir com este trabalho;

Ao meu grande amigo Manassés, por me incentivar e apoiar em meus mais diversos projetos;

Aos amigos da República Ratoeira, Luís, Renato, Fernando, Charles e Osvaldir, pelo tempo de convívio, preocupações e alegrias compartilhadas;

Aos amigos da República Ktivero;

Aos meus parceiros e parceiras da Clínica de Patologia Florestal: Lisandro, Lucas, David, Anny, Vanusa, Léo Zimback, João Zago, Marília, Jessica e Daniella pela amizade, estudo, troca de experiências e convivência;

À todos os professores da FCA / UNESP-Botucatu pelas boas aulas ministradas e por ampliar meus conhecimentos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela bolsa de estudos concedida durante a realização desta etapa acadêmica (Código de Financiamento 001);

À todos os colegas do doutorado, em especial aos dos Programas de Pós-Graduação em Ciência Florestal e Proteção de Plantas;

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização de mais esta etapa.

**Muito obrigado!**

“Quem semeia pouco colherá também pouco e quem semeia com largueza colherá também com largueza”.

(2 Coríntios 9, 6-7)



## RESUMO

O eucalipto, desde a sua introdução no Brasil, se estabeleceu como o principal cultivo de florestas plantadas em todo o território nacional, principalmente em função de programas de melhoramento genético que possibilitou a adaptação de várias espécies, híbridos, genótipos a diversas regiões do país e com menor tempo de corte. Entretanto, alguns problemas de ordem fitossanitária assolam as espécies e os materiais genéticos produzidos no Brasil e no mundo, com destaque para a murcha bacteriana ocasionada pela bactéria *Ralstonia* sp., bem como os danos econômicos gerados por ela. Entre o ano de 2016 e início de 2017, diversas amostras de eucalipto, oriundas de várias regiões do Brasil, foram enviadas à Clínica de Patologia Florestal da Faculdade de Ciências Agrônômicas / UNESP-Botucatu, para diagnose de material vegetal com suspeita de infecção por essa bactéria. Destas amostras, 86,55% provenientes do estado de São Paulo, 62,50% de Minas Gerais, 58,33% do Mato Grosso do Sul, 60,36% da Bahia, 84,00% do Piauí e 30,23% do Maranhão, foram positivas para a infecção pelo patógeno, demonstrando a ampla disseminação desse microrganismo. Os objetivos deste trabalho foram: desenvolvimento de uma metodologia rápida para *screening* in vitro de genótipos de eucalipto quanto à resistência ao patógeno; analisar a morfologia de vasos xilemáticos e apresentar medidas de manejo preventivo para um viveiro florestal comercial. O isolado 924/19 foi caracterizado por análise morfológica e molecular e, posteriormente, testado a patogenicidade e virulência em plantas indicadoras. Três métodos foram testados para inoculação de explantes: 1- Método de imersão de haste; 2- Método de fermento com inoculação por meio de palito com inóculo bacteriano e; 3- Método de injeção de haste. Realizou-se o *screening* in vitro de quatro genótipos de eucalipto inoculados com *Ralstonia*. Vasos de xilema de três genótipos de eucalipto com e sem infecção da bactéria foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Três metodologias para a desinfestação de *Ralstonia* na água de irrigação (ozonização, radiação ultravioleta e cloração da água) e uma para a assepsia de substrato (termoterapia) foram testadas. Em seguida verificou-se o efeito fitotóxico do cloro em mudas de eucalipto, irrigadas por diferentes concentrações de cloro ativo. Por fim, foi desenvolvido um sistema de assepsia da água do viveiro, chamado de Sistema de Cloração da Água de Irrigação (SCAI) e Câmara de Esterilização de Substrato (CES). Comprovou-se virulência e patogenicidade do isolado de *Ralstonia* 924/19. O método de inoculação por meio de injeção na base do caule foi o mais eficiente. O método rápido para *screening* in vitro é potencialmente funcional e pode ser empregado para avaliação em massa de genótipos de eucalipto em condição de micropropagação, por cultura de tecidos. Não houve diferença no diâmetro dos vasos de xilema de eucalipto de plantas com e sem a bactéria e a oclusão dos vasos por tilose foi dependente da concentração bacteriana na planta. Todos os ensaios apresentaram um ou mais tratamentos eficientes para eliminar a bactéria. A irrigação com água contendo 4 mg/L de cloro induziu fitotoxicidade em mudas de três genótipos de eucalipto. A implantação dos

sistemas de assepsia foi eficaz em erradicar inóculos bacterianos de *Ralstonia solanacearum* da água de irrigação e substrato de um viveiro florestal comercial.

**Palavras-chave:** *Eucalyptus*. Manejo Integrado. Murcha de *Ralstonia*. Vasos xilemáticos. Viveiro.

## ABSTRACT

*Eucalyptus*, since its introduction in Brazil, has established itself as the main cultivation of planted forests throughout the national territory, mainly due to genetic improvement programs that allowed the adaptation of several species, hybrids, genotypes to different regions of the country and with shorter cutting time. However, some phytosanitary problems plague species and genetic materials produced in Brazil and worldwide, with emphasis on the bacterial wilt caused by the bacteria *Ralstonia* sp. and the economic damage generated by it. Between the year 2016 and the beginning of 2017, several samples of eucalyptus, from various regions of Brazil, were sent to the Forest Pathology Clinic of the Faculty of Agronomic Sciences / UNESP, for the diagnosis of plant material suspected of being infected with this bacterium. Of these samples, 86.55% from the state of São Paulo, 62.50% from Minas Gerais, 58.33% from Mato Grosso do Sul, 60.36% from Bahia, 84.00% from Piauí and 30.23% Maranhão, were positive, demonstrating the wide spread of the pathogen. The objectives of this work were: development of a rapid methodology for in vitro screening of eucalyptus genotypes for pathogen resistance; analyze the morphology of xylemic vessels and present preventive management measures for a commercial forest nursery. The 924/19 isolate was characterized by morphological and molecular analysis and subsequently tested for pathogenicity and virulence in indicator plants. Three methods were tested for inoculation of explants: 1- Stem immersion method; 2- Injury wound method with toothpick with bacterial inoculum and; 3- Rod injection method. In vitro screening was carried out on four eucalyptus genotypes inoculated with *Ralstonia*. Xylem vessels of three eucalyptus genotypes with and without bacterial infection were analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM). Three methodologies for disinfecting *Ralstonia* in irrigation water (ozonation, ultraviolet radiation and chlorination of water) and one for substrate asepsis (thermotherapy) were tested. Then the phytotoxic effect of chlorine on eucalyptus seedlings, irrigated by different concentrations of active chlorine, was evaluated. Finally, a nursery water asepsis system called the Irrigation Water Chlorination System (SCAI) and Substrate Sterilization Chamber (CES) was developed. The virulence and pathogenicity of the *Ralstonia* 924/19 isolate was proven. The injection method at the base of the stem was the most efficient. The rapid method for in vitro screening is potentially functional and can be used for mass evaluation of eucalyptus genotypes in micropropagation condition, by tissue culture. There was no difference in the diameter of the eucalyptus xylem pots from plants with and without the bacteria, and the occlusion of the pots by tilose was dependent on the bacterial concentration in the plant. All trials had one or more efficient treatments to eliminate the bacteria. Irrigation with water containing 4 mg/L of chlorine induced phytotoxicity in seedlings of three eucalyptus genotypes. The implementation of asepsis systems was effective in eradicating inoculants of the *Ralstonia solanacearum* bacteria from the irrigation water and substrate of a commercial forest nursery.

**Keywords:** *Eucalyptus*. Integrated Management. *Ralstonia* wilt. Xylemic vessels. Nursery.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	O gênero <i>Eucalyptus</i> .....	20
2.2	Murcha bacteriana do eucalipto.....	21
2.3	Característica sistemáticas da bactéria <i>Ralstonia</i> .....	22
2.4	Ocorrência da murcha bacteriana do eucalipto no Brasil.....	22
2.5	Métodos de detecção da bactéria.....	23
2.6	Novas evidências sobre a <i>Ralstonia</i> no eucalipto.....	24
2.7	Métodos de seleção de plantas resistentes à doenças.....	25
2.8	Medidas de manejo para murcha de <i>Ralstonia</i> .....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	Caracterização da área de estudo .....	27
3.2	Desenvolvimento de um método de <i>screening</i> in vitro e avaliação da resistência de genótipos de eucalipto à <i>Ralstonia</i> .....	27
3.3	Análise morfológica de vasos xilemáticos de eucalipto sob infecção natural de <i>Ralstonia</i> sp. por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	33
3.4	Manejo Integrado da murcha de <i>Ralstonia</i> em Viveiros Florestais.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1	Método rápido de <i>screening</i> in vitro de genótipos de eucalipto quanto a resistência à murcha de <i>Ralstonia</i> .....	39
4.2	Análise da morfologia de vasos xilemáticos de eucalipto sob Infecção natural de <i>Ralstonia</i> por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	48
4.3	Manejo integrado da murcha de <i>Ralstonia</i> em viveiros florestais.....	52
5	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69



## 1 INTRODUÇÃO

O segmento de florestas plantadas no Brasil tem bastante notoriedade, pela significativa área de florestas cultivadas e por garantir que indústrias que têm como matéria prima a madeira, mantenham em níveis contínuos o abastecimento das fábricas de base florestal, as quais requerem uma elevada oferta de madeira para suas produções.

No Brasil, em 2018, a área de florestas plantadas para fins industriais atingiu um total de 7,83 milhões de hectares, mostrando-se uma certa estabilidade em áreas cultivadas quando comparadas aos últimos 3 anos (IBÁ, 2019). As espécies florestais mais plantadas no Brasil para fins de silvicultura continuam sendo as dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*. As áreas plantadas com eucalipto em 2018 atingiram 5,67 milhões de hectares e estão localizadas, principalmente, em Minas Gerais (24%), São Paulo (17%), Mato Grosso do Sul (16%), Bahia (11%), Rio Grande do Sul (5%), Paraná (5%) e demais estados (22%), enquanto os plantios de pinus ocuparam 1,57 milhões de área de madeira plantada (IBÁ, 2019).

Os plantios de eucalipto têm suprido o acréscimo na demanda de matéria-prima utilizada para produção de mourões, postes, carvão vegetal, papel e celulose, óleos essenciais e madeira para serraria, dentre outras finalidades (ALFENAS et al., 2009). Desses insumos derivados do eucalipto, a celulose ocupa maior destaque, colocando o Brasil como o segundo maior produtor do mundo, sendo que 72% da produção nacional é proveniente de madeira de eucalipto (IBÁ, 2019; DEPEC, 2019).

O eucalipto, desde sua introdução no Brasil para fins comerciais, em 1904, pelo silvicultor Edmundo Navarro de Andrade, no estado de São Paulo, manteve-se praticamente livre de doenças até a década de 70 (MARTINI, 2004; MAFIA, 2006; MASSON, 2009). A medida que as áreas plantadas se expandiram para regiões mais quentes e úmidas, o plantio de espécies, procedências, famílias ou clones mais suscetíveis, áreas utilizadas sucessivamente com uma mesma cultura e o estreitamento da base genética favoreceram o surgimento de doenças com incidência em viveiro e campo (ALFENAS e MAFIA, 2003; FURTADO et al., 2009).

A ocorrência de doenças está entre os principais fatores responsáveis pela redução da produtividade das culturas no mundo, sendo geralmente menor nos países desenvolvidos e mais elevadas nos países em desenvolvimento (AGRIOS,

2005). O ataque de patógenos a espécies e clones de eucalipto pode ocorrer tanto nas fases iniciais de vida em viveiros, quanto na fase adulta em campo. Dentre esses patógenos que causam doenças no eucalipto, os fungos são frequentemente reportados como os que mais provocam doenças nas espécies florestais. Porém, no eucalipto, as doenças incitadas por bactérias merecem atenção, sendo que algumas espécies se destacam mais na fase de viveiro e outras estão presentes em toda a fase de desenvolvimento da planta (PIERI et al., 2017).

Um importante patógeno para a cultura do eucalipto é a bactéria *Ralstonia* spp. (SMITH, 1896) a qual provoca a doença conhecida por murcha bacteriana (YABUUCHI et al, 1995). O primeiro relato da ocorrência de murcha bacteriana em eucalipto no Brasil foi registrado por Sudo et al. (1983), que no início dos anos 80 relataram a enfermidade em cultivos no município de Prata-MG. Novos relatos em plantios de eucalipto ocorreram na Companhia Monte Dourado, no Pará (atual Jari Celulose), em 1984 e, posteriormente, na Camargo Corrêa (Tucuruí, Pará) e na Copener, localizada no litoral Norte da Bahia (ROBBS et al., 1988). Além do Brasil, a doença já foi constatada na África do Sul, Austrália, China, Indonésia, Taiwan e Venezuela (COUTINHO et al., 2000).

Patógenos bacterianos causam perdas substanciais na produtividade das principais plantas cultivadas. Ao contrário dos agentes patogênicos fúngicos, os agentes patogênicos bacterianos, ainda não podem ser contidos de forma tão eficaz por meio de métodos químicos (MONDAL e SHANMUGAM, 2013). A ocorrência da bactéria *Ralstonia* em eucalipto, quando comparada aos relatos do patógeno a culturas agrícolas, é considerada relativamente nova e ainda necessitando de um melhor entendimento do patossistema. O manejo adequado e eficiente para determinada enfermidade de plantas exige um conhecimento mais aprofundado sobre o patógeno e como ele age sob seu hospedeiro, para que então sejam adotadas medidas de controle da doença.

As espécies de eucalipto, que no Brasil chegaram, vêm sendo aperfeiçoadas, ao longo dos anos, desde a sua introdução, por melhoristas florestais. Foram atribuídas novas características genóticas e fenotípicas, híbridos, clones, adaptações nas mais diversas regiões do país, promovendo redução no tempo de corte que, por consequência, se estabeleceu como o principal cultivo de florestas plantadas no território nacional. Entretanto, com o passar das décadas, a cultura do eucalipto começou a apresentar muitos problemas de ordem fitossanitária em todas

as espécies e genótipos produzidos no Brasil e no mundo, sendo as doenças vasculares bastante preocupantes para a cultura, com ênfase à murcha bacteriana ocasionada por *Ralstonia* sp. Apesar da bactéria ainda não ser um patógeno limitante aos plantios comerciais de companhias florestais, sendo os danos e perdas, em maior proporção, ocorrentes em viveiros de mudas, mais estudos são necessários para melhor compreensão desse importante patossistema, afim de desenvolver medidas de manejo eficientes que possam ser reproduzidas com sucesso por toda a cadeia florestal, principal beneficiário do setor. Diante disso, os objetivos deste trabalho foram: desenvolvimento de um método de *screening* “in vitro” de genótipos de eucalipto em fase de micropropagação e avaliar resistência à *Ralstonia*; analisar a morfologia de vasos xilemáticos de três genótipos de eucalipto infectados naturalmente em campo pela bactéria; desenvolvimento de um sistema de assepsia para água de irrigação e substrato dentro de um viveiro florestal comercial.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O gênero *Eucalyptus*

Devido ao seu rápido crescimento, rotação curta, alta produtividade, adaptabilidade a uma ampla variedade de ambientes e por ser matéria prima base para a produção, sobretudo, de papel e celulose, as espécies e híbridos de eucalipto são uns dos materiais genéticos mais plantados em todo mundo, abrangendo as regiões tropicais, subtropicais e temperadas (MYBURG et al., 2007). No Brasil, em um período de nove anos, a área plantada com eucalipto teve um crescimento de cerca de 18%, saindo de 4,65 milhões de hectares em 2009, para 5,67 milhões de hectares plantados em 2018, sendo, atualmente, as regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Sul as áreas mais plantadas com o eucalipto no Brasil, respectivamente (IBÁ, 2019).

O eucalipto é originário da Austrália, Indonésia e ilhas próximas a essas regiões, pertencente à família Myrtaceae, sub-família Leptospermoideae e abrange cerca de 600 espécies, variedades e híbridos (STEANEA et al., 2011). As espécies mais cultivadas no Brasil são *Eucalyptus grandis* (W. Hill ex Maiden), *Corymbia citriodora* (L.), *E. camaldulensis* (Dehnh.), *E. saligna* (Smith), *E. urophylla* (S.T. Blake), com destaque para os híbridos *E. urophylla* x *E. grandis*, conhecidos por “urograndis” (MARQUES, 2012). Mais de 21 espécies de eucalipto com boas características silviculturais que atendam às necessidades do produtor e que sejam indicadas para determinada região podem ser utilizadas (CRESTANA e MOREIRA, 2009).

O estabelecimento da eucaliptocultura no Brasil se deu pelo fato das condições edafoclimáticas do território nacional serem propícias para seu desenvolvimento, podendo ser cultivado em terrenos com baixa fertilidade natural, entretanto, não recomendado para cultivo em solos rasos e com excesso de água (ROCHA et al., 2015). Com o melhoramento genético da cultura nos últimos anos, para a maioria das espécies plantadas, a colheita ocorre após seis ou sete anos (BRACELPA, 2011). As plantações de eucalipto no Brasil quando da análise ambiental, contribuem positivamente para a manutenção das florestas nativas, pois viabiliza a produção de madeira, atendendo às expectativas da economia nacional e

internacional, além de determinante para a sustentabilidade ambiental (MORAES, 2010).

## **2.2 Murcha bacteriana do eucalipto**

A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia* spp., constituiu-se como uma importante doença para a cultura do eucalipto, não só no Brasil, como também tem sido relatada em várias partes do mundo. Sendo possível encontrar relatos de sua ocorrência em regiões consideradas como grandes produtoras de eucalipto no mundo, como África do Sul, Austrália, China, Indonésia, Taiwan e Venezuela (COUTINHO et al., 2000).

Essa enfermidade afeta diretamente o sistema vascular, entupindo os vasos condutores, responsáveis pela translocação de água e sais minerais das raízes até o ápice da planta. Fato esse, que torna a murcha bacteriana como uma das doenças de plantas mais destrutivas do mundo (COUTINHO e WINGFIELD, 2017).

Embora a doença seja também encontrada em viveiros de produção de mudas de eucalipto, é depois de transplantada para o campo que as mudas infectadas, comumente, manifestam os sintomas em árvores jovens. Afeta o seu desenvolvimento e, quando encontrada condições favoráveis e altos índices de concentrações de colônias bacterianas nos tecidos internos do hospedeiro, pode levar a planta à morte. É comum também, que a área de plantio já esteja infestada pela bactéria e que as mudas de eucalipto sadias sejam infectadas após o plantio (PIERI et al., 2017).

Os sintomas característicos da doença no eucalipto são diferentes em viveiros e plantas no campo (ALFENAS et al., 2006). No viveiro, os sintomas em minicepas e mudas caracterizam por: escurecimento da base do caule, necrose das folhas e dos ramos, murchamento e morte da raiz (COUTINHO e WINGFIELD, 2017). No campo, as árvores começam a apresentar sintomas, geralmente, após 3 meses do plantio com o surgimento de murcha descendente (do ápice para baixo) das folhas, raízes necrosadas, entupimento dos vasos do xilema, os ramos e hastes tornam-se escuros e, a partir de cortes basais no caule ou raiz, quando em altas concentrações do patógeno nos tecidos do hospedeiro, pode ser observado exsudação de pus bacteriano (ALFENAS et al., 2006; FURTADO et al., 2009).

### 2.3 Característica sistemáticas da bactéria *Ralstonia*

Trata-se de um patógeno habitante de solo, cosmopolita e muito agressivo aos hospedeiros os quais infecta, abrangendo culturas de alto valor econômico. Incide em mais de 200 espécies de plantas, englobando aproximadamente 50 famílias botânicas (HAYWARD, 2000). A *Ralstonia* pertence ao Domínio Bactéria, Filo Proteobactéria, Classe Betaproteobactéria, Ordem Burkholderiales e Família Burkholderiaceae. É uma bactéria gram-negativa, aeróbica, bastonetiforme, móvel por flagelos polares, não fluorescente e é catalase e oxidase positiva (GARRITY et al., 2005; EPPO, 2004).

Por ser uma espécie bastante complexa, de elevado grau de variabilidade, tem sido classificada em cinco raças, em anuência a gama de hospedeiros e cinco biovars, de acordo com testes bioquímicos, que se baseiam na utilização de três açúcares e três álcoois (PINHEIRO, 2010). No eucalipto, a classificação mais comumente utilizada é quanto ao biovar da bactéria. Com base nessa classificação, todos os relatos de *R. solanacearum* na cultura, relaciona a biovar 1 como a variante que infecta eucaliptos na América do Sul e biovar 3 na Ásia, Oceania e África (MARQUES, 2012). No entanto, no Brasil, um estudo realizado por Marques et al. (2009) descreveram que plantios jovens de eucalipto no município de Alexânia – GO, apresentavam sintomas de murcha, os quais foram relacionados como causados por *R. solanacearum* biovar 2.

Com base em técnicas moleculares, utilizando variantes da PCR (Polymerase Chain Reaction), Fegan e Prior (2005) classificaram estirpes de *Ralstonia* spp. atribuindo-lhes o filotipo com base na origem geográfica da bactéria. O filótipo I, como aqueles que incluem isolados originário da Ásia; o filótipo II, isolados das Américas; o filótipo III, os da África e por fim, o filótipo IV, que engloba isolados da Indonésia Austrália e Japão. Esta classificação tem se mostrado de fácil empregabilidade e bastante eficaz para separar populações do patógeno (CARSTENSEN et al., 2017).

### 2.4 Ocorrência da murcha bacteriana do eucalipto no Brasil

O primeiro relato de ocorrência de murcha bacteriana em eucalipto no Brasil foi registrado por Sudo et al. (1983), reportando a ocorrência da doença já no início dos

anos 80 em plantios de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) no município de Prata – Minas Gerais. Nos anos seguintes a enfermidade foi reportada nos estados do Pará e Bahia (DIANESE e TAKATSU 1985; ROBBS et al., 1988). Já na década de 2000, Alfenas et al. (2006) relataram a ocorrência de *Ralstonia solanacearum* em eucaliptos nos estados do Espírito Santo e Maranhão. Em seguida, o patógeno foi novamente descrito em plantios de *Eucalyptus grandis* no estado de Santa Catarina (AUER et al., 2008) e no ano de 2009 no estado de Goiás (MARQUES et al., 2009).

Com os elevados relatos de ocorrência da bactéria incidindo sobre cultura do eucalipto em diversas regiões do Brasil, e a alta demanda por diagnose de materiais com suspeita de infecção por *Ralstonia* sp., recebida pela Clínica de Patologia Florestal da Faculdade de Ciências Agronômicas / UNESP – Botucatu, um levantamento considerando, apenas, amostras de material genético vegetal (*Eucalyptus* spp.), no período de 2016 e início de 2017, foi realizado para verificar o quanto dessas amostras, de um total de 100%, enviadas por cada estado, eram positivas para a bactéria. Por meio de análises de isolamento da bactéria em meio semi-seletivo e por método de detecção molecular (PCR), desses materiais, foi constatado que dessas amostras, 86,55% oriundas do estado de São Paulo, 62,50% de Minas Gerais, 58,33% do Mato Grosso do Sul, 60,36% da Bahia, 84,00% do Piauí e 30,23% do Maranhão, eram positivas para *Ralstonia*.

## **2.5 Métodos de detecção da bactéria**

Os métodos de detecção e a identificação de patógenos é um passo importante para se chegar à diagnose correta de determinados microrganismos, o que pode envolver a utilização de vários métodos. Um método bastante recorrente é realizar o isolamento da bactéria em meios de cultivos seletivos (NESMITH e JENKINS JR., 1979) ou ainda em meio diferencial (KELMAN, 1954). Outra forma de diagnóstico disponível que atualmente é empregado para detectar e confirmar o isolado como sendo *Ralstonia* sp., é através de técnicas moleculares (MORISSET, et al., 2014). As técnicas moleculares se baseiam na amplificação do DNA bacteriano (WELLER et al., 2000; SEAL et al., 1993) ou RNA de células bacterianas viáveis para a detecção do patógeno (BENTSINK, et al., 2002).

Dessas técnicas, a PCR (Polymerase Chain Reaction) e suas variações, é o método molecular mais utilizado e confiável para identificar e detectar patógenos através da amplificação do ácido nucleico. As técnicas baseadas em ácido nucleico são amplamente reconhecidas e poderosas na detecção de patógenos de plantas. A região alvo mais explorada para diagnóstico bacteriano é o DNA ribossômico, que está presente em todas as bactérias com alto número de cópias por genoma e com regiões altamente conservadas, permitindo uma detecção muito sensível (MONDAL et al., 2004). Uma dessas variações da PCR que vem sendo recorrentemente utilizada para separar espécies de *Ralstonia* é por meio da técnica conhecida por PCR Multiplex (BERTOLINI et al., 2003). O método, conhecido também como, filotipagem, é útil para a detecção simultânea de múltiplos isolados numa única reação. Na reação multiplex é utilizado mais do que um conjunto de primers e a reação multiplex pode ser executada em termociclador de PCR convencional. O método de filotipagem agrupa um isolado em um dos quatro filotipos propostos por Fegan e Prior (2005) e, dependendo do grupo filotípico de um isolado, as espécies podem ser identificadas.

## **2.6 Novas evidências sobre a *Ralstonia* no eucalipto**

A murcha bacteriana do eucalipto quando comparada com outras culturas a exemplo da batata e do tomate, que também são acometidas por *Ralstonia* spp., é relativamente recente. Muitos estudos estão sendo realizados no mundo inteiro, principalmente, em países produtores de eucalipto com intuito de melhor se compreender o patossistema *Ralstonia* - eucalipto. Pesquisas realizadas por Carstensen et al. (2017) com a finalidade de identificar as espécies de *Ralstonia* que estão associadas a murcha bacteriana de eucaliptos que crescem em diferentes partes do mundo, revelaram uma recente reclassificação para a bactéria. Os resultados mostraram que existem duas espécies de *Ralstonia* associadas a murcha bacteriana do eucalipto, a saber, *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*, o que indica, possivelmente, que os isolados oriundos da América do Sul são representados por *R. solanacearum* e os da África e Ásia, *R. pseudosolanacearum*. Recentemente foi relatado que plantios de eucalipto, no Brasil, estavam infectados pela bactéria *R. pseudosolanacearum*. Esse é o primeiro relato de infecção de eucaliptos no Brasil por esta espécie, e se deu a partir de levantamento realizado em

plantações de *Eucalyptus urophylla* com sintomas de murcha, localizado no município de Dom Eliseu, no estado do Pará. As amostras foram coletadas e analisadas pela técnica de PCR multiplex, com posterior confirmação de *R. pseudosolanacearum* (FREITAS et al., 2020).

Estudos apontam que na cultura do eucalipto, algumas plantas que apresentam sintomas de murcha de *Ralstonia*, passaram por algum tipo de estresse, geralmente relacionados a má formação do sistema radicular, tratos silviculturais inadequados, déficit hídrico, presença de outros patógenos que interagem com a colonização do hospedeiro, e em razão disso, as espécies *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*, foram classificadas como patógenos oportunistas na cultura do eucalipto (COUTINHO e WINGFIELD, 2017).

## **2.7 Métodos de seleção de plantas resistentes à doença**

Desde os primórdios da agricultura já existiam métodos para selecionar plantas resistentes e/ou tolerantes à doenças. Para o sucesso na seleção de fontes de resistência, os produtores de plantas em cooperação com fitopatologistas devem primeiro decidir sobre as prioridades e metodologias no melhoramento para resistência à doenças. Um conhecimento básico sobre a biologia do agente causal e sua relação com a planta hospedeira é essencial. Essa informação é necessária para o desenvolvimento de métodos adequados de screening e a seleção correta de plantas resistentes (RUSSELL, 1978). Existe uma ampla gama de diferentes abordagens metodológicas disponíveis para detectar genótipos resistentes e selecionar plantas capazes de tolerar ao ataque de determinado patógeno, entre os quais o screening in vitro é um dos métodos com resultados mais rápidos e vem se mostrando promissor (SVABOVÁ e LEBEDA, 2005).

Diferentes técnicas já foram desenvolvidas para screening in vitro de planta quanto à resistência a microrganismos fitopatogênicos. Em geral, plantas intactas ou várias partes de plantas em condições de micropropagação podem ser usadas para aplicação de um ou mais agentes de seleção em testes de resistência in vitro. Os explantes podem ser cultivados em tubos ou vasos com solução nutritiva e ágar inoculado com o fitopatógeno e depois avaliados (LEBEDA e BUCZKOWSKI, 1986).

## **2.8 Medidas de manejo para murcha de *Ralstonia***

A bactéria *Ralstonia* é um patógeno habitante de solo e seu controle para plantios de eucalipto no campo é muito dificultado por não haver métodos químicos com ação preventiva ou curativa eficiente, e pelo fato de aplicações de métodos físicos ou culturais torna-se inviável pelas extensões das áreas de plantios. Atualmente, o manejo para essa enfermidade tem se concentrado em impedir a entrada da bactéria nos viveiros de produção de mudas, adotando medidas rígidas de sanidade dentro desse ambiente e a seu entorno. Outra medida de manejo que vem sendo empregada, caso a bactéria já esteja presente, é a termoterapia branda das plantas através de instalações de mini-túneis nos minijardins clonais.

Cuidados especiais devem ser dados às plantas e à água de irrigação contaminadas, por risco de rápida disseminação do patógeno. Deve-se evitar levar mudas infectadas para transplante em campo, isolar fontes primárias de inóculo e fazer somente o plantio em áreas onde não há histórico da doença (ALFENAS et al., 2006). Aliado a essas medidas, deve-se adotar métodos que garantam que as matrizes do minijardim clonal estejam livres da bactéria, formando plantas somente oriundas de micropropagação e que passaram por limpeza clonal.

De fato, o que já foi estudado até o presente momento não se deve empregar à todos os casos, tornando as medidas de controle pontuais e adaptativos à realidade de cada local (HAYWARD, 1991). As ações preventivas são necessárias e devem ser empregadas como parte do manejo integrado de doenças.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Caracterização da área de estudo

Os experimentos foram conduzidos na Clínica de Patologia Florestal (FCA/UNESP-Botucatu); Laboratório de Fitopatologia e Diagnose Molecular, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, viveiro e talhões de plantio comercial de eucalipto, pertencente à empresa Bracell Bahia Florestal Ltda., localizada no município de Alagoinhas, inserida na região do Litoral Norte do estado da Bahia. O estudo morfológico de vasos do xilema, de diferentes genótipos de eucalipto, foi realizado em parceria com o Laboratório de Tecnologia da Madeira, Núcleo de Microscopia e Microanálises da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e Laboratório de Microscopia Eletrônica da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP).

#### 3.2 Desenvolvimento de um método de *screening* in vitro e avaliação da resistência de genótipos de eucalipto à *Ralstonia*

Com o objetivo de realizar uma avaliação precoce de genótipos de eucalipto quanto à resistência à murcha de *Ralstonia* ainda em fase de alongamento de explantes pela técnica de cultura de tecidos, foi desenvolvida uma técnica rápida para *screening* de diferentes materiais genéticos de eucalipto.

##### 3.2.1 Isolado de *Ralstonia*

Para a inoculação do patógeno nos explantes foi utilizado o isolado de *Ralstonia solanacearum* (924/19). O isolado 924/19 foi obtido a partir de segmentos do caule de eucalipto sintomático em campo e com exsudação de pús bacteriano. Segmentos do caule foram inicialmente lavados em água corrente com detergente e, posteriormente, os fragmentos foram imersos em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto, tríplice lavagem com água esterilizada, seguida de maceração em almofariz e pistilo contendo água esterilizada. Realizaou-se o plaqueamento em meio de cultura Kelman com adição de tetrazólio (caseína hidrolisada, peptona, glucose, ágar e cloreto de trifetil tetrazólio) (meio TZC)

(KELMAN, 1954), e incubado em câmara tipo BOD a 29°C com fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro. Posteriormente, as colônias foram preservadas em meio Castellani, em glicerol 15% e congeladas a -80°C em ultrafreezer.

### 3.2.2 Detecção do isolado 924/19 por PCR (Polymerase Chain Reaction)

À partir de suspensão de colônias puras, foi realizada a amplificação por PCR de um fragmento do rDNA da região 16S com aproximadamente 280 pares de base (pb), utilizando os primers (759 / 5'- GTCGCCGTCAACTCACTTTCC - 3' e 760 / 5'- GTCGCCGTGTCAGCAATGCGGAATCG -3) (OPINA et al. 1997). As reações foram ajustadas para um volume final de 10 µL contendo: 5 µL de Go Taq® Green Master Mix (Promega Corporation), 1 µL de cada um dos primers de uma solução estoque de 10 µM, 1 µL de suspensão bacteriana (DNA template contendo aproximadamente 100 ng), e 2 µL de água ultrapura. Em seguida as amostras foram submetidas à amplificação em Termociclador Eppendorf Nexus GSX1. O ciclo consistiu em: inicialmente aquecidas a 94 °C por 2 min, posteriormente submetidas a 35 ciclos de 94 °C por 45 s para desnaturação, 30 s a 59 °C para o anelamento dos primers e 72 °C por 30 s para extensão e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Como controle positivo foi utilizado o DNA purificado de estirpe de *Ralstonia solanacearum* (IBSBF 33) e como controle negativo, água esterilizada. Os produtos da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose a 1% em Tris Boro EDTA (TBE 0,5x), corado com Gel Red (Biotium) e ao final, foi visualizado e fotodocumentado por meio do equipamento Locus L.Pix EX.

### 3.2.3 Reação de hipersensibilidade

O isolado foi testado quanto à reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* L. 'Havana 425'). Para a realização do teste de reação de hipersensibilidade, inicialmente, o isolado foi crescido em meio de cultivo Kelman com adição de tetrazólio (KELMAN, 1954) e posteriormente incubado em câmara tipo BOD a 29°C, com fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro por 48 h e após esse tempo, foram selecionadas colônias com aspectos morfológicos de colônias virulentas (centro vermelho e bordas brancas). Em seguida as colônias selecionadas foram novamente multiplicadas em meio Kelman com tetrazólio e mantidas em

câmara tipo BOD nas mesmas condições anteriormente citadas, por 48h. Posteriormente foi preparada uma suspensão bacteriana de aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  ufc/ml e com o auxílio de uma seringa hipodérmica de 1 mL de capacidade, as folhas de tabaco foram levemente feridas com a agulha e depois infiltradas na face abaxial, sem agulha. Após 24h da inoculação, necrose localizada observada na área infiltrada, foi considerada como evidência de reação de hipersensibilidade positiva (adaptado de MARQUES, 2012; ALFENAS et al., 2006).

### **3.2.4 Teste de patogenicidade**

A patogenicidade do isolado foi realizada em mudas de eucalipto e tomateiro. As mudas de eucalipto foram inoculadas pelo método de injeção direta de células bacterianas na base do caule. Realizou-se um corte inclinado para baixo com 3 mm de profundidade, a 5 cm acima do coleto, com um bisturi esterilizado, e em seguida a parte interna do ferimento foi tocada com o bisturi manchado pelo inóculo bacteriano proveniente do mesmo crescimento bacteriano anterior. Após a inoculação, o corte foi vedado com algodão umedecido e parafilme (adaptado de FONSECA et al., 2016). O caule da testemunha foi lesionado e tocado apenas com água esterilizada. Para a muda de tomateiro a inoculação foi realizada com a mesma suspensão bacteriana que foi preparada para o teste de reação de hipersensibilidade. Com auxílio de uma seringa hipodérmica de 1 ml com a agulha, foi injetado 25  $\mu$ L de suspensão bacteriana a 3 cm acima da base do caule. Para a testemunha, injetou-se água esterilizada. As plantas foram mantidas a uma temperatura de 29°C. Em seguida foram observadas manifestações dos sintomas de murchas e depois realizado o reisolamento da bactéria para concretizar os Postulados de Koch (KOCH, 1876).

### **3.2.5 Preparo do material vegetal**

Para a propagação de explantes por meio da técnica de micropropagação, foi utilizado material genético clonal comercial de *Eucalyptus urophylla*. A introdução das plantas in vitro no laboratório de cultura de tecido foi realizada, inicialmente, com o processo de desinfestação das estacas de eucalipto utilizando hipoclorito de sódio e fungicida (informação confidencial). As gemas axiliares foram excisadas e

inoculadas em meio de cultura WPW modificado com adição dos hormônios BAP (6-Benzilaminopurina) e ANA (ácido naftaleno acético) (informação confidencial), sendo subcultivado por um período de 10 meses com mudança de meio de cultura a cada 30 dias. Este, processo necessário para garantir a limpeza clonal. Nessa fase, os explantes foram mantidos a 26°C com fotoperíodo de 16 h de luz com intensidade de  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  e 8h de escuro. Após essa etapa, os materiais foram multiplicados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescentando os hormônios BAP (6-Benzilaminopurina) e ANA (ácido naftaleno acético) (informação confidencial), permanecendo neste meio por 30 dias e mantidas as condições de 26°C, fotoperíodo de 16 h de luz com intensidade de  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  e 8h de escuro. Após 30 dias de multiplicação, os explantes foram repicados e inoculados em meio de alongamento, MS suplementado dos hormônios BAP (6-Benzilaminopurina) e AIB (ácido Indol Butírico), em potes plásticos (500 mL) do tipo Osmotec<sup>®</sup>, permanecendo nesse meio por 30 dias, e posteriormente repicados nesse mesmo meio pelo mesmo período, com a temperatura modificada para 30°C. Os explantes de eucalipto alongados por 30 dias foram usados para o desenvolvimento de metodologia de inoculação in vitro e posterior realização de *screening*.

### 3.2.6 Preparo de suspensões bacterianas para inoculação dos explantes

Uma colônia do isolado 924/19 foi repicada em 25 mL de meio TZC (KELMAN, 1954) e cultivada a 29°C, fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro, por 48h. Em seguida, à partir de colônias virulentas foi preparada a suspensão bacteriana, ajustada para aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  ufc/mL com água esterilizada. Inóculo com 48h de crescimento foi utilizado em todos os experimentos, a fim de ter alto potencial virulento do patógeno.

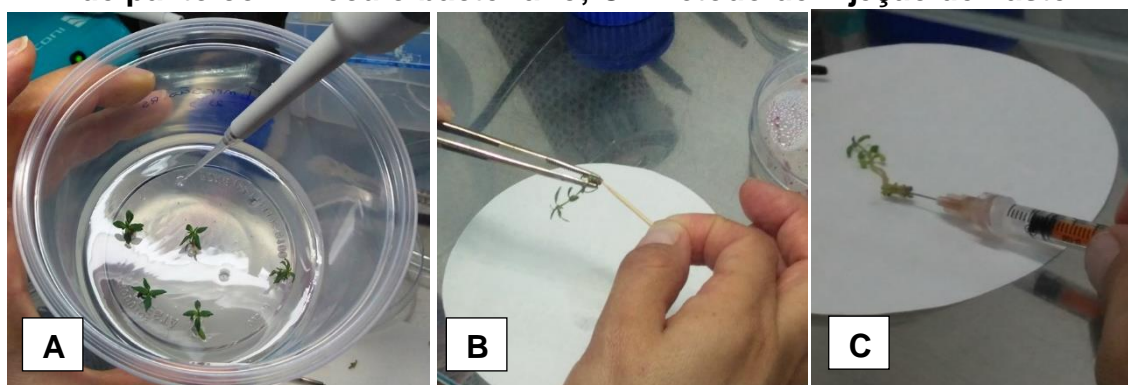
### 3.2.7 Métodos de inoculação

As plântulas in vitro de eucalipto com 30 dias de subcultivo em meio de alongamento foram removidas com a ajuda de pinças estéreis e inoculadas com o isolado de *Ralstonia solanacearum* (924/19). Três procedimentos de inoculação foram avaliados (Figura 1):

- i. Método de imersão de haste – A base da haste das plântulas *in vitro* foram cortadas transversalmente usando um bisturi estéril e depois cultivadas em pocinhos com 5 µL de suspensão bacteriana em um novo pote com meio de alongamento. As culturas foram incubadas em câmara tipo BOD a 30°C com fotoperíodo de 16 h de luz e 8h de escuro. As hastes lesionadas das plântulas controle foram cultivadas em pocinhos com água esterilizada.
- ii. Método de ferimento com inoculação por meio de palito com inóculo bacteriano - A base da haste dos explantes foram cortadas transversalmente usando um bisturi estéril e em seguida tocadas pelo palito com a ponta contendo inóculo bacteriano proveniente de colônias virulentas. Os explantes controle foram tocados com palito e a ponta contendo água esterilizada. Os explantes foram então cultivados em recipientes com meio de alongamento e incubados nas mesmas condições do método 1.
- iii. Método de injeção de haste - 5 µl de suspensão bacteriana foram injetados na parte basal do caule de plântulas “*in vitro*”, utilizando uma seringa hipodérmica de 1 mL equipada com uma agulha. Nas plântulas controle foram injetadas apenas com água esterilizada. Posteriormente as plântulas foram cultivadas em potes com meio de alongamento e incubadas nas mesmas condições do primeiro método (adaptado de TRIPATHI et al., 2008).

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar. Foram utilizadas 10 plântulas para cada tratamento. Avaliou-se a incidência (quantidade de explantes murchos / quantidade de explantes inoculados x 100) diariamente até o surgimento dos sintomas de murcha completa e morte das plântulas.

**Figura 1 - Métodos de inoculação de *Ralstonia* em explantes de eucalipto: A - Método de imersão de haste; B – Método de fermento com inoculação através de palito com inóculo bacteriano; C - Método de injeção de haste**



### 3.2.8 Screening para resistência em plântulas de eucalipto in vitro

Quatro genótipos de eucalipto, sendo genótipo 1 (híbrido de *Eucalyptus* spp.), genótipo 2 (híbrido de *Eucalyptus urophylla*), genótipo 3 (híbrido de *Eucalyptus urophylla*) e genótipo 4 (híbrido de *Eucalyptus pellita*) foram multiplicados e alongados em condições de micropropagação da mesma forma já citada no item 3.2.5. Os genótipos foram inoculados com o isolado de *Ralstonia* (924/19) pelo método de injeção de inóculo na base do caule dos explantes. Dez explantes de cada material genético foram inoculados com a suspensão bacteriana, enquanto os explantes controle foram inoculados com água esterilizada. Em seguida foram mantidas em câmara tipo BOD a 29°C com fotoperíodo de 16h de luz e 8h de escuro.

#### 3.2.8.1 Avaliação da resistência dos genótipos de eucalipto

As plântulas foram avaliadas diariamente por 20 dias quanto à ocorrência dos sintomas iniciais de murcha (epinastia) e murcha completa. Em seguida procedeu-se com o reisolamento da bactéria dos explantes murchos e, posteriormente, realizou-se a detecção por PCR. A incidência de murcha foi medida pelo número de plantas murchas / número total de plantas inoculadas \* 100. O nível de resistência e suscetibilidade foi realizado com base na incidência de murcha. Considerou-se: Resistente (R) – Ausência de plantas murchas; Moderadamente resistente (MR) - <50% de plantas murchas; Moderadamente suscetível (MS) – 50 ≥ 70% de plantas

murchas; Susceptível (S) -  $71 \geq 100\%$  de plantas murchas. (Adaptado de MAFIA et al., 2014).

### **3.2.8.2 Delineamento experimental e análise estatística**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 10 repetições e, repetido 2 vezes. Para comparar a média dos dois experimentos foi realizado teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Os dados de incidência foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo posteriormente analisado pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade, realizadas pelo software estatístico PAST, Versão 4,03 (HAMMER et al., 2020).

## **3.3 Análise morfológica de vasos xilemáticos de eucalipto sob infecção natural de *Ralstonia solanacearum* por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

### **3.3.1 Identificação de plantas no campo com e sem *Ralstonia solanacearum***

Três materiais genéticos de eucalipto, genótipo 1 (híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*), genótipo 2 (híbrido de *Eucalyptus urophylla*) e genótipo 3 (híbrido de *Eucalyptus* spp.) foram selecionados para esse ensaio. Inicialmente, foram alocadas em campo parcelas de 6 x 6 plantas, com aproveitamento de 20 plantas úteis, em plantios comerciais de eucalipto com aproximadamente 1 ano de idade. De cada planta, foram coletados os ramos basais (realizando-se a assepsia dos instrumentos de cortes com hipoclorito de sódio <NaClO> a 1% de concentração <m/V> para cada planta) e levados para o laboratório para identificação de plantas positivas e negativas para *R. solanacearum*. Realizou-se o isolamento do material vegetal coletado em meio de cultivo semi-seletivo para *Ralstonia* (meio TZC), seguindo os mesmos procedimentos de isolamento já citado no item 3.2.1. Em seguida, para cada isolado com crescimento bacteriano, foi realizada uma PCR para confirmação da bactéria. A PCR seguiu os mesmos métodos do subitem 3.2.2, porém, com o par de primer (PS1/ 5'-AGTCGAACGGCAGCGGGG -3' e PS2/ 5'-GGGGATTTACATCGGTCTTGCA -3') (PASTRIK e MAISS, 2000).

### 3.3.2 Coleta de amostras

A partir da identificação de quais plantas na parcela estavam infectadas naturalmente com *R. solanacearum*, foram abatidas, para cada clone, 2 plantas positivas e 2 negativas para a bactéria confirmadas por PCR. De cada planta, a partir de cortes em sentido transversal, com auxílio de uma motosserra, foi retirado um disco a 10 cm da base do caule e levados para o laboratório para preparação e fixação das amostras no mesmo dia. Procedimento realizado para garantir a conservação do material biológico.

### 3.3.3 Preparo de amostras e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

De cada disco foram retirados 3 fragmentos com aproximadamente 1 a 2 cm<sup>2</sup> e, fixados em solução Karnovsky (16% de paraformaldeído + 3% de glutaraldeído em tampão cacodilato a 0.2 M, pH de 7,2) por 48h. Após 2 dias, os fragmentos foram retirados da solução fixadora e a superfície de observação de cada espécime foi melhorada por meio de cortes de até 1 mm em sentido transversal, utilizando um micrótomo deslizante Leica. Em seguida, os espécimes foram devolvidos para a solução fixadora e armazenados em geladeira até a etapa da realização de MEV. Subsequentemente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato (0.05 M) por 10 minutos, repetindo a lavagem três vezes. Posteriormente, foram desidratadas em séries crescentes de concentração de etanol (30%, 50%, 70%, 90% - 10 minutos cada, e 100% por três vezes de 10 minutos) e, para completar a secagem, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico (Leica CPD300). As amostras secas foram montadas em "stubs" com fita de carbono dupla face para aderência das amostras e cobertas com 20 nm de ouro em aparelho Baltec (SCD 050). Logo após, foram examinadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss (DSM 940 A). A condição operacional padrão do MEV era 10 kV, ocasionalmente, no entanto, as condições foram ajustadas na faixa de 5 e 20 kV para otimizar as observações (modificado de FRITSCHI et al., 2008).

### 3.3.4 Tamanho de vasos xilemático, ocorrência de tilose e análise estatística

Ao todo, 50 vasos de xilema, de cada material genético com e sem infecção por *Ralstonia*, foram selecionados aleatoriamente e medidos quanto ao tamanho de diâmetro com o auxílio do software de análise e processamento de imagens ImageJ, versão 1.51W. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey (significância de 5 %) com o auxílio do programa estatístico SASM-Agri, versão 8.2 (CANTERI et al., 2001).

### **3.4 Manejo Integrado da murcha de *Ralstonia* em Viveiros Florestais**

Para o desenvolvimento e implantação de um sistema acurado de assepsia em um viveiro comercial de mudas de eucalipto com capacidade para a produção de 20 milhões de mudas por ano, três metodologias para a desinfestação da água de irrigação e uma para a esterilização de substrato foram testadas para erradicação de inóculos de *Ralstonia* e, posteriormente, montagem dos protótipos no viveiro.

#### **3.4.1 Desinfestação da água por Ozonização**

Para a realização do ensaio, foi utilizado um sistema de ozonização, cujo gás Ozônio <O<sub>3</sub>> foi obtido por meio de um gerador de ozônio (modelo N202F, com capacidade de geração de ozônio de 500 mg/h). Preparou-se a suspensão conforme supracitado no item 3.2.6. O ensaio consistiu em três tratamentos: T1- suspensão de *Ralstonia* por 1 minuto de borbulhamento com ozônio; T2- suspensão de *Ralstonia* por 2 minutos de borbulhamento com ozônio; T3- suspensão de *Ralstonia* por 3 minutos de borbulhamento com ozônio; T4- controle positivo (suspensão de *Ralstonia*) e T5- controle negativo (água esterilizada). Foram utilizados 200 mL de água para cada tratamento. Posteriormente, cada tratamento foi plaqueado em meio de cultivo TZC e em seguida em incubados em câmara BOD a 29°C, fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro por 48 h e, posteriormente, realizada a detecção por PCR, conforme o item 3.2.2.

#### **3.4.2 Desinfestação da água por radiação ultravioleta (UV)**

Os ensaios com radiação ultravioleta foram realizados utilizando a luz UV da câmara de fluxo laminar, dotada de uma lâmpada germicida da marca Philips,

modelo G15T8, comprimento de onda de 254 nm, com 15W de potência. Inicialmente, para o aquecimento e estabilização da lâmpada germicida, a mesma foi ligada 20 minutos antes da exposição das amostras contendo suspensões bacterianas, preparadas semelhante supracitado no item 3.2.6., em um volume final de 500 mL. As amostras com inóculo de *R. solanacearum* foram expostas a radiação ultravioleta pelos seguintes tempos: T1- 10 s, T2- 30 s, T3- 1 min e T4- 10 minutos. A distância entre as amostras e a lâmpada germicida foi de aproximadamente 15 cm. Água inoculada sem contato com a luz UV foram os controles positivos e água esterilizada foi o controle negativo. Em seguida foi realizado o plaqueamento das amostras em meio de cultura TZC e depois colocadas para crescer em câmara BOD a 29°C, com fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro por 48 h e, após o crescimento das colônias bacterianas foi realizado a detecção por PCR, conforme o item 3.2.2.

### **3.4.3 Desinfestação da água por cloro**

Os testes de desinfestação da água por cloro foram realizados em bateladas com hipoclorito de sódio comercial com teor de cloro ativo de 12% p/p. Inicialmente foi preparada uma suspensão bacteriana conforme descrito no item 3.2.6., e misturada em um volume de água de 200 mL. Em seguida adicionou-se nas suspensões bacterianas as concentrações de 1, 2, 3, 4 e 8 mg/L de cloro, por um tempo de 5, 25 e 125 minutos. O controle positivo foi água com a suspensão bacteriana sem cloro e, água esterilizada como o controle negativo. Ao término de cada tempo de contato as amostras foram plaqueadas em meio de cultivo TZC e em seguida em incubadas em câmara BOD a 29°C, com fotoperíodo de 12h / 12h por 48 h e, posteriormente, realizada a detecção por PCR, conforme o item 3.2.2.

### **3.4.4 Desinfestação do substrato por vapor d'água**

Para realização do experimento, utilizou-se uma autoclave vertical, marca Primatec, modelo CS 18, com capacidade interna para 30 litros. Inicialmente, um volume de 200 cm<sup>3</sup> e 2000 cm<sup>3</sup> de substrato comercial composto de Turfa de sphagnum, vermiculita, calcário dolomítico, gesso agrícola e fertilizante NPK foram infestados com inóculos de *R. solanacearum* (preparado conforme supracitado no

item 3.2.6.) na proporção de 0,1 mL de inóculo por cm<sup>3</sup> de substrato (MAFIA et al., 2012) e incubados em sacos plásticos vedados por 48 horas. Posteriormente, os dois volumes de substrato foram submetidos ao tratamento térmico na autoclave, a uma temperatura de 121°C, pressão de 1,5 Kg/cm<sup>2</sup> por 30 minutos. Substrato autoclavado sem inóculo bacteriano foi o controle negativo e o substrato inoculado com a bactéria sem passar pela autoclave foi o controle positivo. Após a termoterapia cada amostra foi revolvida 3 vezes e, em seguida, uma porção do substrato contido em cada saco foi colocada em 100 mL de água esterilizada. Posteriormente, cada amostra foi plaqueada em meio de cultura TZC e incubadas em câmara BOD a 29°C, fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro por 48 h e, após o crescimento das colônias bacterianas, foi realizado a detecção por PCR, conforme o item 3.2.2.

#### **3.4.5 Avaliação e delineamento dos experimentos de desinfestação**

A avaliação de cada experimento foi de forma qualitativa, avaliando-se a incidência e erradicação da bactéria de acordo ao método de desinfestação testado. A incidência consistiu em: (quantidade do DNA positivo para *Ralstonia* / quantidade de amostras testadas x 100).

#### **3.4.6 Avaliação da fitotoxicidade do cloro em mudas de eucalipto**

O efeito fitotóxico do cloro em mudas de eucalipto foi avaliado por meio da água de irrigação. Mudas de três genótipos de eucalipto, genótipo 1 (híbrido de *E. spp.*), genótipo 2 (híbrido de *E. urophylla*) e genótipo 3 (híbrido de *E. urophylla*), com 30 dias de idade foram submetidas a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO) por via de irrigação (simulando aspersão), contendo 9 tratamentos (T1: 0; T2: 0,01; T3: 0,05; T4: 0,1; T5: 0,5; T6: 0,75; T7: 1; T8: 2; T9: 4 mg/L). As mudas foram irrigadas em ambiente controlado por 60 dias, seguindo as mesmas vazões de irrigação de um viveiro comercial de mudas de eucalipto (Tabela 1).

**Tabela 1 - Tempo e intervalo de irrigação por idade de mudas**

Idade das mudas (dias)	Tempo de irrigação (min)	Intervalo (min)	Vazão (L / min)	Patamar
30 - 40	1	12	1,75	Casa de sombra
41 - 60	15	120	2,66	Crescimento
61 - 90	15	120	2,66	Maturação

As plantas foram avaliadas visualmente a cada 15 dias quanto ao aparecimento de sintomas de fitotoxicidade até o final do experimento, como clorose, encarquilhamento foliar e estiolamento do limbo. Após 60 dias avaliou-se a altura das mudas de todos os tratamentos. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 9 tratamentos e 10 repetições. Cada muda dos tratamentos constituiu-se uma repetição. Ao final, os dados de alturas das mudas foram submetidas à ANOVA e as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico SASM-Agri, versão 8.2 (CANTERI et al., 2001).

### 3.4.7 Implantação do sistema de assepsia de um viveiro florestal comercial

A partir dos resultados dos diferentes ensaios para a desinfestação da água e do substrato de cultivo de miniestacas de eucalipto infestados com inóculos bacterianos de *R. solanacearum*, avaliou-se o método mais efetivo de acordo a necessidade mínima da concentração e/ou do tempo de exposição aplicados para assepsia da água e do substrato para, então, implantar o sistema de assepsia de um viveiro florestal comercial. Para a escolha do projeto implantado no viveiro, levou-se em consideração, além do método efetivo, os custos e facilidades operacionais, a fim de não impactar no processo produtivo. Após a instalação dos sistemas de assepsia, foram realizadas as calibrações e iniciada a operação. Para avaliar a eficácia do sistema de tratamento de água foi realizado um monitoramento para detecção de *Ralstonia* em 2 períodos distintos (Abril/2019 a Setembro/2019 e Janeiro/2020 a Junho/2020). O monitoramento do substrato esterilizado foi realizado por 7 dias seguidos, sendo coletadas 3 amostras por dia.

Os resultados foram expressos em porcentagens de amostras positivas e negativas, por meio da amplificação do DNA da bactéria por PCR.

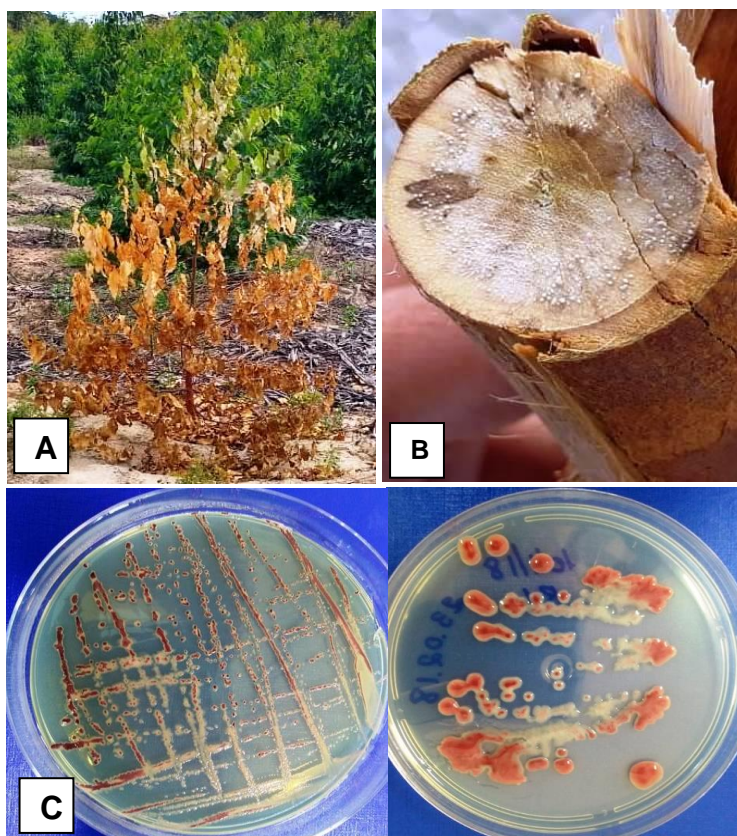
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Método rápido de *screening* in vitro de genótipos de eucalipto quanto a resistência à murcha de *Ralstonia*

#### 4.1.1 Caracterização do isolado 924/19

A partir de plantas de eucalipto com sintomas de murcha e constatação de exsudação de pus bacteriano no caule, infectadas naturalmente em campo (Figura 2 A-B), após o isolamento, foi possível obter em meio de cultivo TZC (KELMAN, 1954), crescimento bacteriano com basicamente dois tipos de colônias. A morfologia de algumas dessas colônias, indicavam virulência (Figura 2 C). Assim, as colônias grandes de cores avermelhadas eram consideradas avirulentas e, as de cores brancas, pequenas e de centro vermelho eram consideradas virulentas.

**Figura 2 – A – Planta de eucalipto com sintomas de murcha no campo; B – Exsudação de pus bacteriano após o corte a 10 cm da base do caule; C – Colônias de *Ralstonia solanacearum***



A amplificação por PCR de um fragmento do rDNA da região 16S do genoma da bactéria com os primers, gerou um fragmento de 282 pares de base (pb) para o isolado 924/19, confirmando o isolado como sendo de *Ralstonia* (Figura 3).

**Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose a 1% do fragmento de amplificação da PCR com os primers 759 / 760 referentes a região 16S do rDNA**



A identificação tradicional de microrganismos, baseado em características da cultura, morfologia, taxonomia entre outros atributos, além de requererem conhecimentos mais especializados, costumam ser uma atividade morosa e podem trazer resultados confusos, principalmente para identificação de bactérias. Dessa forma, a amplificação do rDNA bacteriano por PCR é o método mais seguro para confirmar a identidade do patógeno. Com o advento da PCR, técnicas baseadas em DNA tornaram-se rapidamente o padrão ouro para a detecção e identificação de patógenos de plantas, incluindo bactérias (JENSEN et al., 1993, BERESWILL et al., 1994).

Um dos fatores que se tem percebido que pode intensificar o surgimento de sintomas de murcha bacteriana em plantios de eucalipto, principalmente aos 3 a 6 meses de idade, além do grau de agressividade da bactéria e suscetibilidade do hospedeiro, está fortemente correlacionado por algum tipo de estresse que a planta sofreu, quer sejam abióticos, físicos e/ou bióticos. Exames preliminares do sistema radicular de plantas sintomáticas, apontaram malformação do sistema radicular, enovelamento de raízes, além de um sistema radicular relativamente superficial sem o aprofundamento da raiz pivotante, os quais podem indicar que estes fatores, já submetiam a planta a estresse e, concedendo oportunidade para o patógeno agir de forma agressiva sobre o hospedeiro, culminando no aparecimento de murcha e,

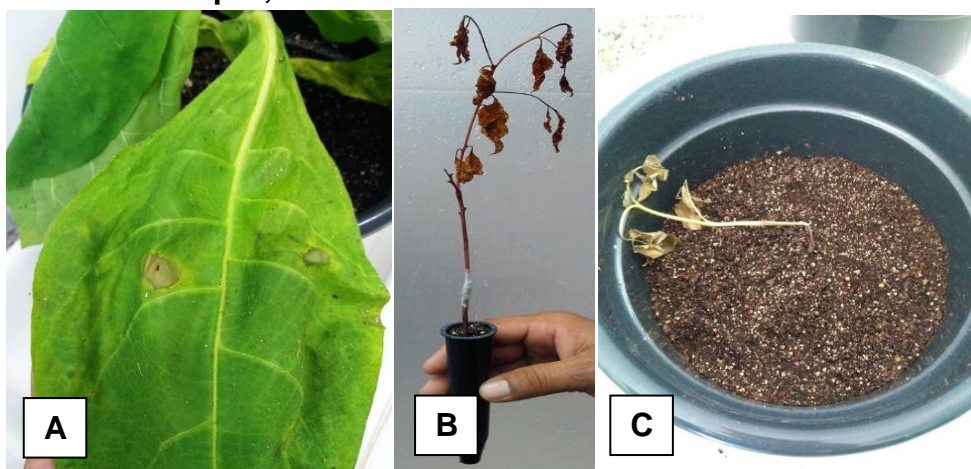
posteriormente, a morte da planta ainda jovem, já que essa bactéria é considerada saprofítica do solo. Dianese et al., (1990) avaliando a suscetibilidade da murcha associada a *R. solanacearum* entre seis espécies de eucalipto cultivadas no Brasil, salientaram que a doença também está associada a deterioração secundária, ataque de cupins e aumento da suscetibilidade ao vento. Já Coutinho e Wingfield (2017) também observaram que plantas com sintomas de murcha por *Ralstonia*, tinham uma forte relação com a má qualidade da muda, tratos silviculturais inadequados, déficit hídrico, presença de outros patógenos e, com base nessas evidências foram categóricos em afirmar que tanto a *R. solanacearum* quanto *R. pseudosolanacearum* podem ser patógenos oportunistas do eucalipto.

#### **4.1.2 Reação de hipersensibilidade e teste de patogenicidade**

A virulência do isolado foi comprovada com os testes de reação de hipersensibilidade em folhas de fumo e patogenicidade em mudas de eucalipto e de tomateiro. A reação de hipersensibilidade em folhas de fumo ocorreu a partir de 24 horas após a infiltração, caracterizando como reação de hipersensibilidade positiva. A patogenicidade foi confirmada pela murcha e morte das mudas de eucalipto (após 4 semanas) e do tomateiro (após 1 semana) que foram inoculadas com suspensão bacteriana de *Ralstonia* (Figura 4). Ao final dos testes de patogenicidade nas mudas, a bactéria foi reisolada, comprovando a ação patogênica.

A virulência e patogenicidade do isolado é fundamental para se conhecer a capacidade infectiva e a agressividade da cepa frente ao hospedeiro. Em ensaios para avaliar a resistência e suscetibilidade de plantas a doenças, os resultados dos testes podem variar de acordo com a variabilidade dos isolados. A virulência de nove isolados de *Ralstonia solanacearum* foi avaliada por Dianese et al., (1990) com inoculações em quatro espécies de plantas, tomate, berinjela, pimentão e eucalipto, sendo que ao final dos testes, apenas um isolado dos nove que foram inoculados, mostrou-se virulento para as quatro plantas. Campos et al. (2017) avaliaram a variabilidade de cinco isolados de *R. solanacearum* através de testes de patogenicidade em plantas de tomateiro, foi observado que, apesar de todas as plantas terem sido infectadas pelos cinco isolados, somente dois isolados causaram alta severidade de murcha.

**Figura 4 – Reação das mudas após a inoculação com o isolado 924/19. A – Hipersensibilidade positiva em folha de tabaco; B – Murcha e morte da muda de eucalipto; C - Murcha e morte da muda de tomateiro**



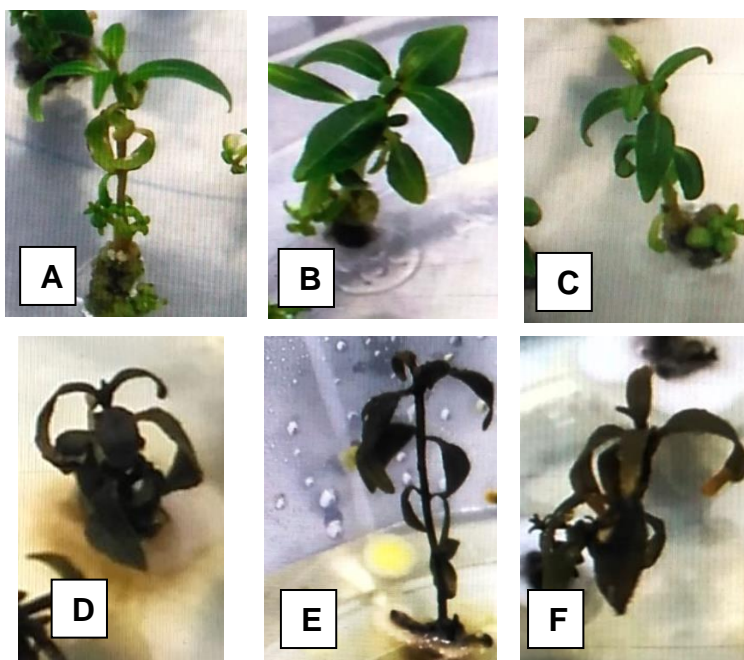
Os indícios de virulência de determinado isolado de *Ralstonia* podem ser observados já no crescimento das colônias em meio de cultura semi-seletivo por características da morfologia das colônias, no caso do isolado 924/19, estes indícios foram observados desde o primeiro isolamento oriundo de amostras de caule de planta de eucalipto sintomática. Entretanto, a ação infectiva e patogênica só foram confirmadas depois da reação de hipersensibilidade positiva e patogenicidade em plantas de eucalipto e tomateiro, dessa forma sendo utilizado para inoculações de genótipos de eucalipto em testes de resistência.

#### **4.1.3 Metodologia de inoculação para *screening* de eucalipto “in vitro”**

Para validar o método de inoculação mais eficiente, as plântulas foram inoculadas em um material genético já conhecido como suscetível à bactéria *Ralstonia*. Todos os métodos de inoculação avaliados neste ensaio ocasionaram murcha nos explantes inoculados com o isolado bacteriano, enquanto as plântulas controle, inoculadas com água esterilizada, diferente das inoculadas com o patógeno, permaneceram saudáveis. O método de injeção de suspensão bacteriana na base do caule das plântulas in vitro foi o primeiro a apresentar sintomas iniciais de murcha dentro de 06 a 07 dias após a inoculação, ocasionando a murcha completa de todos os explantes com 10 a 11 dias após serem inoculados (Figura 5). Por outro lado, o método de imersão da haste em suspensão bacteriana e, o método de inoculação da base do caule dos explantes por fermento mais palito contendo inóculo

bacteriano, ocasionaram sintomas mais tardios quando comparados com o método de injeção. Os sintomas iniciaram entre 08 e 10 dias, e a murcha completa em aproximadamente 15 dias após a inoculação das plântulas “in vitro” (Figura 5). Diante disto, o método de injeção na base do caule dos explantes foi selecionado como o procedimento mais apropriado para as inoculações artificiais para o ensaio de *screening* “in vitro” subsequentes.

**Figura 5 – Murcha completa dos explantes após a inoculação com isolado de *Ralstonia*. A, B e C – Explantes controles para os métodos de injeção na base da haste, ferimento da base e imersão, respectivamente; D, E e F – Explantes inoculados pelo os métodos de injeção, ferimento + inóculo e imersão, respectivamente**



O conhecimento sobre as condições favoráveis, assim como, qual o método de inoculação artificial é mais eficiente para a reprodução de sintomas de determinada doença para um hospedeiro alvo, representam atributos relevantes antes de iniciar programas de melhoramento para avaliações de resistência de plantas à patógenos. Tripathi et al. (2008) a fim de realizar o *screening* in vitro de cultivares de banana resistentes à murcha de *Xanthomonas*, relataram que a eficiência do ensaio só foi possível depois de determinar as condições ambientais adequadas e o método de inoculação capaz de induzir os sintomas da doença. Este mesmo princípio vem sendo empregado quando se tem o intuito de avaliar fontes de genótipos de eucalipto resistentes à murcha bacteriana. Diferentes formas de inoculação da

bactéria *Ralstonia* a eucalipto foram avaliadas por Dianese e Dristig (1993), sendo que, dos cinco métodos de inoculação testados, quatro induziram murcha, mas o método de aplicação de 10 µL de suspensão em ferimentos nas axilas foliares foi o mais eficiente para indução de níveis satisfatórios de murcha. Fonseca et al. (2016) avaliaram qual o método mais eficiente para inoculação de *R. solanacearum*, a fim de testar a resistência à murcha em várias espécies de eucalipto e constatou que a injeção de suspensão bacteriana na base do caule foi o mais eficiente. Já ensaios realizados por Mafia et al. (2014), o método de transplântio de mudas para canaletões com areia infestada com suspensão bacteriana a cada 15 dias, ocasionou maior incidência de mudas de eucalipto infectadas. Diante do alto índice de publicações para seleção do procedimento de inoculação mais eficiente a ser adotado para avaliação de espécies de eucalipto à *Ralstonia*, foi possível perceber que não há um método específico a ser menos ou mais considerado para realização das inoculações e indução dos sintomas de espécies suscetíveis a bactéria. Para cada experimento deve ser considerado as condições favoráveis, idade da planta, virulência do isolado, período de latência para surgimento do sintomas e morte das plantas testadas. Portanto, é fundamental que mais de um método de inoculação seja avaliado. Neste experimento os três métodos em estudo ocasionaram sintomas à doença, no entanto, o método de inoculação por injeção de suspensão bacteriana na base do caule dos explantes forneceu resultados mais rápidos, por isso, escolhido para o experimento de *screening*.

#### **4.1.4 Screening de plântulas de eucalipto in vitro**

Ao comparar os experimentos 1 e 2 quanto às médias para aparecimento dos sintomas iniciais e a murcha completa, os valores de p indicaram que há uma probabilidade significativa das médias dos 2 experimentos serem estatisticamente iguais pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

Todos os tratamentos que foram inoculados com o isolado de *Ralstonia* desenvolveram os sintomas de murcha bacteriana. Entretanto, o período de incubação para o aparecimento dos sintomas (Tabela 2) e a murcha completa dos explantes variaram significativamente entre os materiais genéticos testados (Tabela 3). O Genótipo 4 foi o primeiro a manifestar sintomas iniciais de clorose e epinastia de folhas, em média 6,2 dias após a inoculação com *Ralstonia*, no entanto, não

diferiu estatisticamente do surgimento dos sintomas do Genótipo 3, com 6,4 dias. O Genótipo 2 desenvolveu sintomas em média de 6,7 dias, sendo estatisticamente igual ao aparecimento de sintomas do Genótipo 3. O Genótipo 1, desenvolveu sintomas a partir do décimo dia após a inoculação, e 30 a 40% das plantas apresentavam sintomas. Todos os genótipos inoculados com *Ralstonia*, com exceção do Genótipo 1, foi observado murcha completa de todos os explantes ao final das avaliações. O período entre a inoculação e a murcha completa de 100% dos explantes do genótipo 4, ocorreu em média com 9,4 dias, diferindo estatisticamente dos genótipos 1, 2 e 3. Para os genótipos 2 e 3, não houve diferença estatística entre a inoculação e a ocorrência da murcha completa, em média, 100% dos explantes murcharam com 11 e 10,7 dias, respectivamente. Enquanto que o Genótipo 1 a murcha completa se deu com aproximadamente 15 dias, sendo observado em 60% dos explantes.

Ao final do ensaio o patógeno foi reisolado de todos os explantes inoculados e o crescimento bacteriano apresentava morfologia que indicavam ser de colônias de *Ralstonia*, sendo posteriormente detectada por PCR como positiva, confirmando que os sintomas eram devidos à bactéria usada como fonte de inóculo.

**Tabela 2 – Período para o aparecimento dos sintomas de murcha em quatro genótipos de eucalipto após a inoculação com o isolado de *Ralstonia***

Genótipos	Espécies	Procedência	Aparecimento dos sintomas
			Média de dias
Genótipo 1	<i>Eucalyptus</i> spp.	Eunápolis - BA	10 c
Genótipo 2	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Inhambupe - BA	6,7 b
Genótipo 3	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Inhambupe - BA	6,4 ab
Genótipo 4	<i>Eucalyptus pellita</i>	Indonésia	6,2 a

Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

C.V. (%) = 7,93

**Tabela 3 – Período para a murcha completa de quatro genótipos de eucalipto inoculados com isolado de *Ralstonia***

Genótipos	Espécies	Procedência	Murcha completa
			Média de dias
Genótipo 1	<i>Eucalyptus</i> spp.	Eunápolis - BA	14,8 c
Genótipo 2	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Inhambupe - BA	11,0 b
Genótipo 3	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Inhambupe - BA	10,7 b
Genótipo 4	<i>Eucalyptus pellita</i>	Indonésia	9,4 a

Médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

C.V. (%) = 7,30

#### 4.1.5 Avaliação da resistência dos genótipos de eucalipto

Os quatro genótipos de eucalipto avaliados foram acompanhados de plântulas controles independentes por material genético inoculado com *Ralstonia*, os quais se mantiveram sem sintomas em 100% dos explantes durante todo o período de avaliação, evento não observado para os explantes inoculados (Figura 6). A resposta à inoculação com suspensão bacteriana variou entre os genótipos. Entretanto, não foi observado um genótipo resistente. Verificou-se que o genótipo 1 (híbrido de *Eucalyptus* spp.) foi moderadamente suscetível, enquanto, que os genótipos 2, 3 e 4 (híbrido de *E. urophylla*, híbrido de *E. Urophylla*, híbrido de *E. pellita*), respectivamente, foram suscetíveis à bactéria *Ralstonia* (Tabela 4).

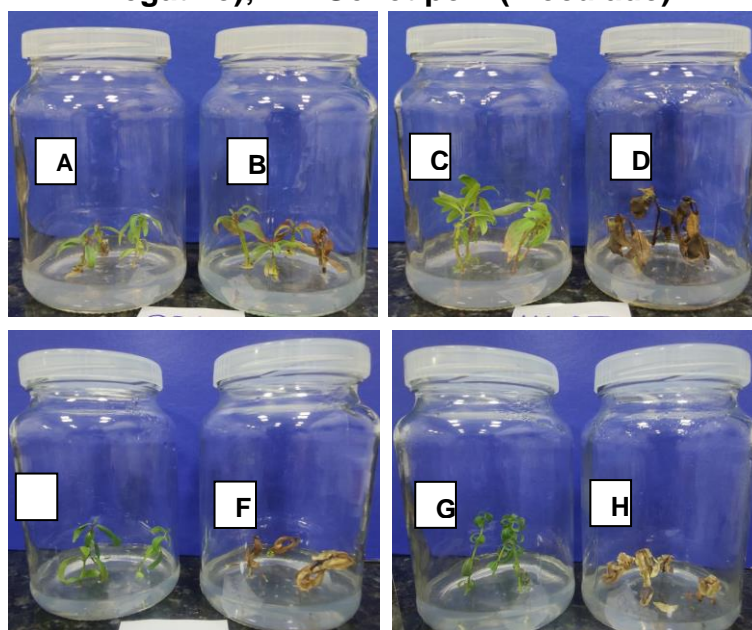
**Tabela 4 – Incidência de murcha e suscetibilidade dos genótipos de eucalipto após a inoculação do patógeno nos explantes**

Genótipos	Espécies	Procedência	Incidência de murcha (%)	Classificação*
Genótipo 1	<i>Eucalyptus</i> spp.	Eunápolis - BA	60	MS
Genótipo 2	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Inhambupe - BA	100	S
Genótipo 3	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Inhambupe - BA	100	S
Genótipo 4	<i>Eucalyptus pellita</i>	Indonésia	100	S

\*Resistente (R) – Ausência de plantas murchas; Moderadamente resistente (MR) - <50% de plantas murchas; Moderadamente suscetível (MS) – 50 ≥ 70% de plantas murchas; Suscetível (S) - 71 ≥ 100% de plantas murchas.

A avaliação da resistência de espécies de eucalipto à murcha de bacteriana, por se tratar de uma doença bastante importante para a cultura, vem sendo realizada constantemente por diversos pesquisadores e em programas de melhoramento dentro e fora de empresas florestais, pois até o presente momento se constitui como uma das principais medidas de controle da doença, principalmente, em plantios no campo. Na literatura já foram descritos estudos para a avaliação de espécies de eucalipto a *Ralstonia*, através de ensaios de resistência com plantas em condição de campo (DIANESE et al., 1990), na condição mudas, mais empregado, (DIANESE e DRISTIG, 1993; SHI et al., 2000; MAFIA et al., 2014; WEI et al., 2014; FONSECA et al., 2016) e por teste de microbiolização de sementes infestadas pela bactéria (MARQUES et al., 2013). Entretanto, não foram encontrados métodos para avaliar a suscetibilidade de genótipos de eucalipto a *Ralstonia* em plantas em fase de micropropagação. Portanto, o desenvolvimento de um método de seleção precoce de materiais genéticos a doença através do *screening* in vitro de explantes, além de ser inovador, pode ser uma técnica promissora para detectar a suscetibilidade já no início da introdução do material genético em programas de desenvolvimento de genótipos para posterior troca e comercialização de materiais genéticos com sanidade garantida.

**Figura 6 – Sintomas dos genótipos de eucalipto 18 dias após a inoculação com *Ralstonia*. A – Genótipo 1 (controle negativo); B – Genótipo 1 (inoculado); C – Genótipo 2 (controle negativo); D – Genótipo 2 (inoculado); E – Genótipo 3 (controle negativo); F – Genótipo 3 (inoculado); G – Genótipo 4 (controle negativo); H – Genótipo 4 (inoculado)**



Neste ensaio, não foi observado genótipo resistente à doença, no entanto, o nível de suscetibilidade de um material genético variou dos demais, sendo classificado como moderadamente suscetível pelo fato de ter sido inoculado com o mesmo isolado, mesmos procedimentos de inoculação, recebido às mesmas condições ambientais e mesmo assim, durante as duas vezes em que o ensaio foi realizado, o Genótipo 1, apresentou 30 e 50%, respectivamente, de plantas saudáveis ao final dos testes. Isto pode indicar que este genótipo (híbrido de *Eucalyptus* spp.) possui pelo menos um dos pais tolerante à doença, sendo passível de classificar até como moderadamente tolerante. Os explantes dos genótipos 2 e 3 (híbridos de *E. urophylla*), tiveram resultados semelhantes para mudas inoculadas com a bactéria. Quando pelo menos um dos pais era da espécie *E. urophylla*, Fonseca et al., (2016) os classificaram como suscetível. Análogo aos resultados obtidos por Wu e Lliang (1988); Ciesla et al. (1996), o genótipo 4 (híbrido de *E. pellita*) também foi suscetível à murcha de *Ralstonia* pelo método de *screening* in vitro aqui testado. O método desenvolvido neste ensaio mostrou-se ser uma ferramenta eficiente para inoculação de suspensões bacterianas em explantes via injeção de inóculo na base do explante e, promoveu respostas sintomáticas em todos os genótipos avaliados com maior e menor grau de suscetibilidade. Dessa forma, concluiu-se que o método é potencialmente funcional e pode ser empregado para avaliação em massa de genótipos de eucalipto em condição de micropropagação. Contudo, novos ensaios devem ser conduzidos em mudas dos mesmos materiais genéticos avaliados neste estudo para confirmação dos resultados aqui relatados.

## **4.2 Análise da morfologia de vasos xilemáticos de eucalipto sob infecção natural de *Ralstonia* por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

### **4.2.1 Confirmação da bactéria e incidência na parcela**

De cada parcela de 6 x 6 plantas (aproveitamento útil de 20 plantas), dos três clones amostrados e isolados em meio de cultivo semi-seletivo, obteve-se crescimento bacteriano, a partir de 14 plantas (genótipo 01), 13 plantas (genótipo 02) e 20 plantas (genótipo 03). Destas, estavam infectadas por *Ralstonia*, de acordo a confirmação por PCR, cinco plantas do material genético 01, com incidência na parcela de 25%, 2 plantas do material genético 02 e incidência de 10% e 11 plantas

para o genótipo 03, ocasionando uma incidência dentro da parcela de 55% (Tabela 5).

**Tabela 5 – Identificação de plantas com e sem infecção por *Ralstonia* e incidência da doença na parcela**

<b>Materiais genéticos</b>	<b>Amostragem</b>	<b>Crescimento bacteriano</b>	<b>PCR (+)</b>	<b>Incidência (%)</b>
Genótipo 01	20	14	5	25
Genótipo 02	20	13	2	10
Genótipo 03	20	20	11	55

Apesar da alta incidência do genótipo 03, as plantas em campo foram assintomáticas quanto aos sintomas de murcha e epinastia de folhas, assim, só foi possível confirmar a doença após o isolamento do patógeno no laboratório e posterior detecção pelo método de amplificação do DNA por PCR. Coutinho e Wingfield (2017) relataram encontrar a bactéria em plantas visualmente saudáveis e com crescimento vigoroso. Segundo Hayward (1991) esse microrganismo pode colonizar alguns hospedeiros de forma assintomática como infecções latentes. Todavia, para Coutinho e Wingfield (2017) isto ainda é pouco compreendido no patossistema *Ralstonia* e suas interações com o eucalipto. Plantas assintomáticas (aparentemente saudáveis) representam um enorme agente disseminador, pois para muitas empresas florestais a formação de matrizes que irão compor o minijardim clonal é proveniente do processo de macroestaquia oriunda da coleta de brotos de cepas em campo. Estudo realizado por Mafia et al. (2012) com intuito de avaliar a transmissibilidade da bactéria à partir de minicepas de eucalipto com e sem sintomas da doença, devidamente detectadas como positivas para *Ralstonia*, comprovaram a disseminação do patógeno para mudas propagadas tanto das minicepas com sintomas como das minicepas sem sintomas. Estes resultados reforçam que plantas assintomáticas em campo podem ser fonte de inóculo.

#### **4.2.2 Análise de vasos de xilema de eucalipto quanto ao tamanho e a oclusão por tilose**

O diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) dos vasos xilemáticos de cada material genético analisado foi estatisticamente igual para as plantas com e sem infecção por *Ralstonia* sp. (Tabela 6), evidenciando que a infecção vascular da bactéria não influenciou nas dimensões dos vasos destes 3 genótipos de eucalipto quando comparado com plantas sadias. Segundo Foelkel (2007), no geral, espécies de eucalipto possuem as dimensões de vaso entre 60 a 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Para Silva et al., (2007) um dos fatores que influencia na dimensão de vaso da madeira de eucalipto é a idade da planta. No estudo realizado aqui, as plantas analisadas estavam em mesma condição ambiental e idade, o que possivelmente explica os vasos não diferirem estatisticamente em diâmetro, não havendo correlação com a infecção do patógeno.

**Tabela 6 – Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) de vasos de xilema de três genótipos de eucalipto com e sem infecção pela a bactéria**

Materiais genéticos	Diâmetro de vasos xilemático ( $\mu\text{m}$ )		
	Com infecção	Sem infecção	CV (%)
Genótipo 01	103,80 a	97,50 a	17,72
Genótipo 02	107,90 a	104,43 a	14,50
Genótipo 03	97,86 a	102,80 a	14,70

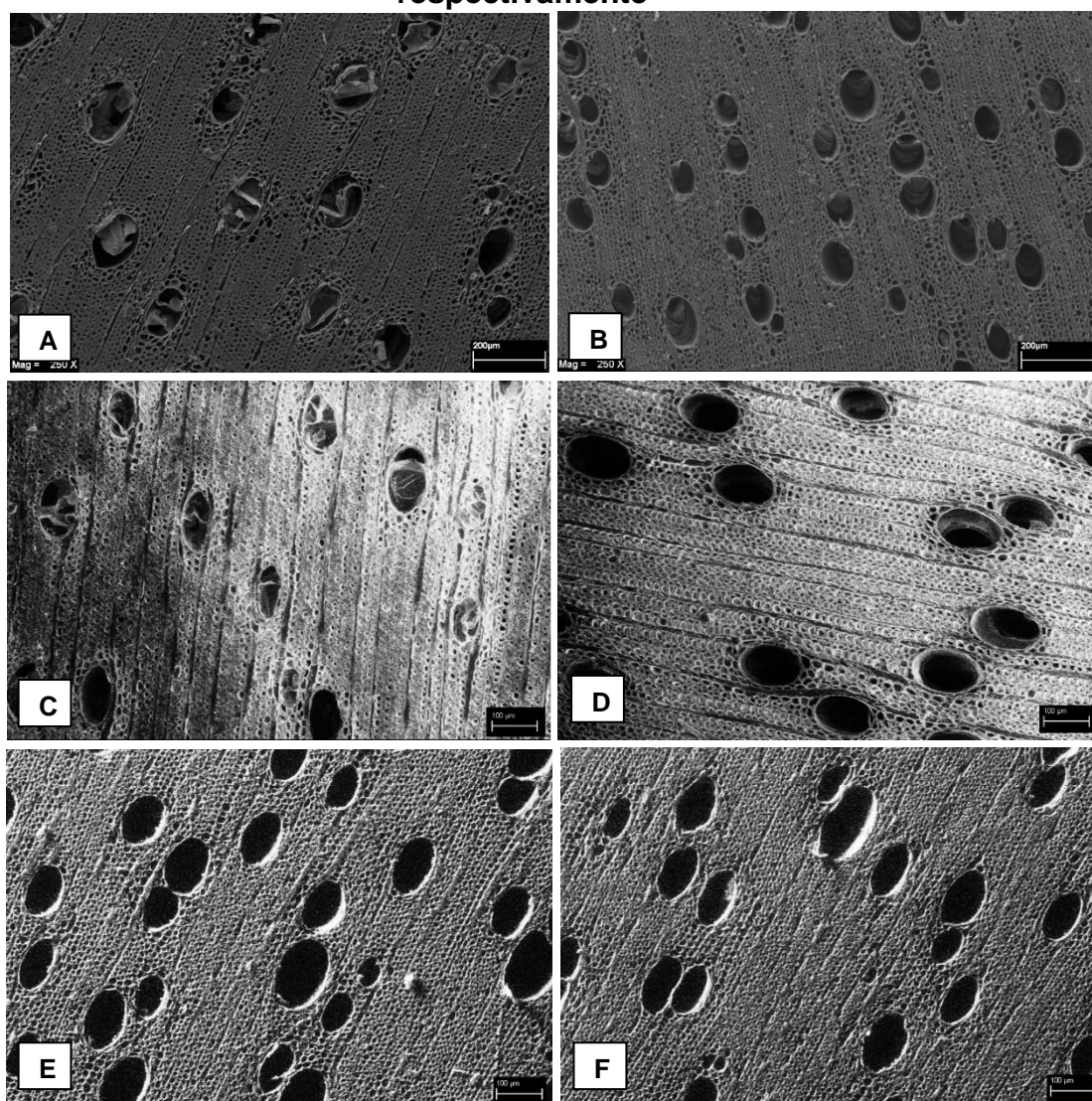
Médias seguidas pelas mesmas letras na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Os materiais genéticos que tiveram maior ocorrência de oclusão dos vasos de xilema por tilose foram aqueles que após o abatimento da planta, foi observado um intenso fluxo de pus bacteriano no caule de plantas positivas para *Ralstonia* (genótipos 01 e 02). Para o genótipo 03, não foi observado formação de tilose nos vasos xilemáticos (Figura 7) nem exsudação de pus bacteriano nas plantas positivas para o patógeno.

A infecção de plantas por patógenos que causam doenças vasculares podem acometer diversos órgãos da planta, entre esses, os tecidos do sistema vascular que expressam respostas sintomáticas internas e reações à infecção. Alfenas et al., (2006) ao analisarem tecidos vasculares de plantas de eucalipto infectadas por

*Ralstonia* por meio da microscopia eletrônica de varredura, observaram que além da intensa colonização e obstrução dos vasos do xilema pela bactéria e massa celulares, havia perda da rigidez e desestruturação das paredes celulares dos tecidos vasculares e do parênquima.

**Figura 7 – Oclusão por tilose de vasos xilemáticos de eucalipto, observados em MEV. A – Genótipo 01 (+); B – Genótipo 01 (-); C – Genótipo 02 (+); D – Genótipo 02 (-); E – Genótipo 03 (+); F – Genótipo 03 (-). A e B – Barra = 200  $\mu$ m; C a F - Barra = 100  $\mu$ m; (+), (-) = positivo e negativo para *Ralstonia*, respectivamente**



No presente estudo foi observada a obstrução dos vasos de xilema pela formação de tilose em plantas confirmadas positivas para *Ralstonia* em 2 genótipos analisados. Segundo Pascholatti e Leite (1995) barreiras morfológicas podem ser induzidas pelas plantas em resposta à infecção sistêmica de um patógeno, sendo

mais frequente a formação de tilose nos vasos do xilema. De fato, nas plantas dos genótipos 1 e 2, identificadas com a bactéria, esta premissa foi evidenciada. No entanto, plantas positivas para bactéria do genótipo 3, não foi observada a oclusão dos vasos por tilose em nenhuma das amostras analisadas. Este evento pode estar relacionado com o nível de infecção bacteriana e/ou início da doença. Vale salientar que as plantas infectadas do genótipo 3 apresentavam-se visualmente saudáveis e não foi verificada exsudação de pus bacteriano como nos demais genótipos detectados com o patógeno, os quais a obstrução dos vasos por tilose era visível. Dessa forma, é possível que a carga bacteriana nos tecidos da planta pode ter induzido as diferentes respostas da defesa das plantas à infecção. Fritschi et al., (2008) ao avaliarem a carga bacteriana de plantas infectadas com *Xylella fastidiosa* e a oclusão de vasos xilemáticos por tilose, perceberam que a quantidade de vasos ocluídos estava diretamente correlacionada com quantidade de células bacterianas em plantas inoculadas, delimitando a ocorrência ou não de tilose. Já Stevenson et al. (2004) realizaram um estudo onde coletaram amostras com 10, 14 e 18 semanas após a inoculação de videira com *Xylella fastidiosa*, e ao analisarem as amostras só encontraram vasos ocluídos por tilose a partir da décima quarta semana após a inoculação. Isto reforça a hipótese para não ocorrência, naquele momento, da tilose nos vasos xilemáticos do genótipo três.

Fradin e Thomma (2006) relatam que a formação de tilose é um mecanismo de defesa comum nos vasos do xilema contra patógenos causadores de murcha vascular. Ainda segundo estes autores, se a formação de tilose afetar muitos vasos pode resultar em estresse hídrico e se tornar desvantajoso para a planta. Os resultados encontrados neste estudo ajudam a entender melhor as interações da bactéria *Ralstonia* com o eucalipto. No entanto, este patossistema ainda não é claro e necessita de mais estudos.

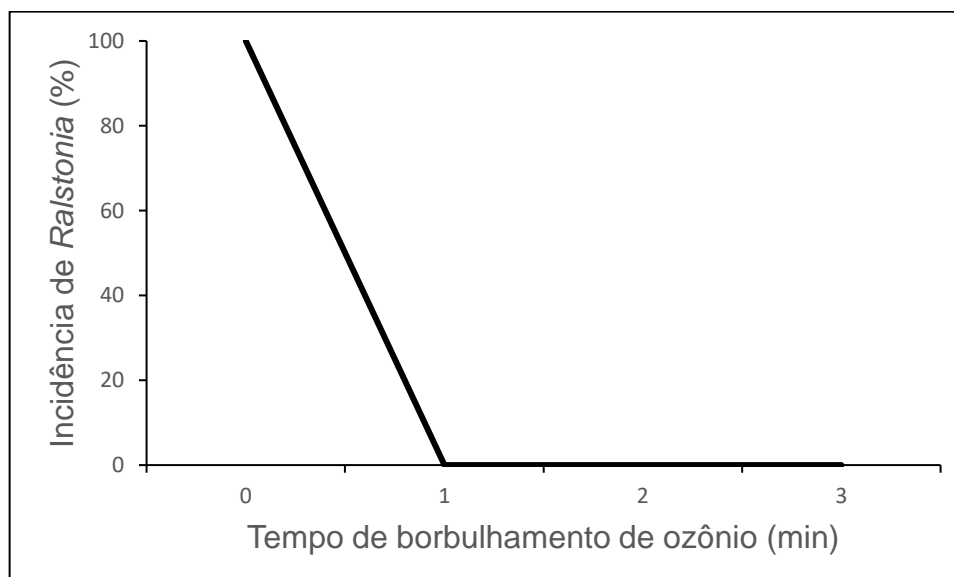
### **4.3 Manejo integrado da murcha de *Ralstonia* em viveiros florestais**

#### **4.3.1 Métodos de desinfestação da água**

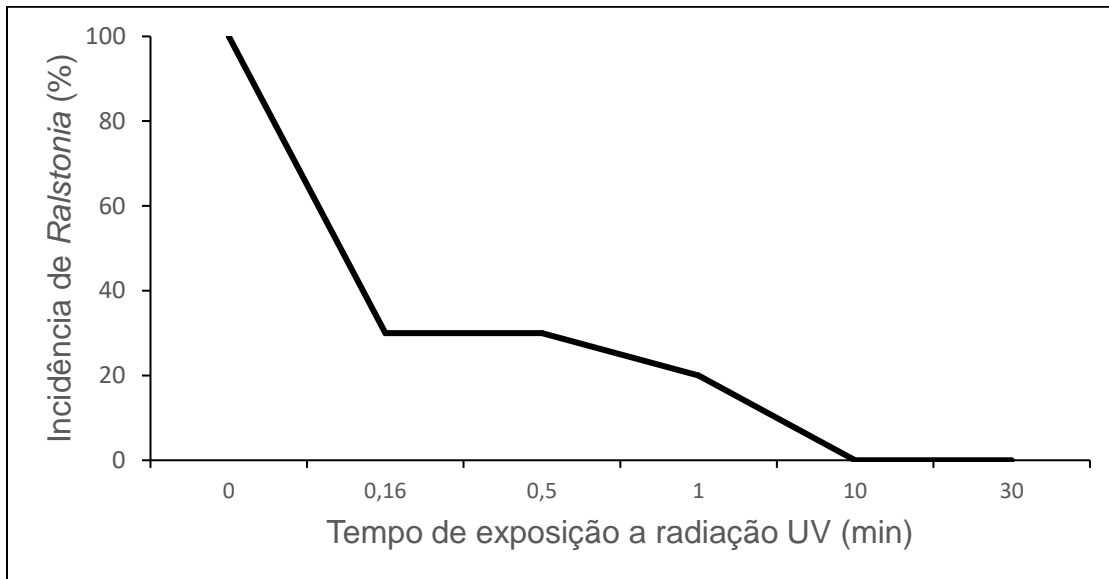
Para todos os métodos testados foi detectado por PCR a bactéria *Ralstonia* nos controles positivos, enquanto, os controles negativos, não houve a amplificação de DNA do patógeno. A incidência de DNA positivo para *Ralstonia* e a inativação de

células bacterianas variaram de acordo as concentrações e/ou tempos de exposição testados por experimento. No ensaio com ozônio foi observada inativação da bactéria em todos os tempos analisados 1, 2 e 3 minutos (Figura 8), gerando uma concentração de ozônio na água com inóculo do patógeno correspondente a 8,33 mg/L, 16,66 mg/L e 24,99 mg/L, respectivamente. Para a desinfestação da água através da exposição a luz ultravioleta (UV), a radiação UV promoveu uma redução de incidência da bactéria de 30% quando a água inoculada foi exposta a 0,16 e 0,5 minuto e, de 20%, a uma exposição de 1 minuto. A inativação da bactéria na água só foi observada quando o tempo de exposição à radiação UV foi de 10 minutos (Figura 9). Já no ensaio com cloro, a incidência da bactéria foi de 100% nas concentrações de 1mg/L e 2mg/L quando exposta ao tempo de contato de 5 minutos. Com 25 minutos, apenas a concentração de 1 mg/L, ocasionou ainda incidência de *Ralstonia* na água (50%), a partir de, 2 mg/L, foi constatada a inativação da bactéria em 100% das amostras, ocorrência também observada em todas a concentrações de cloro com tempo de exposição de 125 minutos (Figura 10).

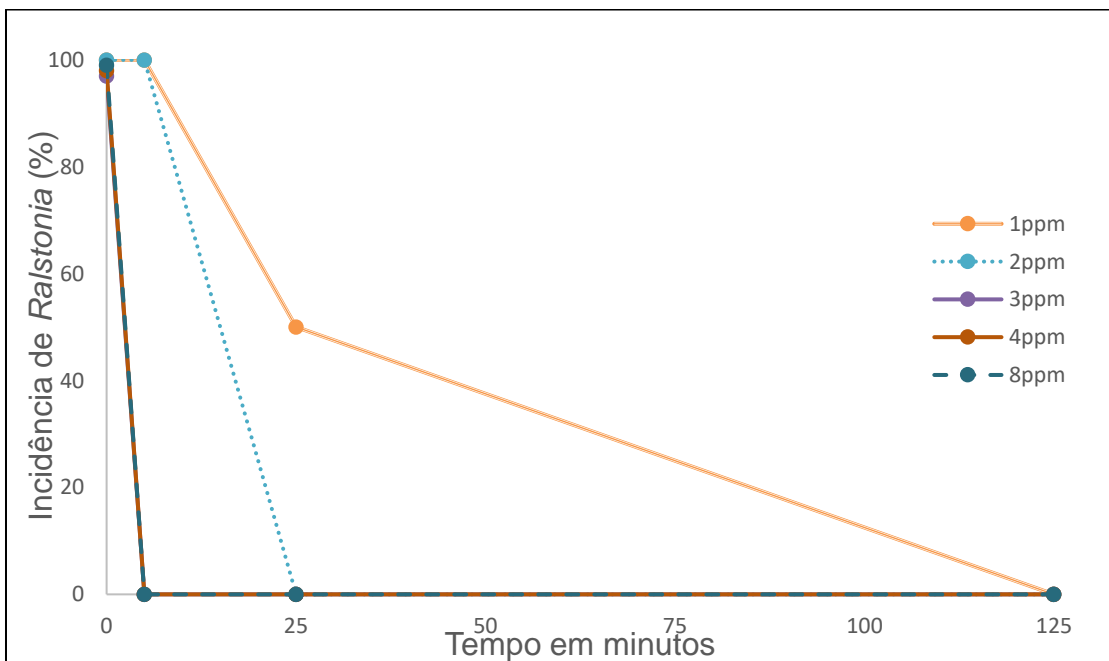
**Figura 8 – Inativação de inóculos de *Ralstonia* da água após à aplicação de ozônio**



**Figura 9 – Inativação de inóculos de *Ralstonia* da água por meio de radiação ultravioleta (UV)**



**Figura 10 – Inativação de inóculos de *Ralstonia* da água após aplicações de diferentes concentrações de cloro**



Dentro de um viveiro de produção de mudas a água de irrigação contaminada é uma fonte potencial de disseminação de doenças. Assim como já detectada em avaliações prévias, na literatura existem diversos relatos da contaminação da água de irrigação por espécies de *Ralstonia* (JANSE, 1998; ELPHINSTONE et al. 1996; CARUSO et al., 2005; ALFENAS et al., 2006; ÁLVAREZ et al., 2008). Estas evidências foram as premissas para realização dos testes de desinfestação da água,

dentre os quais testou-se pelo método de ozonização, radiação ultravioleta e aplicação de cloro. Para todos os métodos avaliados nestes experimentos, foi possível encontrar um limite aceitável para eliminação da bactéria da água. O borbulhamento da água com ozônio foi eficiente para eliminar a bactéria nos três tempos testados 1, 2 e 3 minutos. Beardsell e Bankier (1996) relataram o controle de bactérias, fungos, oomicetos e vírus pelo tempo de contato mínimo de 1, 16, 8 e 75 minutos, respectivamente. Nos ensaios foi verificado que para eliminar a bactéria da água foi necessário um tempo mínimo de dez minutos de exposição radiação ultravioleta.

Ferro et al., (2018) infestaram água com diversas estirpes de *Ralstonia* e colocaram em exposição a radiação UV por um intervalo de tempo entre 15 a 150 segundos. Ao final do teste, eles constataram que mesmo por 150 segundos de exposição ainda foi possível encontrar células bacterianas vivas. Estes mesmo autores testaram o efeito do cloro em água contaminada pelo patógeno, utilizando uma dosagem única de 5 mg/L com tempo de contato entre 2 a 60 minutos, os resultados foram satisfatórios a partir de 7 minutos. Pelo método da água clorada, foi verificado a inativação da bactéria pelo tempo mínimo de 25 minutos a uma concentração de 2 mg/L de cloro na água. Resultados semelhantes foram descritos por Machado et al., (2013), sendo relatado que com aproximadamente 1,7 mg/L de cloro ativo na água por 30 minutos foi possível eliminar os inóculos de *Ralstonia solanacearum* da água.

#### **4.3.2 Avaliação da fitotoxicidade do cloro em mudas de eucalipto**

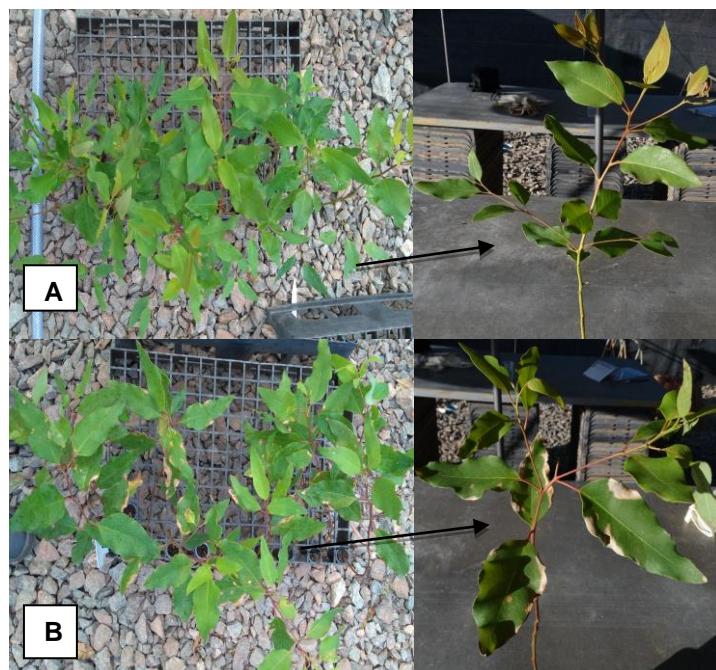
De posse da concentração mínima de cloro para erradicar a bactéria da água de irrigação (2 mg/L / 25 min), um experimento com diversas concentrações (0 a 4 mg/L) foi realizado para avaliar o efeito da fitotoxicidade do cloro presente na água de irrigação sobre as mudas de eucalipto. Não houve diferença estatística entre a altura das mudas dos três genótipos de eucalipto e as diferentes doses de cloro aplicadas via água de irrigação após 60 dias do início do teste (Tabela 7). No entanto, foi observada visualmente uma leve fitotoxicidade nas mudas de todos os genótipos irrigados com água contendo 4 mg/L de cloro (Figura 11).

**Tabela 7 – Altura média de mudas de três genótipos de eucalipto após 60 dias de irrigação com água contendo diferentes concentrações de cloro**

Tratamentos / NaClO (mg/L)*	Altura média das mudas (cm)		
	Genótipo 1	Genótipo 2	Genótipo 3
T1= 0,00	35,49a	30,43a	38,44a
T2= 0,01	30,97a	29,58a	37,75a
T3= 0,05	32,92a	30,75a	34,38a
T4= 0,10	33,07a	30,92a	35,26a
T5= 0,50	29,24a	29,38a	35,98a
T6= 0,75	34,01a	30,61a	35,58a
T7= 1,00	35,90a	28,53a	34,27a
T8= 2,00	31,11a	29,85a	34,36a
T9= 4,00	32,24a	24,73a	33,34a
C.V. (%)	19,62	19,23	7,52

Médias seguidas por uma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% probabilidade. \*NaClO = Concentrações de hipoclorito de sódio na água de irrigação.

**Figura 11 – Mudanças de eucalipto após 60 dias de irrigação com água contendo cloro. A – Mudanças do T1, sem sintomas de fitotoxicidade; B – Mudanças do T9, com sintomas de fitotoxicidade**

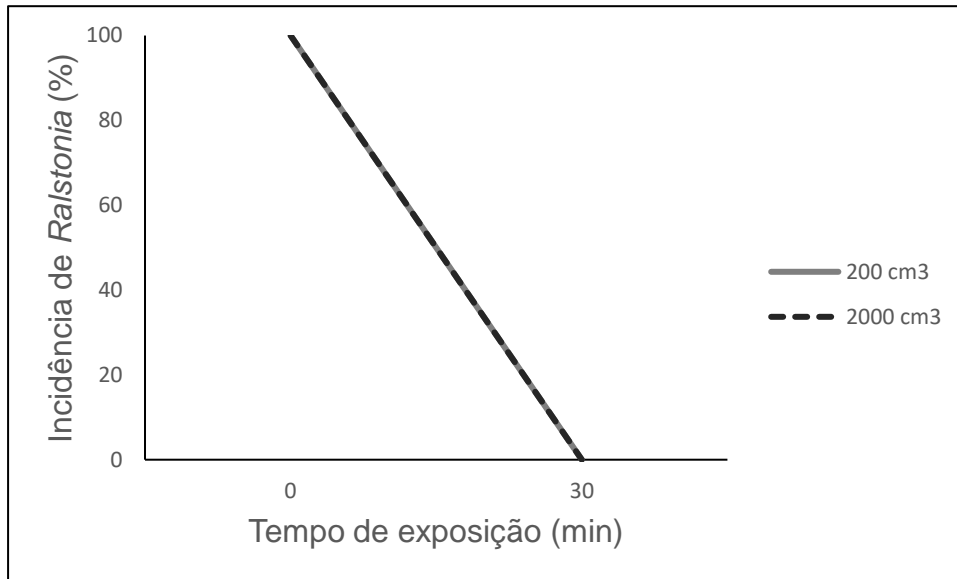


Avaliar os efeitos que água de irrigação com cloro pode causar a uma cultura é requisito básico antes de se colocar em prática a irrigação de mudas em viveiro com a água clorada. Neste estudo, foi adicionado à água concentrações entre 0,01 a 4 mg/L de cloro e, apesar de ter sido observado uma leve fitotoxicidade nas plantas que foram irrigadas com água clorada na concentração de 4 mg/L, este evento não ocasionou um efeito negativo no desenvolvimento das mudas, evidenciada pela altura média das plantas não diferirem significativamente entre as plantas irrigadas com água com e sem cloro. Machado et al., (2013) conduziram um estudo no qual três genótipo de eucalipto foram irrigados duas vezes ao dia num período de 45 dias com água contendo concentrações de cloro em intervalos de 1,74 a 4,0 mg/L. Após 45 dias de teste os autores concluíram que nenhuma das concentrações aplicadas causaram fitotoxicidade ou redução de crescimento das mudas de eucalipto para os três materiais genéticos testados. Os resultados para o desenvolvimento das mudas foram semelhantes aos verificados neste estudo. No entanto, divergiram em relação a fitotoxicidade. De fato, alguns fatores podem ocasionar estas divergência em resultados, a começar pelas condições ambientais onde os testes foram realizados, além disso, as mudas aqui avaliadas, no início do teste chegaram a ser irrigadas aproximadamente 40 vezes ao dia, reduzindo para 4 após 10 dias de ensaio, permanecendo nesta quantidade até o teste completar 60 dias. Sendo assim, pode ter havido um acúmulo maior de resíduos de cloro nas folhas das mudas dos três genótipos e, conseqüentemente, ter ocasionado a fitotoxicidade. Não foi encontrado outros estudos com resultados semelhantes do efeito do cloro em mudas de eucalipto para comparar os sintomas, porém os sintomas de fitotoxicidade observados neste ensaio são parecidos aos relatados por Malavolta et al. (1980), que ao irrigar espécies de soja com água clorada, constatou a presença de necrose esbranquiçada das margens foliar que se enrolam para cima em folhas mais velhas.

#### **4.3.3 Desinfestação do substrato**

Para desinfestação do substrato de inóculos de *Ralstonia*, dois volumes (200 cm<sup>3</sup> e 2000 cm<sup>3</sup>) foram submetidos ao processo de termoterapia. Em ambas amostras, as células bacterianas foram inativadas a uma temperatura de 121°C, sob pressão de 1,5 Kgf/cm<sup>2</sup> pelo tempo mínimo de 30 minutos (Figura 12). Apenas no controle positivo foi detectado a bactéria.

**Figura 12 – Inativação de inóculos de *Ralstonia* do substrato por meio da termoterapia**



A erradicação de microrganismos pelo método da exposição a uma fonte de calor é uma técnica bastante recorrida e tem se mostrado eficiente quando aplicada aos mais variados grupos de patógenos causadores de doenças em plantas. Segundo Bergamin e Kimati (1995) a emissão do calor por equipamentos com resistência, fornalha que induza a produção de calor ou equipamento que emita vapor de água, vai agir reduzindo a carga de patógenos ou até mesmo esterilizando o solo ou o substrato. De fato, a esterilização total do solo ou substrato vai depender do tempo de exposição a fonte de calor usada. Bergamin e Kimati (1995) relataram que é possível eliminar a maioria de fungos e bactérias fitopatogênicas ao expor a uma temperatura de 60 a 70°C por 30 minutos. No presente ensaio, lançando mão de uma autoclave, dois volumes de substrato inoculados com *Ralstonia* foram expostos a vapor de água a uma temperatura de 121°C por 30 minutos. Por fim, foi constatado que esta condição foi eficiente na eliminação da bactéria do substrato.

#### **4.3.4 Sistema de assepsia de um viveiro comercial de mudas de eucalipto**

Baseados nos ensaios em laboratório, os quais foram testados com sucesso para desinfestação da água e do substrato infestados com inóculos bacterianos de *Ralstonia*, foi projetado e implantado um protótipo para limpeza da água, chamado

de Sistema de Cloração da Água de Irrigação (SCAI) (Figura 13) e uma autoclave industrial chamada de Câmara de Esterilização de Substrato (CES) em viveiro comercial de mudas de eucalipto (Figura 14). A linha do SCAI foi formada por um tanque de liberação de cloro, seguida por um clorador, um tanque de água clorada, dois filtros de carvão ativado e um tanque de água sem cloro (Figura 15). Sensores em tempo real foram adicionados ao clorador, tanque de água clorada e após os filtros de carvão ativado para monitorar a concentração de cloro (Figura 16). Cada tanque tem capacidade para armazenar 100 m<sup>3</sup> de água. A CES foi projetada para ranges de temperatura de 100 a 121°C, pressão que pode variar de 0 a 1,5 Kgf/cm<sup>2</sup> e com capacidade para esterilizar 4 m<sup>3</sup> de substrato por ciclo do processo. O substrato é injetado na câmara por meio de 4 gaiolas vazadas para dissipação do calor úmido, cada uma com capacidade de 1 m<sup>3</sup>, com auxílio de carrinhos projetados para esta finalidade (Figura 17).

**Figura 13 - Sistema de Cloração da Água de Irrigação (SCAI)**



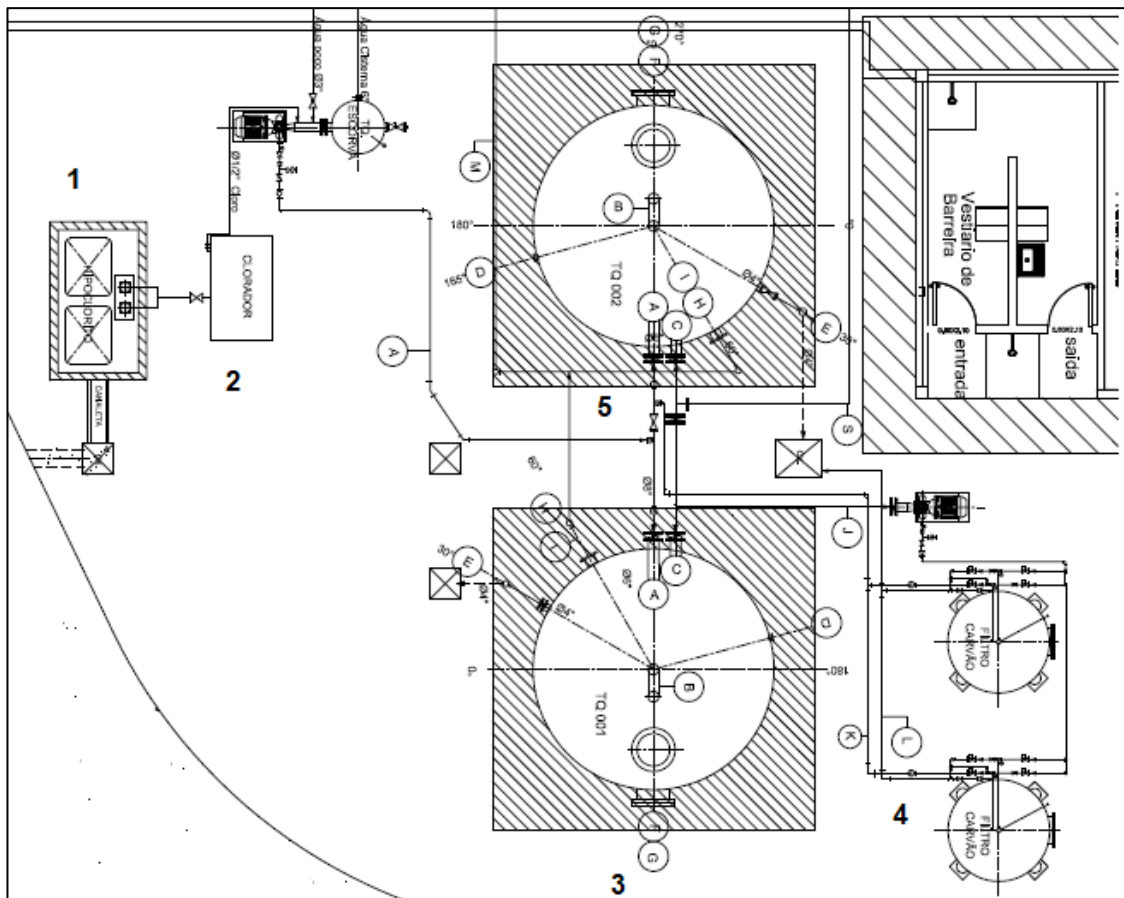
Fonte: Bracell Bahia Florestal Ltda.

**Figura 14 - Câmara de Esterilização de Substrato (CES)**



Fonte: Bracell Bahia Florestal Ltda.

**Figura 15 - Diagrama esquemático do SCAI\***

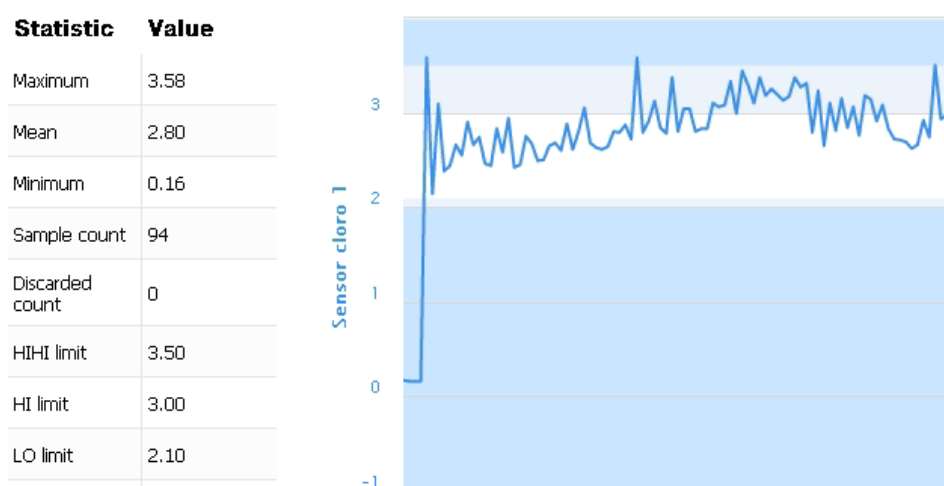


Fonte: Bracell Bahia Florestal Ltda.

**\*Fluxo do SCAI:**

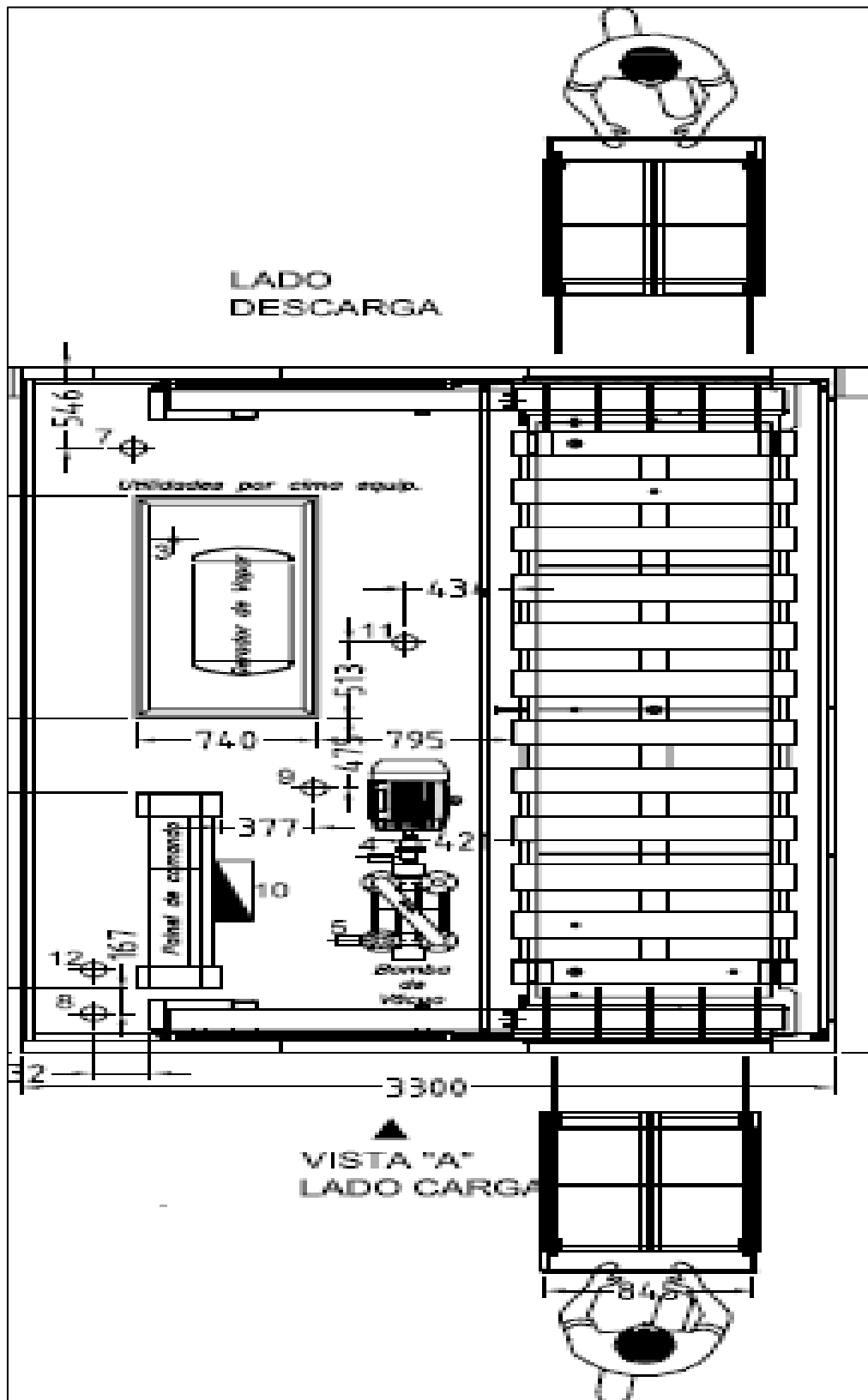
- 1- **Casa com tanque de estoque de cloro:** local de armazenamento e liberação do cloro usado no sistema;
- 2- **Clorador:** bomba injetora de cloro na água;
- 3- **Tanque de água clorada:** tanque estacionário da água com concentração mínima de 2 mg/L de cloro por 25 minutos;
- 4- **Filtros de carvão ativado:** filtragem do cloro da água
- 5- **Tanque de água clorada:** tanque para armazenamento de água após a filtragem do cloro e, posterior liberação para irrigação das mudas.

**Figura 16 – Representação gráfica da concentração de cloro na água em tempo real**



Fonte: Bracell Bahia Florestal Ltda.

Figura 17 - Diagrama esquemático da CES



Fonte: Bracell Bahia Florestal Ltda.

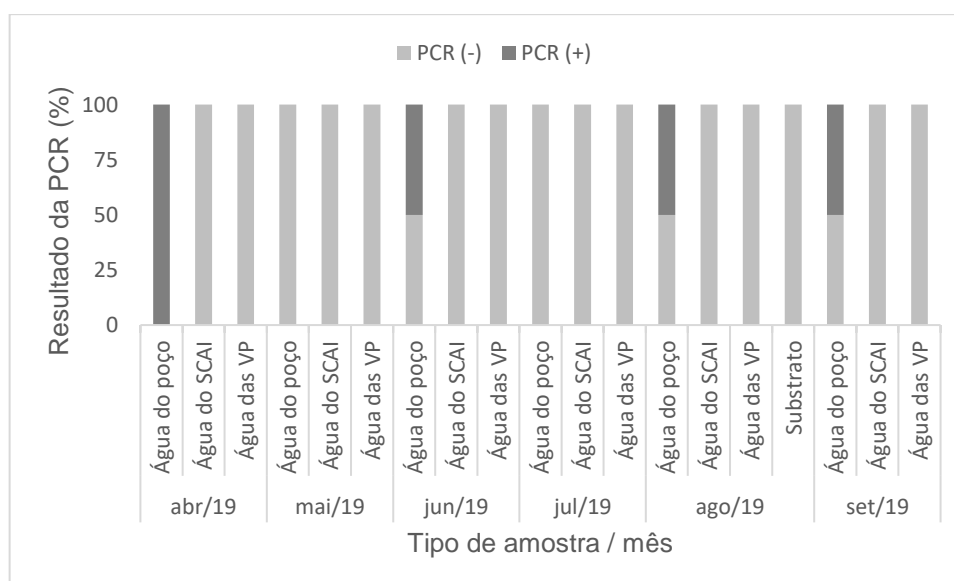
**Legenda:**

**Lado carga:** entrada da gaiola com capacidade de 1 m<sup>3</sup> de substrato;

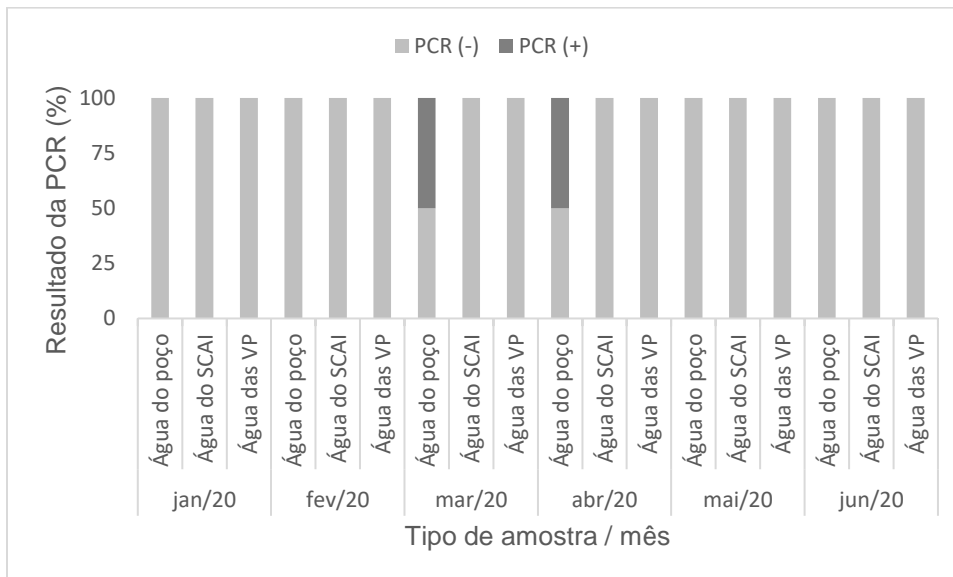
**Lado descarga:** saída das gaiolas com substrato após 30 min de esterilização.

O monitoramento da água em todos os pontos do sistema (SCAI), válvulas de irrigação dos patamares (VP) e poços, nos mostrou que apenas a água dos poços foi positiva para *Ralstonia* e que após passar pelo sistema de cloração se manteve sem inóculo da bactéria em todas as válvulas de irrigação do minijardim a maturação (Figuras 18, 19). Esta mesma eficiência foi observada no monitoramento do substrato esterilizado (Figura 20), este dados comprovam a eficácia do sistema de assepsia.

**Figura 18 – Resultados da PCR do monitoramento de *Ralstonia* na água de irrigação de um viveiro comercial de mudas de eucalipto no período entre abril a setembro de 2019**

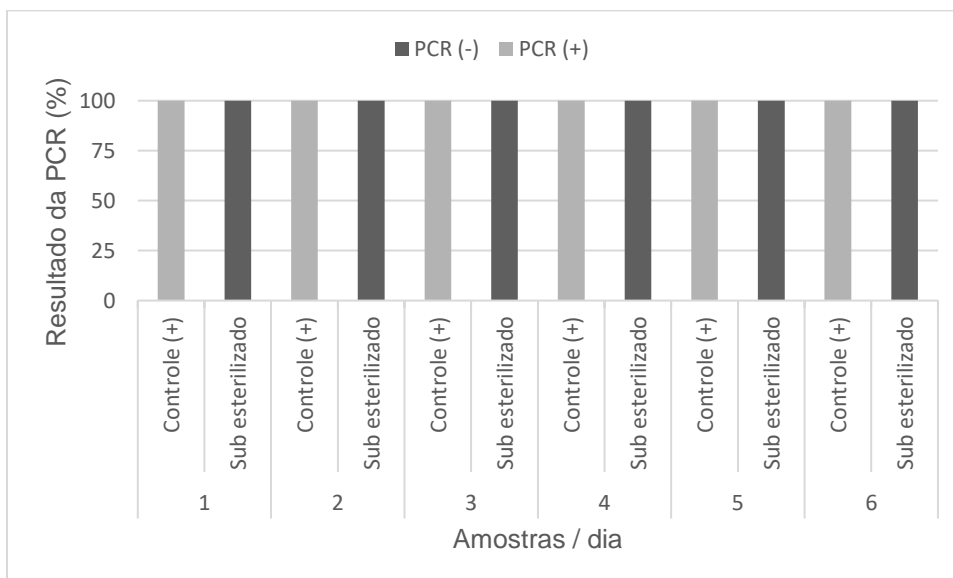


**Figura 19 – Resultados da PCR do monitoramento de *Ralstonia* na água de irrigação de um viveiro comercial de mudas de eucalipto no período entre janeiro a junho de 2020**



\* Água do VP = água coletada das válvulas dos patamares (minijardim, estaqueamento, casa de vegetação, sombreamento, crescimento e maturação).

**Figura 20 – Resultados do monitoramento de *Ralstonia* após a esterilização do substrato na CES em contraste com controle positivo**



#### 4.3.5 Custos para implantação do sistema de assepsia do viveiro

O custo total para implantação do sistema de assepsia de um viveiro de produção de mudas clonais de eucalipto foi de R\$ 780.000,00. Deste, R\$ 450.000,00, foram empregados no Sistema de Cloração da Água de Irrigação (SCAI)

e, R\$ 330.000,00, foram destinados para implantação da Câmara de Esterilização de Substrato (CES).

Todos os ensaios de laboratório para a descontaminar a água de inóculos de *Ralstonia* foram bem-sucedidos e, pelo menos, um ou mais tratamento por experimento, teste de ozônio, radiação UV e cloro promoveram inativação da bactéria e tinham potenciais para serem implantados em um sistema de limpeza da água de irrigação. Entretanto, após uma avaliação financeira de custos de implantação e manutenção mensal do sistema, foi verificado que tratar água de irrigação por meio da aplicação de ozônio ou radiação ultravioleta os custos seriam bastante elevados. Em contrapartida, os resultados dos testes de cloro foram eficientes para eliminar o patógeno da água, a partir da adição de 2 mg/L de cloro ativo na água, com limite de 4 mg/L, concentração obtida como tóxica às plantas, caso os filtros de carvão ativado sofram quaisquer inoperância. Os custos de implantação e manutenção para um Sistema de Cloração da Água de Irrigação foram mais baixos quando comparado ao do tratamento com ozônio ou radiação UV. Dessa forma, justificou-se a escolha de se implantar um sistema de tratamento de água utilizando cloro. Já para implantação da Câmara de Esterilização de Substrato, foi selecionado o método de eliminação da bactéria pela exposição ao calor por meio de vapor de água e por ser um método prático e historicamente umas das formas mais eficazes para eliminação de microrganismos.

Apesar de ter sido realizado um teste para avaliar o efeito fitotóxico do cloro e, neste ensaio, verificou-se que as mudas de três genótipos de eucalipto suportaram irrigação com água contendo até 3 mg/L de cloro sem apresentar fitotoxicidade, o SCAI foi projetado de modo que após tratar água com cloro, a mesma seja filtrada por carvão ativado, pois neste estudo não foi possível examinar o efeito fisiológico que pode ser provocado nas mudas irrigadas continuamente com a água clorada. Por outro lado, foi possível observar que, em caso de falha do sistema de filtração de cloro, as mudas poderiam suportar por alguns dias sem apresentar sintomas de fitotoxicidade. O sistema foi projetado para que após o final do processo de cloração, a água saísse livre de cloro pelo processo de filtração com carvão ativado, contudo, há uma tolerância que após a filtração da água, a mesma pode sair com uma concentração de até 0,05 mg/L de cloro. Diante do exposto, se explica porque em nosso ensaio de efeito fitotóxico do cloro, também, testamos as baixíssimas

concentrações de cloro na água, bem como há a trava no processo de cloração, que consiste entre 2 e 4 mg/L.

Embora exista na literatura diversos métodos para limpeza da água e esterilização de substrato para o cultivo de mudas agrícolas e florestais, a maioria tem apenas os resultados de ensaio em laboratório, não sendo observado um sistema deste porte implantado para o manejo preventivo de doenças dentro do viveiro, sendo que estes dois insumos podem ser grandes disseminadores de agentes fitopatogênicos dentro de um viveiro florestal e agrícola. Portanto o sistema de assepsia aqui montado é tido como inovador e ao longo de 1,5 ano de operação já renderam bons resultados, principalmente, no aspecto da fitossanidade e qualidade das mudas, assim, observado desde as cepas do minijardim clonal até expedição das mudas com 90 dias de idade.

Apesar da dosagem mínima para erradicação da bactéria *Ralstonia* ter sido 2 mg/L de cloro ativo por 25 min, foi adotado uma injeção de cloro ativo no sistema na concentração de 3 mg/L, impulsionado pelos resultados do teste de fitotóxicidade, onde uma leve fitotóxicidade foi observada apenas a partir de 4 mg/L e para garantir a estabilidade de no mínimo 2 mg/L de cloro de acordo a necessidade de vazão do viveiro. Com isso, aumentar, também, o espectro de ação sobre outros patógenos que podem ser disseminado pela água. Alguns patógenos que podem causar doenças no eucalipto já foram relatados como contaminantes de água, a exemplo disso, Freitas et al., (2001) relataram a presença de espécies de *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium* e *Rhizoctonia* na água de rios e outros mananciais. Já Mafia et al. (2008) constataram esporos de *Cylindrocladium* e *Botrytis* na água de irrigação de mudas de eucalipto. Embora não tenha sido testado nos experimentos a ação erradicante do cloro para outros patógenos encontrados em viveiros de mudas de eucalipto, existem alguns relatos descritos na literatura que mostram resultados satisfatórios. Machado et al., (2013) relataram que uma concentração mínima de cloro de 1,6 a 1,74 mg/L, foram eficientes para erradicar da água inóculo de *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis*, *Botrytis cinerea* e *Cylindrocladium candelabrum*.

Para complementar o manejo preventivo todos os canaletões do minijardim estão sendo repovoados com matrizes oriundas de material micropropagados e que passaram pelo processo de limpeza clonal em laboratório de cultura de tecidos.

Diante da eficácia do sistema de assepsia com a implementação do SCAI e do CES, dos bons resultados obtidos na fitossanidade das mudas com as medidas de manejo preventivo para *Ralstonia* e com ação indireta para outro patógeno e o modelo inovador dentro de um viveiro de produção de mudas, será solicitado a patente dos dois sistemas implantados.

## 5 CONCLUSÕES

- A agressividade do isolado de *Ralstonia* 924/19 foi confirmada pelos testes de virulência e patogenicidade;

- O método de injeção na base do caule dos explantes foi o mais eficiente por induzir os sintomas de murcha bacteriana em plântulas micropropagadas em menos tempo;

- O método rápido para *screening* in vitro é potencialmente funcional e pode ser empregado para avaliação em massa de genótipos de eucalipto em condição de micropropagação;

- As análises da morfologia de vasos de xilema de três genótipos de eucalipto indicaram que não há diferença estatística no tamanho dos vasos para plantas com e sem infecção por *Ralstonia solanacearum* e as plantas infectadas tinham mais vasos ocluídos por tilose em plantas com exsudação de pus bacteriano;

- Os três ensaios de laboratório para a descontaminação da água e do substrato de inóculos de *Ralstonia solanacearum* foram bem-sucedidos e, pelo menos, um/ou mais tratamento por experimento, promoveram inativação da bactéria e podem compor estratégias de manejo fitossanitário;

- A irrigação com água contendo 4 mg/L de cloro induziu fitotoxicidade em mudas de três genótipos de eucalipto;

- A implantação dos sistemas de assepsia foi eficiente em erradicar inóculos da bactéria *Ralstonia solanacearum* da água de irrigação e substrato de um viveiro florestal comercial.

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 2005.
- ALFENAS, A. C. et al. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.4, p.357-366, 2006.
- ALFENAS, A.C. MAFIA, R.G. Controle integrado de doenças em viveiros clonais e aspectos relativos à ferrugem (*Puccinia psidii*) do eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.156-163, 2003.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E. Â, V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2ª Ed. Viçosa MG. Editora UFV, 2009.
- ÁLVAREZ, B.; LÓPEZ, M. M.; BIOSCA, G. E. Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. **Microbiology**, v.154, p.3590-3598, 2008.
- AUER, C. G.; SANTOS, A. F.; RODRIGUES NETO, J. Ocorrência de murcha bacteriana em plantios de *Eucalyptus grandis* no estado de Santa Catarina. Resumos **Trop. Plant Pathol**, v.33, 370 p., 2008.
- BEARDSELL, D.; BANKIER, M. Monitoring and treatment of recycled water for nursery and floriculture production. **Horticultural Australia Ltd. Final Report NY515**. 1996.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. História da fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KI-MATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p.1-12, 1995.
- BENTSINK, L. et al. Amplification of RNA by NASBA allows direct detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in potato. **Journal of applied microbiology**, v. 93, n.4, p.647-655, 2002.
- BERESWILL, S.; BUGERT, P.; VOLKSCH, B.; ULLRICH, M.; BENDER, CL.; GEIDER, K. Identification and relatedness of coronating producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of amplification products. **Appl Environ Microb**, v.60, p.2924-2930, 1994.
- BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; LÓPEZ, M. M.; CAMBRA M. Multiplex nested reverse-transcription polymerase chain reaction in a single tube for sensitive detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. **Phytopathology**, v.93, p.286-292, 2003.
- BRACELPA - Associação Brasileira de Celulose e Papel. **Eucalipto**. São Paulo: BRACELPA. 2011.

CAMPOS, K. R. A.; ISHIDA, A. K. N.; FREIRE, A. N. R.; SILVA, C. T. B. Variabilidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* no estado do Pará. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.3, 2017.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM – Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

CARSTENSEN, G. D. et al. Two *Ralstonia* species associated with bacterial wilt of *Eucalyptus*. **Plant Pathology**, v.66, n.3, p.393-403, 2017.

CARUSO, P.; PALOMO, J. L.; BERTOLINI, E.; ÁLVAREZ, B.; LÓPEZ, M.; BIOSCA, E. G. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: recovery of stressed cells at low temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.140-148, 2005.

CIESLA, W.M.; DIEKMANN, M.; PUTTER, C. A. *Eucalyptus* spp. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm, n.17, 1996.

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

COUTINHO, T. A. et al. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. **Forest Pathology**, v.30, n.4, p.205-210, 2000.

CRESTANA, M.S.M.; MOREIRA, R. Plantio de Eucalipto. 2009. Artigo em. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2009\\_3/eucalipto/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2009_3/eucalipto/index.htm)>. Acesso em: 02 de ago. 2019.

DEPEC, Bradesco. **Papel e Celulose**. Disponível em: <[https://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset\\_papel\\_e\\_celulose.pdf](https://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_papel_e_celulose.pdf)>. Acesso em: 21 set. 2019.

DIANESE, J. C.; DRISTIG, M. C. G. Screening *Eucalyptus* selections for resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. In: HARTMAN, G. L.; HAYWARD, A. C. (Ed.). **Bacterial wilt**. Kaohsiung, Taiwan: ACIAR Proceedings, p. 206-210, 1993.

DIANESE, J. C. et al. Susceptibility to wilt associated with *Pseudomonas solanacearum* among six species of *Eucalyptus* growing in equatorial Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v.19, n.3, p.71-76, 1990.

DIANESE, J.C.; TAKATSU, A. *Pseudomonas solanacearum* biovar 1 isolada de eucalipto em Monte Dourado, Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, 362 p., 1985.

ELPHINSTONE, J. G.; HANNESSY, J.; WILSON, J. K.; STEAD, D. E. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers extracts. **Bulletin OEPP**, v.26, p.663-678, 1996.

EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization. Diagnostic protocols for regulated pests. **Bulletin**, v.34, p.155-157, 2004.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. In: **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. Ed. by Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A. C. St. Paul.: American Phytopathological Society Press. p.449–461, 2005.

FERRO, P., VAZ-MOREIRA, I., MANAIA, C. M. Association between gentamicin resistance and stress tolerance in water isolates of *Ralstonia pickettii* and *R. mannitolilytica*. **Folia Microbiologica**, v.64, n.1, p.63-72, 2018.

FOELKEL, C., Elementos de Vaso e Celuloses de Eucalipto. *Eucalyptus* online Book & News letter abril, 2007. Disponível em <[http://www.eucalyptus.com.br/capitulos/PT04\\_vasos.pdf](http://www.eucalyptus.com.br/capitulos/PT04_vasos.pdf)>. Acesso em: 23 mai. 2019.

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.

FRADIN, E. F.; THOMMA, B. P. H. J. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. **Mol. Plant Pathol**, v.7, p.71–86, 2006.

FREITAS, R. G.; HERMENEGILDO, P. S.; GUIMARÃES, L. M. S.; ZAUZA, E. A. V.; BADEL, J. L.; ALFENAS, A. C. Detection and characterization of *Ralstonia pseudosolanacearum* infecting *Eucalyptus* sp. in Brazil. **Forest Pathology**, v.1, 9 p., 2020.

FREITAS, M. A.; NASSER, L. C. B.; CAFÉ FILHO, A. C. **Água contaminada: fitopatógenos infestam a água**. Cultivar HF, v.8, p.2-37, 2001.

FRITSCHI, F. B.; LIN, H.; WALKER, MA. Scanning electron microscopy reveals different response pattern of four Vitis genotypes to *Xylella fastidiosa* infection. **Plant Disease**, v.92, p.276–286, 2008.

FURTADO, E. L.; DIAS D.C.; OHTO, C.T. e ROSA, D.D. **Doenças do eucalipto no Brasil**. Botucatu, Diagrama, 2009, 74 p.

GARRITY G. M. et al. Proteobacteria. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (Eds.). **Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology**. Michigan State University. p.575-623, 2005.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST - **Palaeontological Statistics**, version. 4,03, 2020. Disponível em: < <https://folk.uio.no/ohammer/past/>>. Acesso em: 01 de ago. 2020.

HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Ann. Rev. Phytopathol**, v.29, p.65–87, 1991.

HAYWARD, A. C. *Ralstonia solanacearum*. In: LEDERBERG, J. (Ed.). **Encyclopedia of microbiology**. San Diego: Academic Press, p.32-42, 2000.

IBÁ - INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Indicadores de desempenho do setor nacional de árvores plantadas referentes ao ano de 2018**. Brasília: IBÁ, 2019.

JANSE, J. D. Potato brown rot in Western Europe - history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. **Bulletin OEPP**, v.26, p.679-695, 1998.

JENSEN, M. A.; WEBSTER, J. A.; STRAUS N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphism. **Appl. Environ. Microbiol**, v.59, p.945-952, 1993.

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, v.44, n.12, p.693-695, 1954.

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.

LEBEDA, A.; BUCZKOWSKI, J. *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* - Tube test. In: **Lebeda A (ed.) Methods of Testing Vegetable Crops for Resistance to Plant Pathogens**. VHJ Sempra, VŠÚZ (Research and Breeding Institute for Vegetable Crops) Olomouc, Czech Republic, p.247-249, 1986.

MACHADO, P. S.; ALFENAS, A. C.; ALFENAS, A. C.; COUTINHO, M. M.; SILVA, C. M.; MOUNTEER, A. H.; MAFFIA, L. A.; FREITAS, R. G.; FREITAS, C. S. Eradication of plant pathogens in forest nursery irrigation water. **Plant Disease**, v.97, p.780-788, 2013.

MAFIA, R. G. **Sintomatologia, etiologia e controle da murcha bacteriana do eucalipto**. 2006. 99 f. Tese de Doutorado em Fitopatologia. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 2006.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; PENCHEL FILHO, R. M.; FERREIRA, M. A.; ALFENAS, R. F. Murcha bacteriana: disseminação do patógeno e efeitos da doença sobre a clonagem do eucalipto. **Revista Árvore**, v.36, p.593–602, 2012.

MAFIA, R.G., ALFENAS, A.C., FERREIRA, E.M., MACHADO, P.S., BINOTI, D.H.B., LEITE, F.P.; SOUZA, F.L. Reuse of untreated irrigation water as a vehicle of inoculum of pathogens in eucalyptus clonal nursery. **Tropical Plant Pathology**, v.33, p.96-102, 2008.

MAFIA, R. G.; ALFENAS A. C.; FERREIRA, M. A. 2014. Avaliação da resistência do eucalipto a murcha-bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.38, n.4, p.649-656, 2014.

MALAVOLTA, E. et al. **Efeitos dos excessos de alumínio, cloro e manganês em dois cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. An. Esc. Super. Agric. Luiz de Queiroz. v.37, n.1, p.343-351, 1980.

MARQUES, E. **Murcha bacteriana do eucalipto causada por *Ralstonia solanacearum* Raça 3 biovar 2T: etiologia, influência do solo e controle**. 2012. 187 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Fitopatologia, Brasília. 2012.

MARQUES, E.; REZENDE, D. V.; UESUGI, C. H. Primeiro relato da biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* em eucalipto no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v.34, 12 p., 2009.

MARQUES, E.; UESUGI, C. H.; BLUM, L. E. B. Virulência de estirpes (biovar 1 e 2T) de *Ralstonia solanacearum* a *Eucalyptus* spp. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.43, n.11, 2013.

MARTINI, A. J. **O plantador de eucaliptos: a questão da preservação florestal no Brasil e o resgate documental do legado de Edmundo Navarro de Andrade**. 2004 332f. Dissertação (Mestrado em história Social) Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MASSON, M. V. **Ferrugem do eucalipto: planejamento evasivo, estimativa de dano e análise da viabilidade do controle químico**. 2009. 167f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Proteção de plantas), Faculdade de Ciências Agrônomicas - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, 2009.

MONDAL, K. K.; BHATTACHARYA, R. C.; KAUNDAL, KR Biotechnological strategies in the detection, characterization and management of fungal diseases in plant. **Botanica**, v.54, p.1-20, 2004.

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.

MORAES, G. S. de. **A produção de eucalipto no Brasil: benefícios para o meio ambiente**. Administradores, João Pessoa, 2010. Disponível em:

<<https://www.administradores.com.br/artigos/a-producao-de-eucalipto-no-brasil-beneficios-para-o-meio-ambiente>>. Acesso em: 02 de ago. 2019.

MORISSET, D. et al. Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. **PLoS one**, v.9, n.4, p.96027, 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-97, 1962.

MYBURG, A. A.; POTTS, B. M.; MARQUES, C. M.; KIRST, M.; GION, J. M.; GRATTAPAGLIA, D.; GRIMA-PETTENATI J. *Eucalyptus*. In **Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants**. Volume 7. Edited by Kole CR. Forest trees. New York, NY, USA: Springer p.115–160, 2007.

NESMITH, W. C.; JENKINS, S. F. A selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum* from soil. **Phytopathology**, v.69, p.182-185, 1979.

OPINA, N.; TAVNER, F.; HOLLOWAY, G.; WANG, J. F.; LI, T. H.; MAGHIRANG, R.; FEGAN, M.; HAYWARD, A. C.; KRISHNAPILLAI, V.; HONG, W. F.; HOLLOWAY, B. W.; TIMMIS, J. N.; A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia-Pacific. **Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v.5, p19–33, 1997.

PASCHOLATI, S. F., LEITE, B. Hospedeiro: mecanismo de resistência. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H., Amorim, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p.417-453, 1995.

PASTRIK, K.H.; MAISS, E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. **Journal of Phytopathology**, v.148. p.619-626, 2000.

PIERI, C.; SANTOS, C. C.; SANTOS, D. V.; CARDOSO, J. K. B.; BENSO, L. A.; FURTADO, E. L. Principais doenças na eucaliptocultura no Brasil. In: BALDIN, E. L. L.; KRONKA, A. Z.; SILVA, I. F (Eds). **Inovações em manejo fitossanitário**. Botucatu. FEPAF, p.16–31, 2017.

PINHEIRO, C. R. **Estudo da diversidade genética de *Ralstonia solanacearum* raça 2 no Brasil**. 2010. 61 p. Dissertação (Mestre em Biotecnologia Vegetal) – Lavras: UFLA, 2010.

ROBBS, C.F., CRUZ, A.P.; NETO, J.R. Algumas estratégias de controle à murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em eucaliptos. EMBRAPA Jaguariúna, SP. **Comunicado Técnico**, n.3, 4p., 1988.

ROCHA, A. P. A.; SANTOS, A. F.; SOARES, N. S. **Padrão de variação estacional dos preços do eucalipto no estado de São Paulo, 2009 A 2014**. Informações Econômicas, SP, v.45, n.5, 2015.

RUSSELL, G. E. **Plant Breeding for Pest and Disease Resistance**. Butterworths, London, UK, 485 p., 1978.

SEAL, S. E. et al. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. **Microbiology**, v.139, n.7, p.1587-1594, 1993.

SHI, Z. M. et al. Studies on selection of *Eucalyptus* for resistance to bacterial wilt and resistance stability. **Guangxi Forestry Science**, v.29, n.1, p.1-6, 2000.

SILVA, J. C. et al. Influência de idade e da posição radial nas dimensões das fibras e dos vasos da madeira de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden Wood. **Revista Árvore**, v.31, n.6, p.795-799, 2007.

SMITH, E. F. A bacterial disease of tomato, pepper, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.). United States Department of Agriculture, Division of Vegetable Physiology and Pathology. **Bulletin**, v.12, p.1-28, 1896.

STEANE, D. A.; NICOLLE, D.; SANSALONID, C. P.; PETROLID, C. D.; CARLINF, J.; KILIANF, A.; MYBURGG, A. A.; GRATTAPAGLIAD, D.; VAILLANCOURTA, R. E. Population genetic analysis and phylogeny reconstruction in *Eucalyptus* (Myrtaceae) using high-throughput, genome-wide genotyping. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.59, p.206-224, 2011

STEVENSON, J. F.; MATTHEWS, A. M.; ROST, T. L. Grapevine susceptibility to Pierce's disease I: relevance of hydraulic architecture. **Am. J. Enol. Viticult**, v.55, p.228-237, 2004.

SUDO, S., OLIVEIRA, G.H.N.; PEREIRA, A.C. Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e bracatinga (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. **Fitopatologia Brasileira**, v.8, p.631, 1983.

SVABOVÁ, L.; LEBEDA, A. "in vitro" selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. **J Phytopathol**, v.153, p.52-64, 2005.

TRIPATHI, L.; ODIPIO, J.; TRIPATHI, J. N.; TUSIIME, G. A rapid technique for screening banana cultivars for resistance to *Xanthomonas* wilt. **Eur J Plant Pathol**, v.121, p.1-9, 2008.

WEI, R-P.; LUO, Z.; FANG, B. Clonal variation of eucalypts in susceptibility to bacterial wilt detected by using different inoculation methods. **Silvae Genet**, v.63, p.1-2, 2014.

WELLER, S. A. et al. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.7, p.2853-2858, 2000.

WU, Q. P.; LIANG, Z. C. Selection of species and provenance of *Eucalyptus* for resistance to bacterial wilt. **Journal South China Agriculture University**, v.9, n.1, p.41-45, 1988.

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