



8º Congresso de extensão universitária da UNESP

"Diálogos da Extensão:
do saber acadêmico à prática social"

Realização:
unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL "JULIO DE MESQUITA FILHO"
PROEX
PROG. DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA

Incidência de *Ralstonia* em amostras enviadas para análise na Clínica de Patologia Florestal.

Ana Carolina Firmino¹, Denise Nakata Nozaki², Bruno Tamelini², Camila Maciel Viana², Carolina Dias², Lucas Benso², Mirian Roedas², Edson Luiz Furtado². ¹UNESP-Campus Experimental de Dracena, CEP:17900-000, Dracena/SP; ²UNESP-FCA, Departamento de Proteção de Plantas, CEP:18610-307, Botucatu/SP.

Eixo: Os Valores para Teorias e Práticas Vitais

Resumo

O Brasil é um dos maiores produtores de eucalipto mundo. Com o aumento do plantio desta cultura no país muitas doenças que antes não eram relatadas vem causando problemas. Entre os microrganismos fitopatogênicos que vem causando prejuízos neste segmento encontram-se as bactérias. Uma das bactérias que vem ganhando repercussão diante dos problemas causados é *Ralstonia solanacearum*. Esta bactéria se desenvolve nos vasos da planta causando murcha e seca. Diante deste problema o trabalho teve como objetivo realizar o levantamento da incidência *R. solanacearum* em amostras recebidas na Clínica de Patologia Florestal da UNESP/Campus Botucatu. Foram analisadas amostras de plantas, água e solo. As bactérias foram isoladas em meio de cultura Kelman, coletadas após seu desenvolvimento e seu DNA foi extraído para detecção através de amplificação via oligonucleotídeo específico. Nas análises realizadas foram detectadas 20,64, 6,25 e 14,31% de incidência da doença nas amostras recebidas de plantas, água e solo, respectivamente. Como não há produtos químicos para o controle desta bactéria e diante dos resultados obtidos fica claro que existe a necessidade de tomada de algumas medidas de controle como uso de mudas sadias e higienização do ambiente de trabalho.

Palavras Chave: detecção, bactéria, eucalipto.

Abstract

Brazil is one of the world eucalyptus producers. With the increased planting of this crop in the country many diseases that were not previously reported have been causing problems. Among the phytopathogenic microorganisms which have caused losses in this segment are bacteria. One of the bacteria that has gained repercussion on the problems caused is *Ralstonia solanacearum*. This bacterium develops in plant pots causing wilt and dry. Faced with this problem the study aimed to survey the incidence *R. solanacearum* in samples received in Forest Pathology Clinic of UNESP / Botucatu. Samples of plants, water and soil were analyzed. The bacteria were isolated in the middle of Kelman culture, collected after their development and their DNA was extracted for detection by amplification via specific oligonucleotide. The analyzes were detected 20.64, 6.25 and 14.31% incidence of the disease in the samples received from plants, water and soil, respectively. Since there are no chemicals to control this bacterium and before the results it is clear there is a need of taking some control measures such as use of healthy seedlings and sanitizing the work environment.

Keywords: detection, bacterial, eucalyptus

Introdução

O Brasil tem a segunda maior área plantada de *Eucalyptus*, com aproximadamente 4,2 milhões de hectares. Os principais estados produtores são Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Rio Grande do Sul

e Espírito Santo (ABRAF, 2009). Em função das condições edafo-climáticas e do nível tecnológico adotado, o setor florestal brasileiro é um dos mais competitivos do mundo, chegando a atingir valores da ordem de 45-60 m³/ha/ano (MORA; GARCIA, 2000).



8º Congresso de extensão universitária da UNESP

"Diálogos da Extensão:
do saber acadêmico à prática social"

Realização:

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"

PROEX
PROG. DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA

Com o aumento do plantio desta espécie algumas doenças que antes não eram consideradas problemas para esta cultura estão se tornando relevantes. Dentre elas está a murcha causada por bactérias do gênero *Ralstonia* que tem crescido em importância em virtude da área atingida e dos danos causados.

A primeira ocorrência de murcha bacteriana na cultura do eucalipto em campo foi no município de Prata, Minas Gerais, relatada por Sudo et al. (1983). Posteriormente, Dianese e Takatsu (1985) isolaram *R. solanacearum* de eucalipto no estado do Pará e Robbs et al. (1988) detectaram a presença desta bactéria na Bahia. Mais recentemente Auer et al. (2008) relataram a murcha bacteriana no Estado de Santa Catarina.

A doença é causada pela biovar 1. Nos Estados da Bahia, Minas Gerais e do Pará esta bactéria foi responsável por grandes perdas principalmente em viveiros. O ambiente para produção de mudas de eucalipto corresponde ao ideal para sobrevivência e disseminação desta bactéria. Atualmente não há clones e nem produtos químicos para controle da doença causada por *Ralstonia* (ALFENAS et al., 2006).

Marques (2012) avaliando a susceptibilidade dezessete espécies de *Eucalyptus* à duas estirpes de *Ralstonia solanacearum*, através do teste de microbiolização de sementes, detectou que germinação e desenvolvimento das plântulas variaram conforme a estirpe inoculada, sendo que a estirpe UnB 1359 (biovar 2T), recentemente descrita em eucalipto, quando comparada a UnB 575 (biovar 1), foi mais agressiva, causando mais que 50% de morte das sementes em 13 das 17 espécies analisadas, enquanto a segunda estirpe só em 8 espécies. Este mesmo autor aponta que o híbrido "urograndis" e as espécies *E. deanei*, *E. pilularis* e *E. robusta* foram consideradas tolerantes a ambas as estirpes.

Esta bactéria coloniza a parte vascular da planta causando como sintomas primários o escurecimento destes vasos. Por causar problemas nos vasos da planta, interrompendo o fluxo de água, a planta demonstra como sintoma secundário murcha e consequentemente seca (Figura 1). Em sintomas crônicos, ocorre a necrose das raízes e a planta morre após dois a seis meses da infecção (MAFIA, 2006). Com relação ao controle dessa bacteriose, Takatsu e Lopes (1997) citam que o principal fator a ser considerado é o plantio em solo livre do patógeno, porém esta bactéria é nativa de solos brasileiros o que dificulta seu controle. Também é recomendado o plantio de material propagativo livre

do patógeno, pois *R. solanacearum* é disseminada via plantas infectadas.



Figura 1. Muda morta por *Ralstonia*

Objetivos

O trabalho teve como objetivo realizar o levantamento da incidência *R. solanacearum* em amostras recebidas na Clínica de Patologia Florestal da UNESP/Campus Botucatu.

Material e Métodos

1. Realização das amostras

Foram usadas amostras recebidas durante o período de 2013 a 2014. Estas amostras consistiam de plantas, solo e água de casa de vegetação.

2. Isolamento de bactéria de plantas

Fragmentos do material recebido foram submetidos a uma desinfestação superficial com álcool 70% durante 1 minuto, seguido de uma submersão em hipoclorito de sódio a 2%, durante 1 minuto finalizando com uma lavagem em água destilada autoclavada por mais 1 minuto. Os fragmentos desinfestados foram macerados em água destilada esterilizada e com o auxílio de uma alça de platina o líquido obtido da maceração foi riscado em meio Kelman (Glucose 10 g, Peptona 10 g, Caseína 1 g, Ágar 18 g, Cloridrato de Tetrazólio e 1 litro de água destilada). Após esta etapa as placas riscadas dos materiais foram colocadas para crescimento das colônias em condições controladas (25±1°C em fotoperíodo alternado de 12 horas).

3. Isolamento da Bactéria a partir de água e solo.

Inicialmente amostras do solo e da água foram diluídas a uma concentração 10⁻¹ (10g de solo e 90 ml de água esterilizada). Pós esta etapa foram realizadas diluições seriadas até a concentração



8º Congresso de extensão universitária da UNESP

"Diálogos da Extensão:
do saber acadêmico à prática social"

Realização:

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"

PROEX
PROG. DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA

10^{-4} . Em seguida foi transferido 0,1ml da concentração desejada para placa de Petri contendo meio de Kelman para o microrganismo e com o auxílio de um rodo de vidro esparramou-se a suspensão.

4. Coleta e Análise das amostras de Bactérias

Após cinco dias as bactérias foram coletadas (Figura 2) e foi realizada a extração de DNA das bactérias segundo o método desenvolvido por Murray & Thompson (1980).



Figura 2. *Ralstonia* de desenvolvendo em meio de cultura Kelman.

A reação de PCR foi feita utilizando os pares de primers PS1 1 (5-AGT CGA ACG GCA GCG GGG G-3) e PS 2 (5-GGG GAT TTC ACA TCG GTC TTG CA-3), específicos para *R. solanacearum*. Para a PCR, empregaram-se os procedimentos descritos por Pastrik e Maiss (2000). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose corado com gel red e observados sob luz UV.

Resultados e Discussão

Foram analisadas 2714 plantas de eucalipto, 27 amostras de solo coletadas em viveiros de produção de mudas e 16 amostras de água coletadas em diferentes encanamentos usados para irrigação de mudas em viveiro.

Nas análises realizadas foram detectadas 20,64, 6,25 e 14,31% de incidência da doença nas amostras recebidas de plantas, água e solo, respectivamente (Figura 3 e 4).

A detecção desta bactéria em solo e água é algo preocupante, visto que este é melhor meio de disseminação de bactérias fitopatogênicas. Segundo Alfenas et al (2006) em 2005, a alta incidência de *Ralstonia* em viveiros de mudas de eucalipto resultou em grandes prejuízos em vários

Estados brasileiros. Nestes prejuízos não estavam somente contabilizadas as mudas eliminadas mas também toda a estrutura do viveiro que foi contaminada e descartada, como areia do minijardim clonal, mangueiras de gotejamento, etc.

Como não há produtos químicos para o controle desta bactéria e diante dos resultados obtidos fica claro que existe a necessidade de tomada de algumas medidas de controle. Dentre elas pode-se citar uso de tesouras desinfestadas para coleta de miniestacas e poda das mudas, uso de material esterilizado no manejo das plantas, lavagem e higienização das mãos no momento da coleta e formação de mudas, compra de mudas sadias para impedir a entrada do patógeno na área, uso de água e solo livre de inóculo para impedir a disseminação da bactéria na área de produção (ALFENAS et al., 2004).

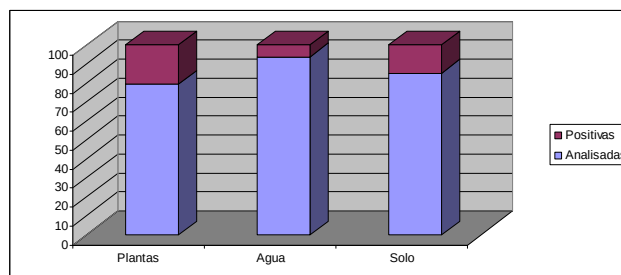


Figura 3. Porcentagem de amostras infectadas com *Ralstonia*.

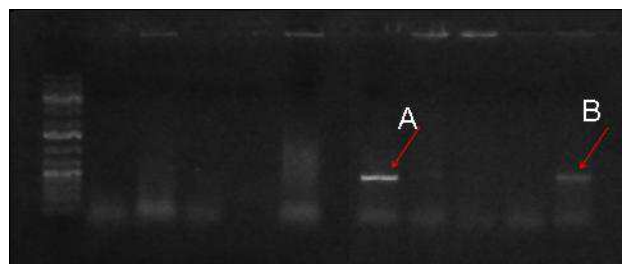


Figura 4: Gel de Agarose contendo resultados das amostras analisadas. A: Amostra positiva.; B: Controle positivo da reação de PCR.

Conclusões

Das 2714 amostras de plantas, 16 de água e 27 de solo analisadas 560, 1 e 7, respectivamente, foram detectadas a presença de *R. solanacearum*.



8º Congresso de extensão universitária da UNESP

"Diálogos da Extensão:
do saber acadêmico à prática social"

Realização:

unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"



ABRAF (Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas). Anuário Estatístico da ABRAF 2009. Disponível em : <
<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF09-BR.asp>>. Acesso em 08 de fev. de 2011.

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

ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa, MG. Editora UFV. 2004. 442p.

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. (Eds.) *Bacterial Wilt Proceedings of an International Conference*, Kaohsiung, Taiwan. 1992. pp. 206-210. 1993.

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

Marques, E. (2012) Murcha bacteriana do eucalipto causada por *Ralstonia solanacearum* Raça 3 biovar 2T: etiologia, influência do solo e controle. Tese de Doutorado. Brasília-DF. Universidade de Brasília.

MORA, A.; GARCIA, C. H. A cultura do eucalipto no Brasil. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000. 111p.

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

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, nº 3. 4p. 1988.

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

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