

REGINALDO GONÇALVES MAFIA

**SINTOMATOLOGIA, ETIOLOGIA E CONTROLE DA MURCHA
BACTERIANA DO EUCALIPTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

REGINALDO GONÇALVES MAFIA

**SINTOMATOLOGIA, ETIOLOGIA E CONTROLE DA MURCHA
BACTERIANA DO EUCALIPTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de maio de 2006

Prof. Luiz Antônio Maffia
(Co-Orientador)

Dr. Carlos Alberto Lopes

Prof. Francisco Alves Ferreira
(Co-Orientador)

Prof. Luiz Antônio dos Santos Dias

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Orientador)

*“Sou grato ao destino por me apresentar pessoas que fizeram diferença
em minha vida”*

Mafia, 2006

O tempo passou rápido. No entanto, ainda me lembro de nove anos atrás, quando entrei, pela primeira vez, na sala do professor que se tornaria o meu orientador. A aceitação como estudante de iniciação científica foi motivo para minha comemoração e início de um trabalho que iniciou no dia seguinte e rendeu muitos frutos, felizmente. Com o passar do tempo e com o aumento da confiança, o meu orientador foi me ensinando a vida profissional. Foi ele que me ensinou a fotografar e diagnosticar as doenças em viveiro e no campo. Além de ensinar Patologia Florestal, tive a oportunidade de aprender outras lições, entre elas a difícil tarefa de orientar. Me lembro de todas as viagens para realizar diagnose. Nessas viagens, além de aprender muito, divertimos com o sucesso e, as vezes, com os nossos próprios fracassos, o que também faz parte do aprendizado. Neste tempo todo, entre orientador e orientado, nem sempre as coisas aconteceram de forma harmoniosa. Perdi a conta de quantas vezes entramos em atrito. No fundo, isso foi bom, pois a cada momento difícil, aprendi um pouco de como lidar com as situações difíceis da vida e como respeitar as outras pessoas e opiniões. Entre as oportunidades que recebi do meu orientador, acho que o convite para participação como co-autor de seu livro "Clonagem e Doenças do Eucalipto", sem dúvida, foi a mais importante. Sempre tive dificuldade de expressar a minha amizade para o meu orientador, mas com o passar do tempo, ele entendeu que além da amizade sincera, sempre tive por ele, muito respeito, gratidão e admiração. Por este motivo, tenho a enorme satisfação de dedicar ao meu orientador, Prof. Acelino C. Alfenas, um dos frutos mais importantes de nossa amizade.

Ao Prof. Acelino Couto Alfenas, Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pai de todos.

Aos meus familiares e a minha esposa Gizella M. Ventura Mafía, por tudo que sou e serei.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização dos cursos de graduação em Engenharia Florestal e de pós-graduação em Fitopatologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de pesquisa concedidas durante a Iniciação Científica e pós-graduação.

Às empresas Aracruz Celulose, Cia. Suzano Bahia Sul de Papel e Celulose, CAF Santa Bárbara e Plantar, pelo suporte logístico e apoio ao desenvolvimento das pesquisas.

Ao professor Acelino Couto Alfenas, para o qual tenho dificuldades em expressar os meus agradecimentos, diante da amizade, confiança, ensinamentos e inúmeras oportunidades que me permitiram o desenvolvimento profissional.

Ao professor Luiz Antônio Maffia e ao pesquisador Carlos Antônio Lopes, pelas sugestões e pelos ensinamentos.

Ao professor Francisco Alves Ferreira, pela constante disposição em ensinar e pela amizade que, para mim, sempre foi motivo de orgulho.

Aos pesquisadores Robert Cardoso Sartório (Aracruz Celulose) e João Flávio da Silva (Cia. Suzano Bahia Sul de Papel e Celulose), pelos constantes auxílios no desenvolvimento dos trabalhos.

À Márcia Maria Brandão, pela dedicação e amizade, que sempre me propiciou momentos de alegria no trabalho.

À Eraclides Maria Ferreira, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos estudantes e profissionais com os quais sempre tive orgulho de trabalhar.

A todos os colegas do Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno, que fizeram diferença em meus dias de pesquisa.

BIOGRAFIA

Reginaldo Gonçalves Mafia, filho de Rubens Mafia e Maria Nira Gonçalves Mafia, nasceu a 11 de fevereiro de 1978, em Viçosa, Estado de Minas Gerais.

Ingressou em 1997, no curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no qual foi bolsista de Iniciação Científica no Departamento de Fitopatologia, sob a orientação do professor Acelino Couto Alfenas. Ao final do curso, em 2002, foi premiado por distinção entre todos os seus pares na área de Ciências Agrárias pelo desempenho curricular.

Em março de 2002, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na mesma Instituição, sob a orientação do professor Acelino Couto Alfenas, defendendo tese em fevereiro de 2004. No mês seguinte, ingressou-se no curso de Doutorado em Fitopatologia da UFV, concluindo-o em maio de 2006. Dentre seus trabalhos científicos mais relevantes, pode-se citar a co-autoria do livro “Clonagem e Doenças do Eucalipto”. Atualmente, é pesquisador na empresa Aracruz Celulose S.A., atuando na área de Proteção Florestal.

CONTEÚDO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. Introdução.....	01
2. Revisão bibliográfica.....	03
2.1. Murcha bacteriana do eucalipto.....	03
2.2. Características de <i>Ralstonia solanacearum</i>	04
2.3. Importância do patógeno para culturas agronômicas e florestais.....	05
2.4. Colonização de <i>Ralstonia solanacearum</i>	06
2.5. Interação de <i>Ralstonia solanacearum</i> com plantas daninhas.....	10
2.6. Sintomatologia da murcha bacteriana em eucalipto.....	11
2.7. Detecção de <i>Ralstonia solanacearum</i>	11
2.8. Controle da murcha bacteriana.....	13
3. Referências bibliográficas.....	15
Artigo 1 - <i>Ralstonia solanacearum</i> em viveiros clonais de eucalipto no Brasil...	24
Artigo 2 - Mudanças clonais como fonte de inóculo e efeito da murcha bacteriana sobre a produtividade de minijardins clonais de <i>Eucalyptus</i> spp.....	47
Artigo 3 - Desenvolvimento de protocolo e avaliação da resistência de <i>Eucalyptus</i> spp. à murcha bacteriana, causada por <i>Ralstonia solanacearum</i>	70
Conclusões gerais.....	88

RESUMO

MAFIA, Reginaldo Gonçalves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2006.
Sintomatologia, etiologia e controle da murcha bacteriana do eucalipto.
Orientador: Acelino Couto Alfenas. Co-Orientadores: Luiz Antônio Maffia e Francisco Alves Ferreira.

A murcha bacteriana do eucalipto, causada por *Ralstonia solanacearum* é uma importante doença, em virtude da natureza sistêmica das infecções, dos danos causados e das várias características do patossistema que dificultam o controle. Objetivou-se neste trabalho estudar o patossistema *R. solanacearum*-eucalipto: i) descrever a sintomatologia da doença em viveiro e quantificar as perdas causadas em minijardim clonal; ii) comprovar a transmissão do patógeno por mudas clonais e avaliar o efeito da doença sobre a produtividade de minijardins clonais; e iii) desenvolver um protocolo e avaliar a resistência interespecífica do eucalipto à murcha bacteriana. Os sintomas da doença em minijardim clonal caracterizaram-se por necrose foliar, escurecimento anelar ou completo do lenho, pela murcha e morte de minicepas, bem como arroxamento das nervuras do limbo foliar e podridão de miniestacas. A etiologia da murcha bacteriana do eucalipto em minijardim clonal foi confirmada por meio de testes de exsudação, microscopia de varredura, isolamento da bactéria, análises de PCR/RFLP, reação de hipersensibilidade (HR) em mudas de tabaco, testes de patogenicidade em plântulas de eucalipto e tomate e re-isolamento da bactéria inoculada. A incidência da doença em viveiros clonais, no período de abril a setembro de 2005, resultou em um prejuízo estimado de seis milhões de reais. Considerando brotações ou substrato contaminados como fonte de inóculo, o patógeno se dissemina por mudas clonais de eucalipto, sendo que a doença causa perdas de até quatro vezes no índice de produtividade de minijardim. Desenvolveu-se um método de avaliação da resistência empregando-se um infectário que simula as condições de minijardim clonal. Entre as espécies avaliadas, *E.*

tereticornis e *E. grandis* apresentaram, respectivamente, o menor (33,3%) e o maior (91,7%) percentual de genótipos suscetíveis.

ABSTRACT

MAFIA, Reginaldo Gonçalves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May of 2006.
Symptomatology, etiology, and control of eucalypt bacterial wilt. Adviser:
Acelino Couto Alfenas. Co-Advisers: Luiz Antônio Maffia and Francisco Alves
Ferreira.

The eucalypt bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is important disease, because of systemic infection, of the loss caused, and of the pathosystem characteristics with difficult control. The aims of the work for the pathosystem *R. solanacearum*-eucalypt were: i) symptomatology descriptions, and loss quantification caused by disease; ii) transmission proof of pathogen for the clonal cuttings, and determinate the effect of the disease for the mini-garden production; and iii) protocols development and evaluated interspecific resistance of the eucalypti bacterial wilt. In clonal mini-hedges, the disease is characterized by foliar necrosis, annular or complete wood darkening, wilt and death of rooted-cuttings, was as was rending of leaf blade veins and cuttings rot of mini-cuttings. The disease etiology was confirmed through exudates tests, scanning electron microscopy, bacterial isolation, PCR/RFLP analyses, hypersensitive reactions (HR) in tobacco seedlings, pathogenicity tests in eucalypt and tomato plantlets and re-isolation of inoculated bacteria. The incidence of disease in eucalypt nursery, from April to September 2005 resulted in total loss estimated at six million *reais*. The inoculum font was contaminated shoots and substrate, and the pathogen was transmitted for eucalypt clonal mini-cuttings, causing loss four times in production index. Development method for evaluated of the resistance, with conditions for the plant infect similar to clonal mini-hedge. For the species evaluated, *E. tereticornis* and *E. grandis* were, respectively, the species with minor (33.3%) and higher (91.7%) susceptibility genotypes.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, os plantios florestais de rápido crescimento ocupam cerca de 4,8 milhões de hectares, dos quais 3,0 milhões são de espécies de eucalipto. Enquanto as florestas tropicais nativas produzem de 20 a 30 m³/ha/ano, em ciclos de corte de 30 anos, as plantações de eucalipto têm incremento médio de 35-45 m³/ha/ano (Alfenas *et al.*, 2004; Mora & Garcia, 2000), em ciclos de corte que variam de 6 a 12 anos, dependendo da finalidade da madeira.

Nos últimos anos, a expansão dos plantios de eucalipto tem suprido a crescente demanda de matéria-prima para a produção de celulose, carvão vegetal, óleos essenciais, madeira para serraria, postes de eletricidade e mourões de cerca, dentre outras finalidades (Alfenas *et al.*, 2004). O eucalipto, após sua introdução para fins comerciais, originalmente no Estado de São Paulo, manteve-se praticamente livre de doenças até o início de 1970 (Alfenas & Mafia, 2006). No entanto, a expansão das áreas plantadas para regiões mais quentes e úmidas, o plantio de espécies, procedências, famílias ou clones suscetíveis, os ciclos sucessivos da cultura e o estreitamento da base genética têm favorecido a incidência de várias doenças em viveiro e campo (Alfenas & Mafia, 2003).

A murcha bacteriana do eucalipto, causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) (Yabuuchi *et al.*, 1995) constitui, potencialmente, uma das principais doenças da cultura (Alfenas *et al.*, 2004). Esta doença é de grande importância, em virtude da natureza sistêmica das infecções, dos danos causados e das várias características do patossistema que dificultam o controle.

O patógeno é capaz de sobreviver no solo e pode ser disseminado pelos tratamentos culturais, por água superficial de irrigação e, ou, de chuvas. *Ralstonia solanacearum*, potencialmente, pode sobreviver em restos da cultura do eucalipto, como serragem,

ramos, raízes, tocos e cascas. A movimentação desse tipo de material durante o preparo do solo, para realização de novos plantios, pode proporcionar a disseminação do patógeno no campo. Além disso, a bactéria pode ser disseminada por mudas infectadas.

O patógeno causa infecções sistêmicas, o que dificulta o controle da doença. A bactéria pode ser transmitida por ferramentas de corte e implementos florestais, o que pode aumentar a disseminação da doença e até mesmo inviabilizar a condução da rebrota. Em viveiro, a transmissão da bactéria durante o preparo de miniestacas pode resultar em eficiente disseminação por mudas contaminadas. Além disso, a bactéria encontra condições ideais para sobrevivência e multiplicação em minijardim clonal, em virtude da abundância de umidade, temperaturas elevadas e da grande disponibilidade de tecido vegetal, muitas vezes sob estresse, como ocorre para minicepas submetidas a podas freqüentes.

A murcha bacteriana pode reduzir o índice de sobrevivência das plantas e contribuir para aumentar a mato-competição, em virtude de maior número de falhas no plantio. Adicionalmente, as árvores infectadas apresentam redução acentuada no desenvolvimento, bem como alterações indesejáveis na qualidade da madeira, o que pode interferir na produção de celulose e serraria.

Esta Tese foi dividida em três artigos. No primeiro, objetivou-se descrever a sintomatologia da doença em viveiro, comprovar a etiologia e quantificar as perdas causadas pela doença. No segundo, procurou-se comprovar a transmissão do patógeno por mudas clonais e determinar o efeito da doença sobre a produtividade de minijardins clonais. Finalmente, no terceiro artigo, objetivou-se desenvolver um protocolo e avaliar a resistência interespecífica do eucalipto à murcha bacteriana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Murcha bacteriana do eucalipto

Recentemente, a incidência da murcha bacteriana resultou em sérios prejuízos em viveiros clonais nos Estados da Bahia, do Espírito Santo, Maranhão e de Minas Gerais. Além das perdas advindas do descarte de mudas, de minicepas e de propágulos vegetativos contaminados, a incidência da doença resultou em custos para erradicação do patógeno e realização de adaptações das estruturas de viveiro visando minimizar os riscos de novas contaminações. Somam-se a isso os prejuízos referentes às alterações dos cronogramas de plantio e à eliminação de determinados clones-elite de eucalipto dos cronogramas de plantio (Alfenas *et al.*, 2006).

A murcha bacteriana em minijardim clonal foi primeiramente diagnosticada pela equipe do Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta Patógeno da UFV, em abril de 2006. Todavia, por algum tempo, a doença permaneceu com sua etiologia desconhecida, em virtude do ineditismo e da manifestação de sintomas que, à primeira vista, confundem-se com estresses abióticos (falta d'água), principalmente em razão do plantio de mudas passadas e com malformação radicular. Nesse último caso, as minicepas expressavam mais intensamente os sintomas.

No Brasil, apesar de seu grande impacto em culturas agrônômicas, especialmente em tomate e batata, a murcha bacteriana é uma enfermidade relativamente recente para a eucaliptocultura. Sua primeira ocorrência data do início da década de 1980, quando Sudo *et al.* (1983) relataram a enfermidade em plantios de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) e bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) no município de Prata (Triângulo Mineiro, Minas Gerais). Subseqüentemente, a enfermidade foi observada em eucalipto na então Companhia Monte Dourado, no Pará

(atual Jari Celulose), em 1984 e, posteriormente, na Camargo Corrêa (Tucuruí, Pará) e na Copener (Bahia) (Robbs *et al.*, 1988). Em 1985, Dianese & Takatsu (1985) identificaram a biovar 1 de *R. solanacearum* a partir de culturas da bactéria originárias de plantas de eucalipto cultivadas em Monte Dourado, Pará. Outros três isolados do patógeno, originários do Pará e da Bahia, foram também identificados como biovar 1 (Robbs *et al.*, 1988). Todas essas constatações ocorreram em plantios realizados em áreas recém-desmatadas e resultaram em até 25% de mortalidade. Em 1987, cerca de um milhão de mudas de eucalipto foram dizimadas pela doença em Monte Dourado (Robbs *et al.*, 1988). Além do Brasil, a doença foi registrada nas principais regiões eucaliptocultoras do mundo, como China (Wu & Liang, 1988a), Taiwan (Wang, 1992), Indonésia (Alfenas, 1993), Austrália (Askiew *et al.*, 1994), Venezuela (Ciesla *et al.*, 1996) e África do Sul (Coutinho *et al.*, 2000).

2.2. Características de *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum (Smith, 1896) Yabuuchi *et al.* (1995), descrita anteriormente como *Bacillus solanacearum*, *Pseudomonas solanacearum*, *Burkholderia solanacearum*, dentre outras muitas sinonímias, apresenta-se como uma bactéria gram-negativa, aeróbica, móvel por um a quatro flagelos polares, em forma de bastonete com 0,5 – 0,7 x 1,5 – 2,5 µm e não fluorescente (OEPP/EPPO, 2004). As colônias normais são lisas, fluidas, irregularmente arredondadas e opacas. No meio de Kelman, contendo tetrazólio, as colônias virulentas são de centro avermelhado e bordas brancas, enquanto as avirulentas são totalmente vermelhas (Kelman, 1954).

O patógeno realiza a penetração nos hospedeiros por meio de ferimentos no sistema radicular e nos locais de emergência de raízes secundárias. A disseminação da bactéria em grandes distâncias ocorre por intermédio de infecções latentes em material vegetal para plantio (Gutarra *et al.*, 1995), assim como por produtos e sub-produtos para consumo e, ou, para indústria. Em pequenas distâncias, a bactéria pode ser disseminada por ferramentas e equipamentos utilizados durante as práticas agrícolas, por insetos e pelo próprio homem, potencialmente (Supriadi *et al.*, 2001). A sobrevivência no solo ocorre por longos períodos (células viáveis mas não cultiváveis), em associação com a matéria orgânica e plantas daninhas.

Tradicionalmente, *R. solanacearum* tem sido dividida em cinco biovares e em cinco raças, com base em propriedades bioquímicas e na reação sobre uma gama de hospedeiros, respectivamente. Não há, entretanto, uma relação perfeita entre a diferenciação de raças e a classificação em biovares (Buddenhagen & Kelman, 1964). As biovares podem ser distintas conforme a oxidação de açúcares (lactose, maltose e celobiose) e álcoois (manitol, sorbitol e dulcitol). Todavia, as biovares podem, também, ser identificadas por PCR (OEPP/EPPO, 2004).

2.3. Importância do patógeno para culturas agronômicas e florestais

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* foi relatada pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1896, por Erwin F. Smith, em batata, tomate e berinjela (Hayward, 1994). No Brasil, a doença foi descrita por Von Parseval, em 1922, em fumo e batata, no Estado do Rio Grande do Sul (Takatsu & Lopes, 1997). Atualmente, *R. solanacearum* é considerada uma das bactérias fitopatogênicas mais importantes do mundo, em virtude dos grandes prejuízos causados, de sua ampla distribuição geográfica, da extensa gama de hospedeiros e das dificuldades de controle. A bactéria causa doença em mais de 200 espécies de plantas, englobando aproximadamente 50 famílias botânicas (Hayward, 1991; Hayward, 2000). A gama de hospedeiros inclui não somente solanáceas, mas também leguminosas, algumas monocotiledôneas e várias espécies arbóreas (Genin & Boucher, 2002). Dentre as culturas de maior importância econômica e com maior número de estudos, podem-se citar: batata (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), berinjela (*Solanum melongena* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), pimenta (*Capsicum frutescens* L.), banana (*Musa* spp.) gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) e amendoim (*Arachis hipogaea* L.) (Kelman, 1953; Pereira, 1990; Hayward, 1991; Hayward, 1994; Lopes, 1994; Lopes & Takatsu, 1997). Em virtude, principalmente, de sua grande importância, *R. solanacearum* foi um dos primeiros patógenos de plantas com o genoma totalmente seqüenciado (Denny, 2000).

Sabe-se que o patógeno é endêmico em diferentes regiões tropicais e subtropicais do mundo (Genin & Boucher, 2002). Na ausência do hospedeiro, a bactéria é capaz de sobreviver no solo por períodos prolongados, em associação com a matéria

orgânica ou com plantas daninhas, sem evidenciar sintomas (Hayward, 1991), bem como pode entrar em estado de dormência, permanecendo como células viáveis, mas não cultiváveis, conforme constatado para vários microrganismos de solo (Grey & Steck, 2001).

Existem fortes evidências de que várias espécies florestais são hospedeiras de *R. solanacearum*. Contudo, relatos sobre o declínio de árvores são limitados (Supriadi *et al.*, 2001). Para eucalipto, Liang *et al.* (1992) reportou uma incidência de 2–10%, sendo que a disseminação da doença constitui uma ameaça ao desenvolvimento das plantas, no sul da China. Uma situação similar é encontrada para casuarina, nessa mesma região, onde a doença está presente por 30 anos (Liang & Guo, 1992). A murcha bacteriana em eucalipto no sul da China foi primeiramente relatada em 1982 (Cao, 1982). Desde o seu primeiro relato, o patógeno tem causado grandes perdas, que podem atingir em média 30 – 40% (Li & Wu, 1996; Lin *et al.*, 1996).

Em geral, os sintomas em plantas arbóreas infectadas por *R. solanacearum* são murcha permanente, descoloração dos tecidos vasculares e bloqueio dos tecidos vasculares com massas de células. Todavia, os sintomas típicos podem variar de acordo com a espécie hospedeira (Tabela 1). Isolados do patógeno obtidos de um determinado hospedeiro podem infectar outras espécies (Tabela 2), dificultando o controle (Supriadi *et al.*, 2001).

2.4. Colonização de *Ralstonia solanacearum*

A penetração de *R. solanacearum* ocorre por meio de ferimentos no sistema radicular e nos locais de emergência de raízes secundárias. Após a penetração, a bactéria coloniza os espaços intercelulares do córtex da raiz e do parênquima vascular, culminando com a desestruturação das paredes celulares, o que facilita, em uma segunda etapa, a disseminação pelo sistema radicular (Vasse *et al.*, 1995). Nos vasos do xilema, a população bacteriana rapidamente atinge altos níveis populacionais ($> 1 \times 10^{10}$ ufc/ g de tecido fresco, exemplo em tomate), concomitantemente com o aparecimento do sintoma de murcha, seguido da morte da planta (Denny, 2000; Genin & Boucher, 2002).

Tabela 1 - Espécies arbóreas hospedeiras de *Ralstonia solanacearum* com variações nos sintomas e biovars do patógeno

Hospedeiro	Família botânica	Nome comum	Sintomas	Biovar	País	Referência
<i>Archontophoenix alexandrae</i> H. Wendl. & Drude	Arecaceae	Palmeira-real-da-austrália	Seca das folhas, descoloração dos tecidos vasculares, murcha	3	Queensland (Austrália)	Akiew (1990)
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Anacardiaceae	Cajueiro	Podridão radicular e queda de folhas	3	Indonésia	Shiomi <i>et al.</i> , 1989
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & Perry	Myrtaceae	Craveiro-da-índia	Podridão de raízes e infecção limitadas na base da haste; patógenos secundários	-	Indonésia	Eden-Green & Adhi, 1986
<i>Annona squamosa</i> L. e <i>A. cherimola</i> Mill.	Annonaceae	Pinha	Morte súbita de árvores jovens e declínio de árvores adultas	3	Queensland (Austrália), Taiwan	Mayers & Hutton (1987); Hsu (1991)
<i>Eucalyptus</i> spp.	Myrtaceae	Eucalipto	Murcha	1, 3, 3, 3	Brasil, China, África do Sul, Austrália	Dianese & Dristig (1993); Wu & Liang (1988a); Coutinho <i>et al.</i> (2000); Askiew & Tevorrow, 1994
<i>Cassuarina equisetifolia</i> L.	Casuarinaceae	Casuarina	Murcha	3, 4	China	He (1986); Liang & Guo (1992)
<i>Moringa oleifera</i> Lam.	Moringaceae	Moringa	Perda de turgescência e desfolha	-	Índia	Estelitta <i>et al.</i> (1997)
<i>Leucaena glauca</i> Benth.	Mimosaceae	Leucena	-	-	-	Bradbury (1987)
<i>Pongamia pinnata</i> (L.) Pierre	Leguminosae	Pongamia	-	-	-	Bradbury (1987)
<i>Morus alba</i> L.	Moraceae	Amoreira	Murcha, amarelecimento e necrose de folhas, desfolha e danos nas raízes	3, 5	China, Índia	He (1986); Mathews <i>et al.</i> (1993b)
<i>Azadirachta indica</i> Juss.	Meliaceae	Neem	Murcha e podridão anelar de raízes	3	Queensland (Austrália)	Diatloff <i>et al.</i> (1993)
<i>Myristica fragrans</i> L.	Myristicaceae	Noz-moscada	Escurecimento de folhas, seca de folhas, danos ao sistema radicular	-	Kerala (Índia)	Mathews <i>et al.</i> (1993a)
<i>Olea europaea</i> L.	Oleaceae	Oliveira	-	3, 4	China	He (1986)
<i>Tectona grandis</i> L.	Verbenaceae	Teca	-	3	Malásia, Indonésia, Filipinas	Hayward (1964); Mitchell (1962)
<i>Eugenia javanica</i> Lam.	Myrtaceae	Jambo rosa	-	-	Taiwan	Hayward (1994a)

Fonte: Adaptado de Supriadi *et al.* (2001).

Tabela 2 - Inoculações cruzadas considerando diferentes espécies arbóreas hospedeiras de *Ralstonia solanacearum*

Origem do isolado	Gama de hospedeiros	Referência
Oliveira	Oliveira, berinjela, batata, tomate, pimentão e amendoim	He (1986)
Casuarina	Casuarina, berinjela, batata, tomate e amendoim	He (1986)
Amora	Amora, berinjela, batata	He (1986)
Pinha	Pinha (<i>A. squamosa</i> x <i>A. cherimola</i>), tomate, batata e pimentão	Mayers & Hutton (1987)
Eucalipto	Eucalipto, casuarina, tomate, amendoim, tabaco e batata	Liang <i>et al.</i> (1992)
Caju	Caju, tomate, pimentão e berinjela	Shiomi <i>et al.</i> (1989)

Fonte: Supriadi *et al.* (2001).

2.5. Interação de *Ralstonia solanacearum* com plantas daninhas

Embora saiba que *R. solanacearum* pode-se associar ao sistema radicular de plantas daninhas, há pouca informação acerca das espécies botânicas hospedeiras (Quezado-Soares & Lopes, 1994). Quanto aos níveis de suscetibilidade ao patógeno, as plantas daninhas podem ser altamente suscetíveis e evidenciar sintomas típicos de murcha bacteriana, como no caso de *Crassocephalum crepidioides* (Benth) S. Moore (Asteraceae); ser tolerantes e evidenciar poucos sintomas de murchamento, como *Portulaca oleracea* L. (Portulacaceae) e existe crescente evidência de hospedeiras, que, sob determinadas condições, permanecem assintomáticas ou com leves sintomas de infecção, por exemplo, *Solanum carolinense* L. (Hayward, 1994; Tussime, 1997). Além disso, para certas hospedeiras, observam-se variações quanto ao aparecimento de sintomas (Miranda *et al.*, 2004).

2.6. Sintomatologia da murcha bacteriana em eucalipto

Os sintomas da doença no campo, inicialmente, caracterizam-se por murcha e desfolha basal da planta. Quando a fonte de inóculo são as mudas contaminadas, cortes perpendiculares do caule evidenciam escurecimento do lenho a partir da região central. Em contrapartida, para infecções que ocorrem após o plantio, o escurecimento pode ser notado no sentido da casca para o interior do lenho. Nesse último caso, trincas na casca, causadas por temperatura excessiva do solo, déficit hídrico e, ou, por afogamento de coleto, constituem portas de entrada para a bactéria. Geralmente, as árvores mais afetadas apresentam problemas de malformação radicular e, ou, afogamento de coleto, o que, dependendo da intensidade, causa subdesenvolvimento ou morte das plantas. A diagnose da doença é facilmente realizada pelo teste de exsudação de pus bacteriano (Alfenas *et al.*, 2004; Ferreira & Milani, 2002). Porções do lenho infectado, quando mantidas mergulhadas com suas bases em água e no interior de uma câmara úmida, evidenciam após alguns minutos, exsudação de pus bacteriano, na forma de gotículas sobre a superfície. Na parte do lenho mergulhada na água, observa-se também a exsudação de pus bacteriano, na forma de uma névoa clara. O teste de exsudação também pode ser realizado em gota d'água, com o auxílio de um microscópio de luz (Alfenas *et al.*, 2006).

2.7. Detecção de *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum pode ser disseminada dentro e entre países por solo, água e materiais para plantio com infecção latente (Ciampi *et al.*, 1980; Hayward, 1991). Assim, para fins quarentenários, é necessário dispor de procedimentos rápidos e sensíveis. Tradicionalmente, a detecção desse patógeno depende de uma série de testes bioquímicos realizados para colônias puras, o que demanda grande consumo de tempo e inviabiliza esses procedimentos para quarentena e outros objetivos.

A técnica de detecção mais comum, porém menos sensível, consiste no cultivo do patógeno em meio de cultura diferencial (Kelman, 1954; Granada & Sequeira, 1981; Engelbrecht, 1994). Outras técnicas ainda incluem o uso de métodos sorológicos (ELISA ou imunofluorescência) (Janse, 1988; Robinson, 1993) ou testes de

patogenicidade em plantas hospedeiras (Graham & Lloyd, 1978). Geralmente, estas técnicas são inadequadas, em termos de especificidade, sensibilidade de detecção (Tabela 3) e do tempo necessário, especialmente para detecção da bactéria a partir do solo. Entretanto, a amplificação de DNA oferece várias vantagens em relação às técnicas clássicas (Poussier *et al.*, 2002). Vários protocolos de PCR (Polymerase Chain Reaction) e diferentes oligonucleotídeos a partir da região 16S e 23S rRNA têm sido descritos para diagnose e, ou, identificação de *R. solanacearum* (Seal *et al.*, 1993; Elphinstone *et al.*, 1996; Opina *et al.*, 1997; Boudazin *et al.*, 1999; Pastrok & Maiss, 2000; Poussier & Luisetti, 2000; Weller *et al.*, 2000; OEPP/EPPO, 2004), os quais podem ser utilizados para detecção do patógeno a partir de diferentes substratos naturais (água, solo, semente e plantas) (Poussier *et al.*, 2002; Caruso *et al.*, 2003).

Tabela 3 - Métodos com respectivos limites de detecção de *Ralstonia solanacearum*

Método de detecção	Concentração mínima detectável (ufc/ml)	Referência
Diluição em meio de cultura	10^3 - 10^4	Janse, 1988
Meio seletivo	10^3 - 10^4	Granada & Sequeira (1981)
Plantas indicadoras (mudas de tomate)	10^2 - 10^4	Janse, 1988
ELISA indireta	10^4	Robinson, 1993
Sorologia (ELISA) usando antissoro policlonal	10^4 células/ml de extrato vegetal	Robinson (1993)
IFAS (Immunofluorescent antibody stain)	10^4	Janse, 1988
DNA-DNA hibridização (sonda PS2096)	10^5 - 10^6	Seal & Elphinstone (1994)
PCR (primers PS96-H e PS96-I)	5-116	Seal <i>et al.</i> (1992)
PCR (primers BP4-R e BP4-L)	20	Lee & Wang (2000)
PCR (primers OLI 1 e Y2)	1	Seal <i>et al.</i> (1993)

Fonte: Adaptado de Gutarra *et al.* (1995) e Supriadi *et al.* (2001).

2.8. Controle da murcha bacteriana

Ralstonia solanacearum é uma bactéria cosmopolita, variável do ponto de vista fisiológico e molecular, vascular e que se associa ao sistema radicular de várias plantas cultivadas e daninhas, em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Lopes & Takatsu, 1997). Somado a essas características, a falta de conhecimentos básicos sobre ecologia e evolução do patógeno dificulta o seu controle (Kelman, 1953; Lopes, 1994).

O uso da resistência de plantas para o controle da murcha bacteriana, tanto para espécies agrícolas quanto florestais, é difícil, em virtude da alta variabilidade na população do patógeno e de interações com fatores do ambiente. A expressão da resistência está fortemente correlacionada com condições ambientais como temperaturas elevadas e altos níveis de umidade do solo (Mew & Ho, 1977). Infestação por nematóides (Napiere, 1980; Cadet *et al.*, 1989) e a variabilidade da agressividade de isolados locais de *R. solanacearum* são também fatores relacionados com o aumento da severidade da doença ou com a quebra da resistência (Prior & Steva, 1990; Darasse *et al.*, 1998; Coelho Neto *et al.*, 2003).

Recentemente, encontrou-se um gene recessivo (RRS1-R), que confere resistência a *R. solanacearum* em *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) (Deslandes *et al.*, 2002). Para eucalipto, Wu & Liang (1988b) observaram variações no nível de resistência para certas procedências, sendo o *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. saligna*, *C. citriodora* e *E. exserta* F. Muell. mais resistentes à murcha bacteriana.

O controle da murcha bacteriana, para vários hospedeiros, não tem sido efetivo. Programas de melhoramento visando ao controle por resistência de plantas não têm alcançado sucesso em razão, dentre outros fatores, da grande variabilidade de isolados do patógeno e da interação com diversos fatores bióticos e abióticos (Javier, 1994). A rotação de culturas também apresenta limitação, considerando a grande gama de hospedeiros do patógeno (Lopes & Takatsu, 1997).

Dianese & Dristig (1993) concluíram, por meio de inoculações artificiais, que isolados de eucalipto foram virulentos a *E. deglupta* Blume, *E. microcorys* F. Muell., *E. pilularis* Smith, *E. punctata* D.C., *E. pyrocarpa* L. Johnson & D. Blaxell, *E. robusta* Sm., *E. saligna*, *E. urophylla*. As espécies *E. camaldulensis*, *C. citriodora*, *E. cloeziana* F. Muell, *E. deanei* Maiden, *E. pellita*, *E. grandis*, *E. resinifera* Sm., *E. tereticornis* e *E. torelliana* F. Muell foram consideradas, pelos autores, como tolerantes. Na China, Li &

Wu (1996) observaram que espécies de crescimento rápido como *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. saligna* e os híbridos *E. grandis* x *E. urophylla* ou *E. urophylla* x *E. grandis*, com menos de dois anos, são mais suscetíveis. A partir de observações de campo, ficou comprovado que o híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) mais utilizado nos plantio é também altamente suscetível (Lin *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 2000).

O controle biológico, embora ainda necessite de maiores estudos, tem despontado como alternativa promissora. O uso de *Streptomyces* sp. foi efetivo no controle da murcha em batata-doce, em banana e em tomate (Moura & Romeiro, 1999). Há evidências experimentais de que o tratamento de mudas de eucalipto com isolados específicos de *Pseudomonas fluorescens*, do tipo PGPR (rizobactérias) constitui uma das alternativas de controle (Ran *et al.*, 2005; Mafia, 2004; Teixeira *et al.*, 2001). Experimentos com fungos ectomicorrízicos também apontam para outra forma de controle biológico da doença (Gong *et al.*, 1999).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIEW, E. *Archontophoenix alexandrae*, a new host of *Pseudomonas solanacearum* in Australia. *Plant Disease* 74:615. 1990.
- ALFENAS, A.C. & MAFIA, R.G. Controle integrado de doenças em viveiros clonais e aspectos relativos à ferrugem (*Puccinia psidii*) do eucalipto. *Fitopatologia Brasileira* 28:156-163. 2003.
- ALFENAS, A.C. & MAFIA, R.G. Manejo integrado de doenças do eucalipto em viveiro. In: *Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças*. Venzon, M., Júnior, T.J.P., Pallini, A. (Eds). Viçosa UFV ; EPAMIG. p.81-101. 2006. 378p.
- ALFENAS, A.C. Potential and present status of *Eucalyptus* and *Acacia mangium* diseases in Northern Sumatra. Consultancy Report to P.T. Inti Indorayon Utama Company, Indonesia. Relatório Técnico-Científico. 53p. 1993.
- ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G., SARTÓRIO, R.C., BINOTI, D.H.B., SILVA, R.R., LAU, D. & VANETTI, C.A. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. 2006 (no prelo).
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.Â.V., MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. *Imprensa Universitária*. 442p. 2004.
- ASKIEW, E. & TEVORROW, P.R. Management of bacterial wilt of tobacco. In: *Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Hayward, A.C.; Hartman, G.L. (Eds.). Wallingford, UK: CABI, 179-198. 1994.
- BOUDAZIN, G., LE ROUX, A.C., JOSI, K., LABARRE, P. & JOUAN, B. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and amplification to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* 105:373-380. 1999.
- BRADBURY, J.F. *Guide to plant pathogenic bacteria*. CAB International. The Cambrian News, Aberystwyth. U.K 332. 1987.
- BRINGEL, J.M.M. Colonização de raízes de plantas cultivadas por *Pseudomonas solanacearum* biovars I, II e III em condições de casa de vegetação e “in vitro”. Brasília. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília 119. 1997.
- BUDDENHAGEN, I.W. & KELMAN, A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 2:203-203. 1964.

- CADET, P., PRIOR, P. & STEVA, H. Influence de *Meloidogyne arenaria* sur la sensibilité de deux cultivars de tomate à *Pseudomonas solanacearum* (E.F. Smith), dans les Antilles françaises. *Agronomia Tropical* 44:263-268. 1989.
- CAO, J.D. Investigation of bacterial wilt in *Eucalyptus saligna* and *E. grandis* introduced from Brazil. *Gruangxi Forestry Science Technology* 4:30-31. 1982.
- CARUSO, P., BERTOLINI, E., MARIANO, C. & LÓPEZ, M.M. A new sensitive co-operational polymerase chain reaction for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. *Journal of Microbiological Methods* 55:257-272. 2003.
- CHEN, E.Y. & WU, X.Y. Occurrence and control of eucalypt bacterial wilt in Haiman Province. *Tropical Forestry* 23:4-6. 1995.
- CIAMPI, L., SEQUEIRA, L. & FRENCH, E.R. Latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. *American Potato Journal* 57:377-386. 1980.
- CIESLA, W.M.; DIEKMANN, M. & PUTTER, C.A. *Eucalyptus* spp. FAO/IPGRI Technical Guide-lines for the safe movement of germplasm, n° 17. Rome, Italy: FAO/IPGRI. 1996.
- COELHO NETO, R.A., PEREIRA, B.G., NODA, H. & BOHER, B. Caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e em terra firme, no Estado do Amazonas. *Fitopatologia Brasileira* 28:362-366. 2003.
- COOK, D., BARLOW, E. & SEQUEIRA, L. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 2:113-121. 1989.
- COUTINHO, T.A., ROUX, J., RIEDEL, K.H. TERBLANCHE, J. & WINGFIELD, M.J. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. *Forest Pathology* 30:205-210. 2000.
- DARRASSE, A., TRIGALET, A. & PRIOR, P. Correlation of aggressiveness with genomic variation in *Ralstonia solanacearum* Race 1. In: PRIOR, P., ELPHINSTONE, J. (Eds.). *Bacterial Wilt Disease. Molecular and Epidemiological Aspects*. Berlin. Springer-Verlag 89-98. 1998.
- DENNY, T.P. *Ralstonia solanacearum* – a plant pathogen in touch with its host. *Trends in Microbiology* 11:486-489. 2000.
- DESLANDES, J.A. Observações fitopatológicas na Amazônia. *Boletim Fitossanitário do Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro* 1:197-242. 1944.

- DESLANDES, L., OLIVIER, J., THEULIÈRES, F., HIRSH, J., FENG, D.X., BITTNER-EDDY, P., BEYNON, J. & MARCO, Y. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Plant Biology* 99:2404-2409. 2002.
- 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*, Kaoshiung, Taiwan. 28-31 october 1992. *ACIAR Proc.* 45:206-210. 1993.
- DIANESE, J.C. & TAKATSU, A. *Pseudomonas solanacearum* biovar 1 isolada de eucalipto em Monte Dourado, Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira* 10:362. 1985. (Resumo).
- DIATLOFF, A., WOOD, B.A. & WRIGHT, D.G. Bacterial wilt of neem tree caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Australian Plant Pathology* 22:1. 1993.
- EDEN-GREEN, S.J. & ADHI, E.M. Sumatra disease of cloves and *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* 1:2-3. 1986.
- 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* 26:663-678. 1996.
- ENGELBRECHT, M.C. Modification of a semi selective medium for isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* 10:3-5. 1994.
- ESTELITTA, S., NAIR, P.V., VILASINI, T.N. & SANKAR, J. *Moringa oleifera* Lam. a new host of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* E.F. Smith from India. *Bacterial Wilt Newsletter* 14:6. 1997.
- GENIN, S. & BOUCHER, C. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Molecular Plant Pathology*. 3:111-118. 2002.
- GONG, M.Q., CHEN, Y., WANG, F.Z. & CHEN, Y.L. Inhibitory effect of ectomycorrhizal fungi on bacterial wilt of *Eucalyptus*. *Forest Research* 12:339-345. 1999.
- GRAHAM, J. & LLOYD, A.B. An improved indicator plant method for the detection of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in soil. *Plant Disease Report* 62:35-37. 1978.
- GRANADA, G.A. & SEQUEIRA, L. A selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 71:220. 1981. (Abstract).

- GREY, B.E. & STECK, T.R. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied Environmental Microbiology*. 67:3866-3872. 2001.
- GUTARRA, E.R.F.L., ALEY, P. & ELPHINSTONE, J. Methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato crops. In: Hardy, B., French, E.R. (Eds.). *Integrated Management of Bacterial Wilt. Proceedings of an International Workshop held in New Delhi, India. 11-16, 195p.* 1995.
- HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review Phytopathology* 29:65-87. 1991.
- HAYWARD, A.C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal Applied Bacteriology* 27:265-277. 1964.
- HAYWARD, A.C. *Ralstonia solanacearum*. In: *Encyclopedia of Microbiology.* (Lederberg, J. ED.). vol. 4. San Diego: Academic Press. P.32-42. 2000.
- HAYWARD, A.C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward, A.C. & Hartman, G.L. (Eds.). *Bacterial Wilt: The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum.* CAB International, Wallingford, Oxon, UK. p.25-34. 1994a.
- HE, L.Y. Bacterial wilt in the People's Republic of China. In: Presley, G.J. (Ed.). *Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an International Workshop Held at PCARRD, Los Banos, Philippines, October 1985.* ACIAR Proc. 13:40-48. 1986.
- HSU, S.T. Ecology and control of *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. *Plant Protection Bulletin Raiwan* 33:72-79. 1991.
- JANSE, J.O. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptom less potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO.* Bulletin 18:343-351. 1988.
- JAVIER, E.Q. Foreword. In: *Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum.* (Hayward, A.C., Hartman, G.L. Eds.). Wallingford, UK: CABI, p.xi-xii. 1994.
- KELMAN, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: a literature review and bibliography. North Caroline Agricultural Experimental Station. *Technical Bulletin*, 99. 1953.

- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695. 1954.
- LEE, Y. & WANG, C. The design of specific primers for the detection of *Ralstonia solanacearum* in soil samples by polymerase chain reaction. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 41:121-128. 2000.
- LI, H. & WU, X.Y. The current status, causes and control of forest diseases in Hainan province. *Tropical Forestry* 24:101-103. 1996.
- LIANG, Z.C. & GUO, Q. Propagation and selection of casuarinas for resistance to bacterial wilt. *Bacterial Wilt Newsletter* 8:4-5. 1992.
- LIANG, Z.C., GUO, Q. & WU, Q.P. Bacterial wilt of eucalyptus in South China. *Bacterial Wilt Newsletter* 8:5. 1992.
- LIN, X.P., LIN, X.J., WU, G.J., LI, X.X., CAI, J.S. & SU, S.C. The epidemic law of bacterial wilt in *Eucalyptus*. *Journal Central South Forestry University* 16:49-55. 1996.
- LOPES, C.A. Situação da murcha bacteriana no Brasil. In: *Enfermedades bacterianas de la papa. Memórias del taller sobre enfermedades bacterianas de la papa.* CNPH/EMBRAPA-CIP, Brasília, Brasil. 1994.
- LOPES, C.A. & TAKATSU, A. Controle da murcha bacteriana. *Fitopatologia Brasileira*. 22:224-225 (Resumo). 1997.
- MAFIA, R.G. Rizobactérias como promotoras do enraizamento, crescimento e como agentes de biocontrole de doenças na propagação clonal do eucalipto. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. 105p. 2004.
- MATHEWS, J. BEENA, S., CHERINA, K.A. & ABRAHAM, K. Bacterial wilt of nutmeg (*Myristica fragrans* L.) incited by *Pseudomonas solanacearum* Smith. *Bacterial Wilt Newsletter* 9:8. 1993a.
- MATHEWS, J. BEENA, S. & CHERINA, K.A. Bacterial wilt of mulberry (*Morus alba* L.) incited by *Pseudomonas solanacearum* Smith from China. *Bacterial Wilt Newsletter* 9:11. 1993b.
- MAYERS, P.E. & HUTTON, D.G. Bacterial wilt, a new disease of custard apple: symptoms and etiology. *Annals of Applied Biology* 111:135-141. 1987.
- MEW, T.W. & HO, W.C. Effect of soil temperature on resistance of tomato cultivars to bacterial wilt. *Phytopathology* 67:909-911. 1977.

- MIRANDA, E.F.O., TAKATSU, A. & UESUGI, C.H. Colonização de raízes de plantas daninhas cultivadas *in vitro* e em vasos por *Ralstonia solanacearum*, biovars 1, 2 e 3. *Fitopatologia Brasileira* 2:121-127. 2004.
- MITCHELL, B.A. Bacterial wilt in teak, *Tectona grandis* Linn. *Malaysian Forester* 25:164-166. 1962.
- MORA, A.L. & GARCIA, C.H. *A cultura do eucalipto no Brasil*. São Paulo, SP: Sociedade Brasileira de Silvicultura. 112 p. 2000.
- MOURA, A.G. & ROMEIRO, R.S. Avaliação *in vitro* de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896). *Ciência e Agrotécnica*. 23:281-288. 1999.
- NAPIERRE, C.M. Varying inoculum levels of bacteria-nematodes and the severity of tomato bacterial wilt. *Annals of Tropical Research* 2:129-134. 1980.
- OEPP/EPPO. *Ralstonia solanacearum*. Diagnostic protocols for regulated pests. OEPP/EPPO, *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 34:173-178. 2004.
- 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 Molecular Biology and Biotechnology* 5:19-33. 1997.
- PASTRIK, K.H. & MAISS, E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology* 148:619-626. 2000.
- POUSSIER, S. & LUISETI, J. Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissue by nested PCR. *European Journal of Plant Pathology* 106:255-265. 2000.
- POUSSIER, S., CHÉRON, J.J., COUTEAU, A. & LUISETTI, J. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. *Journal of Microbiological Methods* 51:349-359. 2002.
- PRIOR, P. & STEVA, H. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies. *Plant Disease* 74:13-17. 1990.
- QUEZADO-SOARES, A.M. & LOPES, C.A. Murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em duas espécies de plantas daninhas da família Labiatae. *Fitopatologia Brasileira*. 19:581-584. 1994.

- RAN, L.S., LIU, C.Y., WU, G.J., VAN LOON, L.C. & BAKKER, P.A.H.M. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. *Biological Control* 32:111-120. 2005.
- ROBBS, C.F., CRUZ, A.P. & NETO, J.R. Algumas estratégias de controle à murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em eucaliptos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA. Jaguariúna, SP. Comunicado Técnico, nº 3. 4p. 1988.
- ROBINSON, A. Serological detection of *Pseudomonas solanacearum* by ELISA. In: Hartman, G.L., Hayward, A.C. (Eds.). *Bacterial Wilt Proceedings of an International Conference, Kaoshiung, Taiwan, 28-31, october 1992*. ACIAR Proc. 45:54-61. 1993.
- SEAL, E.S., JACKSON, L.A. & DANIELS, M.J. Use of tRNA *consensus* primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3759-3761. 1992.
- SEAL, S.E. & ELPHINSTONE, J.G. Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward, A.C., Hartman, G.L. (Eds.). *Bacterial wilt, the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, UK. P.35-57. 1994.
- SEAL, S.E., JACKSON, L.A. YOUNG, J.P.W. & DANIELS, M.J. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology* 139:1587-1594. 1993.
- SHI, Z.M., XI, F.S., HE, G.Z., LI, J.H., WANG, S.M., XIAN, S.H. & PENG, S.Y. Studies on selection of *Eucalyptus* for resistance to bacterial wilt and resistance stability. *Guangxi Forestry Science* 29:1-6. 2000.
- SHIOMI, T., MULYA, K. & ONIKI, M. Bacterial wilt of cashew (*Anacardium occidentale* L.) caused by *Pseudomonas solanacearum* in Indonesia. *Industrial Crops Research Journal* 2:29-35. 1989.
- SMITH, E.F. A bacterial disease of tomato, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* sp. nov.) *US Dep. Agric. Div. Veg. Physiol. Path. Bull.* 12:1-28. 1896.

- 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).
- SUPRIADI, KARDEN, M. & SITEPU, D. Bacterial wilt disease of woody trees caused by *Pseudomonas solanacearum*: a review. Jurnal Litbang Pertanian. 20(3): 106-112. 2001.
- TAKATSU, A. & LOPES, C.A. Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. Horticultura Brasileira 15:170-177. 1997.
- TEIXEIRA, D. A. Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem e à mancha-de-Cylindrocladium, mediadas por rizobactérias em clones de *Eucalyptus* spp. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 67p. (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- TUSSIME, G., ADIPALA, E., OPIO, F. & BHAGSARI, A.S. Weeds as latent hosts of *Ralstonia solanacearum* in highland Uganda: Implications for lowland potato bacterial wilt control. In: Second International Bacterial Wilt Symposium. Guadeloupe-Antilles Françaises. 22-27 de june. 1997.
- VASSE, J., FREY, P. & TRIGALET, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. Molecular Plant-Microbe Interaction. 8:241-251. 1995.
- WANG, W.Y. Survey of Eucalyptus disease in Taiwan. Bull. Taiwan For. Res. Inst. 7, 179-194. 1992.
- WELLER, S.A., ELPHINSTONE, J.G., SMITH, N.C., BOONHAM, N. & STEAD, D.E. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. Applied Environmental Microbiology 66:2853-2858. 2000.
- WU, Q.P. & LIANG, Z.C. Identification and pathogenic tests of the causal organism of the bacterial wilt of *Eucalyptus*. J.South China Agr. Univ. 9(3), 59-67 1988a (CABI, Abstract).
- WU, Q.P. & LIANG, Z.C. Selection of species and provenance of *Eucalyptus* for resistance to bacterial wilt. Journal South China Agriculture University. 9:41-45. 1988b.
- YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., YANO, I., HOTTA, H. & NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of

Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiology and Immunology 39:897-904. 1995.

***Ralstonia solanacearum* em Viveiros Clonais de Eucalipto no Brasil**

RESUMO

A incidência da murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, em viveiros clonais de eucalipto, no período de abril a setembro de 2005, resultou no descarte de cerca de 554.000 minicepas, 6.840.000 propágulos na fase de enraizamento e 11.3000.000 mudas, nos Estados da Bahia, do Espírito Santo, Maranhão, de Minas Gerais e do Pará, totalizando um prejuízo estimado de seis milhões de reais (US\$ 2,7 milhões). Em minijardim clonal, a doença caracteriza-se por necrose foliar, escurecimento anelar ou completo do lenho, murcha e morte de minicepas. Os sintomas na parte aérea são similares à morte gradual de minicepas submetidas a podas drásticas ou com sistema radicular malformado. Na fase de enraizamento, miniestacas infectadas podem apresentar arroxamento das nervuras do limbo foliar e podridão. No campo, a doença caracteriza-se por bronzeamento e necrose foliar, desfolha basal, escurecimento interno do lenho e morte da planta, geralmente a partir do quarto mês após o transplante. Os sintomas se agravam em árvores com enovelamento de raízes e afogamento de coleto. A etiologia da doença foi confirmada por meio de testes de exsudação, microscopia de varredura, isolamento da bactéria, análises de PCR/RFLP, reação de hipersensibilidade (HR) em mudas de fumo, testes de patogenicidade em plântulas de eucalipto e tomate e re-isolamento da bactéria. Uma vez que o sistema de produção de mudas clonais de eucalipto é altamente favorável à multiplicação bacteriana e na falta de conhecimento sobre a resistência genética e de outras estratégias de controle da doença, é essencial evitar a introdução da bactéria em viveiros.

Palavras-chave adicionais: Etiologia, sintomatologia, murcha bacteriana, *Eucalyptus*.

INTRODUÇÃO

Em 2005, a incidência da murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi *et al.* (1995), resultou em elevadas perdas em viveiros de eucalipto nos Estados da Bahia, do Espírito Santo, Maranhão, de Minas Gerais e do Pará. Os prejuízos foram advindos do descarte de materiais utilizados em minijardim (areia, mangueiras de gotejamento etc.), propágulos e de plantas infectadas, bem como dos gastos para a erradicação de inóculo e adaptações para evitar novas contaminações nas diferentes fases da propagação clonal. Somam-se a esses prejuízos as perdas advindas de alterações de manejo, substituição de genótipos e de atrasos nos cronogramas de plantio. Em minijardins clonais, a murcha bacteriana pode ser confundida com o declínio e a morte de minicepas, formadas a partir de mudas velhas ou submetidas a podas drásticas e, ou, a coletas intensivas de brotações, que conduzem à morte de raízes e, conseqüentemente, redução da absorção de água e nutrientes.

No Brasil, apesar de seu grande impacto em culturas agrônômicas, especialmente em tomate e batata, a murcha bacteriana é uma enfermidade relativamente recente para a eucaliptocultura. Sua primeira ocorrência data do início da década de 1980, quando Sudo *et al.* (1983) relataram a enfermidade em plantios de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) e bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) no município de Prata (Triângulo Mineiro, Minas Gerais). Subseqüentemente, a enfermidade foi observada em eucalipto na Companhia Monte Dourado, no Pará (atual Jari Celulose), em 1984 e, posteriormente, na Camargo Corrêa (Tucuruí, Pará) e na Copener (Bahia) (Robbs *et al.*, 1988). Em 1985, Dianese & Takatsu (1985) identificaram a biovar 1 de *R. solanacearum* a partir de culturas da bactéria originárias de plantas de eucalipto cultivadas em Monte Dourado, Pará. Outros três isolados do patógeno, originários do Pará e da Bahia, foram também identificados como biovar 1 (Robbs *et al.*, 1988). Todas essas constatações ocorreram em plantios realizados em áreas recém-desmatadas e resultaram em até 25% de mortalidade. Em 1987, cerca de um milhão de mudas de eucalipto foram dizimadas pela doença em Monte Dourado (Robbs *et al.*, 1988).

Além do Brasil, a doença foi registrada nas principais regiões eucaliptocultoras do mundo, como China (Wu & Liang, 1988a), Taiwan (Wang, 1992), Indonésia (Alfenas, 1993), Austrália (Askiew & Tevorow, 1994), Venezuela (Ciesla *et al.*, 1996) e

África do Sul (Coutinho *et al.*, 2000). Na China, *E. urophylla* Blake, *E. tereticornis* Smith, *E. camaldulensis* Dehnh. e híbridos de *E. grandis* Hill ex Maiden \times *E. urophylla* ou *E. urophylla* \times *E. grandis* foram os materiais genéticos mais suscetíveis. Adicionalmente, *E. grandis*, *E. pellita* F. Muell., *E. propinqua* Deane & McKie e *E. saligna* Smith são listadas como espécies suscetíveis em condições de infecção natural (Wu & Liang, 1988b).

Diante da importância da murcha bacteriana para a eucaliptocultura e dos escassos conhecimentos sobre este patossistema, objetivou-se, nesse trabalho, descrever a sintomatologia e comprovar a etiologia da doença em viveiros de eucalipto, bem como quantificar as perdas causadas pela doença em 2005.

MATERIAL E MÉTODOS

Sintomatologia

A sintomatologia foi descrita a partir de inspeções em viveiros de eucalipto e análises laboratoriais de amostras oriundas dos Estados da Bahia, do Espírito Santo, Maranhão, de Minas Gerais e do Pará, bem como de plantios em campo com seis meses de idade em São Pedro dos Ferros, Minas Gerais.

Diagnose em amostras vegetais

No laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta e Patógeno (UFV), realizou-se a análise de 180 minicepas com sintomas da doença e de 270 sem sintomas, de seis clones híbridos de *Eucalyptus* spp. e de 1.260 miniestacas e 350 mudas formadas a partir de propágulos coletados em nove minijardins clonais. Amostraram-se cinco plantas com sintomas e cinco plantas aparentemente sadias no campo. A presença da bactéria foi confirmada por meio da avaliação macroscópica e microscópica de exsudação de pus bacteriano. No primeiro caso, mergulhou-se a base do caule seccionado de minicepas, miniestacas e de mudas em um tubo de ensaio com

água destilada. Após 1 a 3 min, observou-se a presença de exsudação na forma de fluxo bacteriano a partir da região seccionada. Na avaliação microscópica, três fragmentos (25 mm² de área e espessura de 1 mm) de tecido, retirados da região vascular, foram depositados em uma gota d'água destilada sobre uma lâmina microscópica. Posteriormente, os fragmentos foram observados ao microscópio de luz (40 X e 100 X) e avaliados quanto à presença de exsudação contínua de pus bacteriano.

Análise ultraestrutural de tecidos infectados

Análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas a fim de evidenciar a presença de células bacterianas em minicepas e visualizar os efeitos da infecção bacteriana sobre os tecidos da planta. Fragmentos de caule retirados da região do coleto de minicepas sadias e doentes, fixados em FAA 70 (formol 40%, 5 mL, álcool 70%, 90 mL e ácido acético glacial, 5 mL), foram seccionados no sentido transversal obtendo-se cortes de aproximadamente 2 mm de espessura. As amostras foram transferidas para recipientes com solução de glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 6,9 e deixadas em geladeira a 4 °C, por 12 h. Em seguida, efetuaram-se seis lavagens sucessivas, de 10 min cada, com a mesma solução-tampão. Após a pré-fixação, o material vegetal foi fixado em solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1%, no mesmo tampão de cacodilato, permanecendo em refrigerador a 4 °C por 4 h. Posteriormente, repetiram-se as seis lavagens sucessivas, conforme previamente descrito. Após fixação, as amostras foram submetidas a uma desidratação em série alcoólica crescente de 30, 50, 70, 80 e 95% por 10 min cada. Finalmente, transferiram-se as amostras para a concentração de 100%, sendo esta solução substituída por três vezes a cada 15 min. A seguir, procedeu-se à secagem ao ponto crítico do material (Balzers CPD-030), utilizando-se CO₂ líquido. Os fragmentos secos foram fixados sobre suportes metálicos, cobertos com ouro por meio de pulverização catódica (Balzers, modelo SCD50). As observações foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO, 1430 VP) com acelerações de 10.02 KV e distância de trabalho de 14 a 15 mm.

Isolamento

Segmentos de caule de minicepas com exsudação bacteriana foram parcialmente desinfestados pela lavagem com água e sabão. Posteriormente, fragmentos do caule com cerca de 1 cm foram depositados em gotas de água estéril em placa de porcelana, sob condições assépticas. Após cerca de 1-2 min em repouso, com o auxílio de uma alça de platina, realizou-se a transferência de alíquotas da suspensão para meio de cultivo de Kado & Heskett (1970). Após 48 h de incubação, colônias individualizadas com características típicas de *R. solanacearum* foram transferidas e armazenadas em água destilada estéril e em tubos de ensaio (15 cm x 1,5 cm) contendo o mesmo meio de cultivo.

Patogenicidade

As culturas puras foram testadas quanto à indução de reação de hipersensibilidade (HR) em folhas de fumo e patogenicidade em mudas de tomateiro e em plântulas de eucalipto. Como padrões de *R. solanacearum*, empregaram-se os isolados CNPH 221 (biovar 1), CNPH 174 (biovar 2) e CNPH 211 (biovar 3), obtidos da EMBRAPA - Hortaliças (CNPq, Brasília, DF).

Para a reação de hipersensibilidade, os isolados foram inicialmente multiplicados em meio de Kelman (1954). Após 48 h de incubação, a 28 °C, no escuro, selecionaram-se as colônias de aspecto liso, fluido e com o centro vermelho e as bordas brancas. As colônias selecionadas foram novamente multiplicadas em meio sólido de Kado & Heskett (1970) por 24 h, a 28 °C, no escuro. Posteriormente, preparou-se uma suspensão bacteriana em solução de cloreto de sódio (NaCl 0,85%) ajustada ao espectrofotômetro para uma $DO_{(\lambda=550\text{nm})}$ igual a 0,1. Com o auxílio de uma seringa hipodérmica de 1 mL de capacidade, a suspensão bacteriana foi infiltrada em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* L. 'Havana 425'). Necrose localizada na área infiltrada 24 a 48 h após a inoculação foi considerada evidência de HR positiva.

Para o teste de patogenicidade em mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill 'St. Clara'), o crescimento bacteriano em meio de Kelman (1954), selecionado conforme descrito anteriormente, foi tocado com agulha de seringa hipodérmica, a qual

foi usada para ferir a axila foliar de tomateiros com dois pares de folhas verdadeiras. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento, a 26 °C. Após 30 dias, a colonização bacteriana foi avaliada pelo teste de exsudação em gota d'água.

Para comprovação da patogenicidade em eucalipto, realizou-se um bioensaio adaptado de Bringel *et al.* (2001). Uma suspensão de inóculo do patógeno ajustada para aproximadamente 10^8 ufc/mL foi utilizada para a microbiolização de sementes de *E. grandis*. Após a desinfestação superficial das sementes por imersão em álcool 70 %, por 30 seg, e em hipoclorito de sódio 1 %, por 3 min, as sementes foram lavadas com água destilada esterilizada e imersas na suspensão de inóculo por 24 h, a 30 °C. Posteriormente, as sementes foram transferidas para tubos de ensaios contendo 10 mL de meio ágar-água (0,85 %), os quais foram mantidos em câmara de crescimento a 26 °C. Como testemunha, utilizaram-se sementes de eucalipto desinfestadas superficialmente e não microbiolizadas com o patógeno. Após 30 dias de incubação, avaliou-se a morte de plântulas.

Deteção por PCR (Polymerase Chain Reaction)

A partir de colônias bacterianas amplificou-se um fragmento interno ao rDNA16S por PCR, utilizando os oligonucleotídeos que pareiam com seqüências específicas para o gênero *Ralstonia* (PS1/ 5'- AGTCGAACGGCAGCGGGG -3' e PS2/ 5'- GGGGATTTACATCGGTCTTGCA -3') (Pastrick & Maiss, 2000). A reação foi realizada para um volume final de 25 µL, contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada um dos deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,4 µM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase e água esterilizada (Milli-Q). Após desnaturação inicial a 95 °C, por 10 min, a amplificação consistiu de 40 ciclos de desnaturação por 1 min a 94 °C, anelamento por 30 seg a 68 °C e extensão a 72 °C por 1 min e 30 seg. Após os 40 ciclos, foi realizada uma extensão final a 72 °C por 7 min. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1,6% em Tris Acetato EDTA (TAE), corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e fotodocumentado em Eagle Eye II (Stratagene™). Como controle da especificidade da reação, isolados de *R. solanacearum*, pertencentes à coleção da EMBRAPA Hortaliças (CNPH 221 - biovar 1; CNPH 174 - biovar 2; e CNPH 211,

biovar 3); e isolados de bactérias associadas ao eucalipto (patogênicas ou promotoras de crescimento), pertencentes aos gêneros *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Rhizobium* e *Bacillus*, foram utilizados nas reações. A especificidade do produto da PCR amplificado com os oligonucleotídeos PS1/PS2 foi confirmada por análise de restrição com a enzima *TaqI* (Pastrick & Maiss, 2000). Alíquotas de 10 µL do produto da PCR foram digeridos com 5 U de *TaqI* a 65 °C, por 45 min. Os produtos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, como descrito acima.

Quantificação das perdas causadas pela doença

As perdas em viveiros clonais foram quantificadas quanto ao número de minicepas, propágulos vegetativos e de mudas infectadas e, conseqüentemente, destruídas para a erradicação do patógeno nos Estados da Bahia, do Espírito Santo, Maranhão, de Minas Gerais e do Pará. Os prejuízos econômicos foram estimados considerando-se o valor de mercado para venda de mudas equivalente a R\$ 350,00/milheiro. Para propágulos vegetativos, ainda em fase de enraizamento, empregou-se o índice médio de 70 % para conversão em mudas aptas para expedição. O valor de cada minicepa foi estimado em R\$ 0,70, considerando o preço de mercado da muda perdida e o de reposição, desconsiderado seu potencial produtivo, que poderia ultrapassar R\$ 50,00 por planta.

RESULTADOS

Descrição sintomatológica da doença em viveiro

As minicepas infectadas apresentaram tendência à murcha; porém, menos evidente comparando-se com plantas infectadas pela bactéria em condições de campo. As folhas apresentavam lesões grandes, irregulares escuras (Figura 1A) que se tornavam marrom-claras a palha (Figura 1B). As lesões incidiam, predominantemente, próximas às bordas da folha e, raramente, em formato de “V” invertido, considerado sintoma

típico de déficit hídrico. A doença ocorreu mais severamente em minicepas com sistema radicular malformado (Figura 1C). Aparentemente, a infecção bacteriana nas raízes de integridade comprometida devido a podas drásticas (baixa qualidade do sistema radicular) acelerou o declínio (Figuras 1D e 1E) e a morte das minicepas (Figura 1F).

Cortes perpendiculares ao eixo principal e na região do coleto de minicepas evidenciaram alteração da coloração normal dos tecidos, que se tornavam mais escuros, geralmente em formato de anel (Figura 1G), no sentido perpendicular ao eixo principal, e ao longo de toda a haste principal da minicepa (Figura 1H).

Estudos da ultra-estrutura de tecidos infectados revelaram perda da rigidez e desestruturação das paredes celulares dos tecidos vasculares e do parênquima (Figuras 2A e B), bem como intensa colonização e obstrução dos vasos do xilema pelo patógeno e pela massa de polissacarídeos extracelulares (Figuras 2C e D).

A infecção bacteriana em minicepas clonais ocasionou decréscimo na produção de miniestacas e nos índices de enraizamento. Além disso, miniestacas provenientes de minicepas doentes de vários clones, durante a fase de enraizamento, apresentaram sintomas de arroxamento foliar sobre as nervuras (Figura 2E), necrose das hastes e morte (Figura 2F). Na fase de aclimação a céu aberto, as folhas tornavam-se arroxeadas, seguindo-se a morte das plantas (Figura 2G), dependendo, provavelmente, da intensidade de colonização bacteriana. Em mudas prontas para expedição, com aproximadamente 100 dias de idade, os sintomas foram similares aos descritos para minicepas, com o surgimento de lesões foliares necróticas irregulares, secas e dispersas no limbo foliar (Figura 2H). Nessa fase, sintomas mais severos de desfolha e morte das plantas também ocorreram.

Descrição sintomatológica da doença no campo

Os sintomas da doença no campo, em plantas oriundas de miniestacas infectadas, inicialmente caracterizavam-se por murcha e necrose na região da nervura central das folhas (Figura 3A), bronzeamento foliar e desfolha basal da planta (Figura 3B). Cortes perpendiculares do caule evidenciaram escurecimento do lenho a partir da região central (Figura 3C), de onde exsudava grande quantidade de pus bacteriano (Figura 3D). Geralmente, as árvores mais afetadas apresentavam problemas de

malformação radicular (Figura 3E) e, ou, afogamento de coleto, o que, dependendo da intensidade, causava o subdesenvolvimento ou a morte das plantas, resultando em alta desuniformidade do plantio (Figura 3F).

Diagnose da doença em viveiro e no campo

O teste de exsudação em tubo de ensaio permitiu constatar, de forma rápida, a presença de *R. solanacearum* em minicepas, com observação de exsudação de pus bacteriano a partir da base do tecido seccionado (Figura 3G). Todavia, por meio desse teste não foi possível observar exsudação da bactéria a partir de miniestacas ou de mudas infectadas ou de minicepas, aparentemente, com baixo índice de infecção. Por outro lado, pelo teste de exsudação em gota d'água (Figura 3H), constatou-se, ao microscópio, a presença da bactéria, independentemente do tipo de material vegetal analisado. A ausência de sintomas nem sempre indicou sanidade do material vegetal.

Para plantas no campo, provavelmente em virtude da maior colonização dos tecidos pela bactéria, a observação macroscópica direta de exsudação de pus bacteriano sobre a superfície do tecido lenhoso foi suficiente para comprovar a infecção por *R. solanacearum*.

Isolamento e testes de patogenicidade

A partir das amostras de tecidos positivas no teste de exsudação, foram obtidos 46 isolados bacterianos originários dos Estados da Bahia (17), do Espírito Santo (13), Maranhão (5), de Minas Gerais (10) e do Pará (1) (Tabela 1). Todos os isolados apresentaram colônias de aspecto fluido e coloração creme esbranquiçada quando cultivados em meio de Kado & Heskett (1970), similares à *R. solanacearum*.

Dentre os isolados, 27 induziram reação de hipersensibilidade em folhas de fumo e colonizaram plantas de tomateiro e 30 causaram necrose e morte em plantas de eucalipto. Houve correlação entre reação de hipersensibilidade em fumo e patogenicidade em tomateiro e eucalipto. Todavia, para os isolados UFV 17, UFV 56 e

UFV 59 ocorreu resultado positivo somente para os testes de patogenicidade em eucalipto (Tabela 1).

Detecção por PCR

Com o par de oligonucleotídeos PS1/PS2, a partir das colônias dos isolados considerados patogênicos, foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 500 pb. Em três casos houve amplificação para isolados (UFV 19, UFV 45 e UFV 47) negativos para os testes de patogenicidade em eucalipto, e em dois deles não ocorreu amplificação para isolados (UFV 56 e UFV 59) patogênicos ao eucalipto. Em relação à patogenicidade ao tomateiro, a PCR foi positiva para dois isolados (UFV 45 e UFV 47) considerados não patogênicos. Houve amplificação para três isolados negativos (UFV 19, UFV 45 e UFV 47) quanto aos testes de HR (Tabela 1).

A partir de colônias de outras bactérias associadas (patogênicas ou rizobactérias) ao eucalipto, pertencentes aos gêneros *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Erwinia* e *Bacillus*, nenhum produto foi amplificado nas condições de PCR utilizadas. A partir dos isolados-padrão de *R. solanacearum* (CNPH 174, CNPH 211 e CNPH 221) foi possível amplificar o fragmento de tamanho esperado. A natureza do produto amplificado foi confirmada após análise de restrição com a enzima *TaqI* (Figura 4).

Quantificação das perdas causadas pela doença

A murcha bacteriana, distribuída nos Estados da Bahia, do Espírito Santo, Maranhão, de Minas Gerais e do Pará afetou 28 clones de eucalipto e resultou no descarte e destruição de 553.991 minicepas, 6.837.691 propágulos vegetativos e de 11.266.819 mudas prontas para expedição (Tabela 2). Os prejuízos econômicos totalizaram aproximadamente R\$ 6.000.000,00, considerando-se somente o descarte de material vegetal.

DISCUSSÃO

Este trabalho constitui um relato das características e da importância da murcha bacteriana para viveiros clonais de eucalipto. Analogamente ao que ocorre em outros hospedeiros (Vasse *et al.*, 1995), os sintomas macroscópicos observados e as análises ultra-estruturais dos tecidos infectados indicam que em minicepas infectadas a obstrução dos vasos pelo material capsular e a perda de capilaridade vascular resultante da degradação enzimática dos vasos do xilema reduzem a translocação de água, ocasionando os sintomas de murcha e morte da planta. A natureza lenhosa do eucalipto pode determinar a baixa frequência de murcha, que geralmente ocorre apenas em minicepas com sistema radicular afetado. Várias espécies florestais são hospedeiras de *R. solanacearum*. Entretanto, relatos sobre o declínio de árvores são limitados. Embora os sintomas típicos variem com a espécie hospedeira, em geral, plantas arbóreas infectadas por *R. solanacearum* apresentam sintomas de murcha permanente, descoloração interna do lenho e obstrução vascular por massas de células bacterianas e material capsular (Supriadi *et al.*, 2001).

A detecção da bactéria em minicepas e mudas assintomáticas sugere que a doença apresenta desenvolvimento lento e que, sob determinadas condições ambientais e de predisposição do hospedeiro, há aumento de colonização dos tecidos e expressão dos sintomas. No sistema atual de produção de mudas clonais de eucalipto, a coleta intensiva de brotações para estaquia e a realização de podas drásticas em minicepas induzem a morte de raízes, o que resulta na debilitação fisiológica das plantas, tornando-as mais vulneráveis à infecção. Além disso, a frequente fertirrigação e a temperatura elevada do leito de areia dos canteiros favorecem a multiplicação e disseminação do patógeno em minijardim clonal.

Em eucalipto, existem diferenças entre os sintomas da doença em minicepas e plantas no campo. As minicepas infectadas apresentam menor turgescência dos tecidos foliares, mas raramente atingem ponto de murcha permanente, desfolha e necrose foliar no formato de “V” invertido, como observado no campo em plantas jovens mais suscetíveis (Ferreira & Milani, 2002). A severidade da doença varia de acordo com as condições ambientais. Na península de Leizhou (Guangdong), a murcha bacteriana do eucalipto ocorre anualmente de abril a novembro, sendo mais severa de julho a agosto, por se um período mais quente e úmido (Liang *et al.*, 1992). Sob condições naturais de

infecção, os sintomas surgem no campo em plantas com 3-4 meses após o plantio, podendo a enfermidade ser aguda ou crônica. No primeiro caso, a doença progride rapidamente, ocasionando às vezes a morte de árvores jovens em 2-3 semanas após o surgimento dos primeiros sintomas. As folhas das árvores infectadas murcham e entram em colapso rapidamente, os vasos do xilema tornam-se escurecidos e, na superfície dos ramos e haste doentes, surgem estrias marrons a marrom-escuras. As raízes tornam-se necróticas e, a partir da superfície de cortes em hastes e raízes, nota-se exsudação de pus bacteriano. No tipo crônico, a doença progride mais lentamente, as árvores infectadas têm crescimento reduzido, as folhas tornam-se de coloração avermelhada e, finalmente, murcham, culminado com a morte da planta após 2 a 6 meses (Supriadi *et al.*, 2001).

Embora não tenha sido objetivo do estudo, é importante considerar as possíveis fontes de inóculo da bactéria em viveiros, com vistas à adoção de medidas de controle. Acredita-se que o material propagativo (macroestacas) originário de matrizes infectadas no campo seja a principal fonte de inóculo primário de *R. solanacearum* em viveiros. Dessa forma, é fundamental estabelecer o minijardim com mudas comprovadamente saudáveis. Potencialmente, existem outras fontes de contaminação como a água de irrigação e a areia utilizadas no leito dos canaletões, pois essa bactéria, endêmica em diferentes regiões tropicais e subtropicais do mundo (Hayward, 1991) e distribuída no território nacional (Robbs *et al.*, 1988), é capaz de, na ausência do hospedeiro, sobreviver no solo por períodos prolongados, associada com a matéria orgânica ou com plantas daninhas, sem induzir sintomas (Hayward, 1991). Também pode entrar em estado de dormência, permanecendo como células viáveis, mas não cultiváveis (Grey & Steck, 2001). Uma vez que a disseminação de *R. solanacearum* pode, potencialmente, ocorrer via tesouras de poda e por recipientes reutilizados no viveiro, sugere-se, com base em testes conduzidos para outros microrganismos fitopatogênicos (Alfenas *et al.*, 2004), desinfestá-los em água quente a 80 °C/1 min.

Considerando-se as possíveis fontes de inóculo para minijardins clonais de eucalipto, é necessário dispor de técnicas confiáveis e de alta sensibilidade para detectar a bactéria e realizar o controle preventivo. Existem várias técnicas para detecção do patógeno em material vegetal e em solo. A técnica mais comum, mas menos sensível, consiste na transferência de suspensão de solo para meios de cultura específicos. A bactéria em meio de cultivo apresenta, geralmente, colônia esbranquiçada e fluída, com 3-5 cm de diâmetro após 2-3 dias de incubação a 29 °C. A sensibilidade desse método

permite detectar até 100 ufc/g solo (Pradhanang *et al.*, 2000). Todavia, esse método requer treinamento para distinguir colônias típicas do patógeno de bactérias saprófitas, o que limita o seu uso em larga escala. Além disso, a sensibilidade do método varia entre amostras de solo, dependendo, por exemplo, de outros microrganismos que podem inibir o crescimento da bactéria. O uso de plantas indicadoras, como o tomateiro (Graham & Lloyd, 1978), também apresenta baixa sensibilidade (10^4 a 10^5 cél./g de solo) como fator limitante. O ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*) indireto apresenta, além da baixa sensibilidade (10^4 cél./g de solo), baixa especificidade (Priou *et al.*, 1998), embora a sensibilidade possa ser aumentada pela incubação prévia dos extratos de solo em caldos nutritivos seletivos para multiplicação da bactéria-alvo (Priou *et al.*, 1998). Outras variações do teste de ELISA consistem nas técnicas NCM-ELISA (Nitrocellulose Membrane – ELISA) e DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich Immunoassay*) (Priou *et al.*, 1998). Na União Européia, o método-padrão para monitorar a ocorrência de *R. solanacearum* em batata-semente envolve o uso da técnica IFAS (*Indirect Immunofluorescence Antibody Staining*) e isolamento em meio seletivo. Os resultados positivos determinados pela técnica IFAS são confirmados por bioensaio com plantas de tomate (indicadora) e pela detecção de seqüências de DNA específicas por PCR a partir da cultura pura da bactéria isolada em meio de cultura seletivo (OEPP/EPP, 2004). Testes diagnósticos utilizando PCR a partir de amostras de água, sementes, solo e de material vegetal têm mostrado rapidez e especificidade de detecção (Seal *et al.*, 1999; Lee & Wang, 2000; Poussier *et al.*, 2002).

Em diversas culturas é difícil o emprego de plantas resistentes para o controle da doença, em face da alta variabilidade na população do patógeno e da instabilidade da resistência, esta em razão das condições de temperatura e da umidade do solo (Mew & Ho, 1977). Todavia, em condições de campo, Wu & Liang (1988b) observaram variações no nível de resistência para certas procedências, sendo *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. saligna*, *Corymbia citriodora* e *E. exserta* F. Muell. as mais resistentes à murcha bacteriana. Dianese & Dristig (1993) concluíram, por meio de inoculações artificiais, que isolados de *R. solanacearum* oriundos de eucalipto foram patogênicos a *E. deglupta* Blume, *E. microcorys* F. Muell., *E. pilularis* Smith, *E. punctata* D.C., *E. pyrocarpa* L. Johnson & D. Blaxell, *E. robusta* Sm., *E. saligna* e *E. urophylla*. As espécies *E. camaldulensis*, *C. citriodora*, *E. cloeziana* F. Muell, *E. deanei* Maiden, *E. pellita*, *E. grandis*, *E. resinifera* Sm., *E. tereticornis* e *E. torelliana* F. Muell foram

consideradas resistentes. Na China, Li & Wu (1996) observaram que espécies de crescimento rápido como *E. urophylla*, *E. grandis*, *E. saligna* e os híbridos *E. grandis* x *E. urophylla* ou *E. urophylla* x *E. grandis*, com menos de dois anos, são altamente suscetíveis. As diferenças quanto ao nível de resistência para uma mesma espécie podem estar relacionadas com o uso de procedências distintas, o que deve ser melhor investigado.

O controle biológico tem despontado como alternativa promissora. Para a cultura do eucalipto, o tratamento de mudas com isolados da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* indica o seu potencial no controle da murcha do eucalipto na China (Ran *et al.*, 2005). Atualmente, o produto Rizolyptus[®] à base de rizobactérias, efetivo para o controle de algumas doenças em viveiro (Alfenas *et al.*, 2004), está sendo testado para o controle de *R. solanacearum* em minijardim clonal de *Eucalyptus* spp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. Potential and present status of *Eucalyptus* and *Acacia mangium* diseases in Northern Sumatra. Consultancy Report to P.T. Inti Indorayon Utama Company, Indonesia. 53p. (Relatório Técnico-Científico). 1993.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa, MG. Imprensa Universitária. 2004.
- ASKIEW, E. & TEVOROW, P.R. Management of bacterial wilt of tobacco. In: Hayward, A.C. & Hartman, G.L. (Eds.). Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB. Wallingford. UK. 1994. pp. 179-198.
- BRINGEL, J.M.M., TAKATSU, A. & UESUGI, C.H. Colonização radicular de plantas cultivadas por *Ralstonia solanacearum*, biovars 1, 2 e 3. Scientia Agricola 58:497-500. 2001.
- CIESLA, W.M., DIEKMANN, M. & PUTTER, C.A. *Eucalyptus* spp. FAO/IPGRI. Technical Guide-lines for the safe movement of germplasm, nº 17. Rome, Italy: FAO/IPGRI. 1996.
- COUTINHO, T.A., ROUX, J., RIEDEL, K.H., TERBLANCHE, J. & WINGFIELD, M.J. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. Forest Pathology 30:205-210. 2000.
- 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.
- DIANESE, J.C. & TAKATSU, A. *Pseudomonas solanacearum* biovar 1 isolada de eucalipto em Monte Dourado, Estado do Pará. Fitopatologia Brasileira 10:362. 1985. (Resumo).
- FERREIRA, F.A. & MILANI, D. Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. International Paper. 2002.
- GRAHAM, J. & LLOYD, A.B. An improved indicator plant method for the detection of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in soil. Plant Disease Report 62:35-37. 1978.
- GREY, B.E. & STECK, T.R. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. Applied Environmental Microbiology 67:3866-3872. 2001.

- HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:65-87. 1991.
- KADO, E.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969-976. 1970.
- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44:693-695. 1954.
- LEE, YUNG-AN & WANG, CHI-CHUNG. The design of specific primers for the detection of *Ralstonia solanacearum* in soil samples by polymerase chain reaction. Botanical Bulletin of Academia Sinica 41:121-128. 2000.
- LI, H. & WU, X.Y. The current status, causes and control of forest diseases in Haiman province. Tropical Forestry 24:101-103. 1996.
- LIANG, Z.C., GUO, Q. & WU, Q.P. Bacterial wilt of eucalyptus in South China. Bacterial Wilt Newsletter 8:5. 1992.
- MEW, T.W. & HO, W.C. Effect of soil temperature on resistance of tomato cultivars to bacterial wilt. Phytopathology 67:909-911. 1977.
- OEPP/EPPO (Organisation Européenne pour la Protection des Plantes/European Plant Protection Organisation). *Ralstonia solanacearum*. Diagnostic protocols for regulated pests. OEPP/EPPO Bulletin 34:173-178. 2004.
- PASTRIK, K.H. & MAISS, E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. Journal of Phytopathology 148:619-626. 2000.
- POUSSIER, S., CHÉRON, J.J., COUTEAU, A. & LUISETTI, J. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. Journal of Microbiological Methods 51:349-359. 2002.
- PRADHANANG, P.M., ELPHINSTONE, J.G. & FOX, R.T.V. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. Plant Pathology 49:414-422. 2000.
- PRIOU, S. GUTARRA, L., FERNANDES, H. & ALEY, P. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in latently infected potato tubers and soil by post enrichment ELISA. CIP Program Report. p.111-122. 1998.
- RAN, L.S., LIU, C.Y., WU, G.J., VAN LOON, L.C. & BAKKER, P.A.H.M. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. Biological Control 32:111-120. 2005.

- ROBBS, C.F., CRUZ, A.P. & NETO, J.R. Algumas estratégias de controle à murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em eucaliptos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA.Jaguariúna, SP. Comunicado Técnico, nº 3. 4p. 1988.
- SEAL, S.E., TAGHAVI, M., FEGAN, N., HAYWARD, A.C. & FEGAN, M. Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. *Plant Pathology* 48:115-120. 1999.
- 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* 8:631. 1983. (Resumo).
- SUPRIADI, KARDEN, M. & SITEPU, D. Bacterial wilt disease of woody trees caused by *Pseudomonas solanacearum*: a review. *Jurnal Litbang Pertanian* 20:106-112. 2001.
- VASSE, J., FREY, P. & TRIGALET, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 8:241-251. 1995.
- WANG, W.Y. Survey of *Eucalyptus* disease in Taiwan. *Bulletin Taiwan Forest Research Institute* 7:179-194. 1992.
- WU, Q.P. & LIANG, Z.C. Identification and pathogenic tests of the causal organism of the bacterial wilt of *Eucalyptus*. *Journal South China Agriculture University* 9:59-67. 1988a
- WU, Q.P. & LIANG, Z.C. Selection of species and provenance of *Eucalyptus* for resistance to bacterial wilt. *Journal South China Agriculture University* 9:41-45. 1988b.
- 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. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology* 39:897-904. 1995.

Tabela 1 - Reação de hipersensibilidade (HR) em fumo, patogenicidade ao tomateiro e ao eucalipto, detecção por PCR e biovar dos isolados bacterianos obtidos de eucalipto

Isolado	Origem	Hospedeiro	HR	Patogenicidade			
				Tomateiro	Eucalipto	PCR	Biovar
UFV 1	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND*	-	-	1
UFV 2	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 3	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 4	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 5	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 7	Bahia	<i>Corymbia citriodora</i>	+	+	+	+	1
UFV 8	Bahia	<i>Corymbia citriodora</i>	+	+	+	+	1
UFV 9	Maranhão	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 10	Maranhão	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 11	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 12	Maranhão	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 13	Minas Gerais	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 14	Minas Gerais	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 15	Minas Gerais	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 17	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	-	+	+	1
UFV 18	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 19	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	+	1
UFV 20	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 21	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 22	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 26	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	ND
UFV 27	Bahia	<i>Corymbia citriodora</i>	+	+	+	+	1
UFV 28	Maranhão	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 29	Maranhão	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 30	Minas Gerais	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 31	Minas Gerais	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 32	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 34	Pará	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 35	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 36	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 37	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 38	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 39	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 41	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 45	Minas Gerais	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	-	-	+	1
UFV 47	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	-	-	+	ND
UFV 48	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	ND
UFV 49	Espírito Santo	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 51	Minas Gerais	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 52	Minas Gerais	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 53	Minas Gerais	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 54	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 55	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	+	+	+	+	1
UFV 56	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	+	-	1
UFV 58	Bahia	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	-	-	1
UFV 59	Minas Gerais	<i>Eucalyptus</i> sp.	-	ND	+	-	1
CNPH 174	Distrito Federal	<i>Solanum tuberosum</i> L.	+	+	+	+	2
CNPH 211	Goiás	<i>L. esculentum</i> Mill.	+	+	+	+	3
CNPH 221	Distrito Federal	<i>L. esculentum</i>	+	+	+	+	1

*Não determinado

Tabela 2 - Clones afetados, perdas de minicepas, propágulos vegetativos e de mudas clonais de eucalipto em consequência da incidência de *Ralstonia solanacearum* em diferentes regiões do Brasil

Viveiro	Local	Clones afetados	Material vegetal		
			Cepas/Minicepas	Propágulos	Mudas
01	Bahia	14	29.311	-	625.000
02	Espírito Santo	07	305.000	6.156.000	7.344.000
03	Maranhão	01	58.000	-	-
04	Minas Gerais	03	62.000	262.719	1.176.796
05	Minas Gerais	02	99.680	376.336	2.047.896
06	Pará	01	-	42.636	73.127
Total		28	553.991	6.837.691	11.266.819

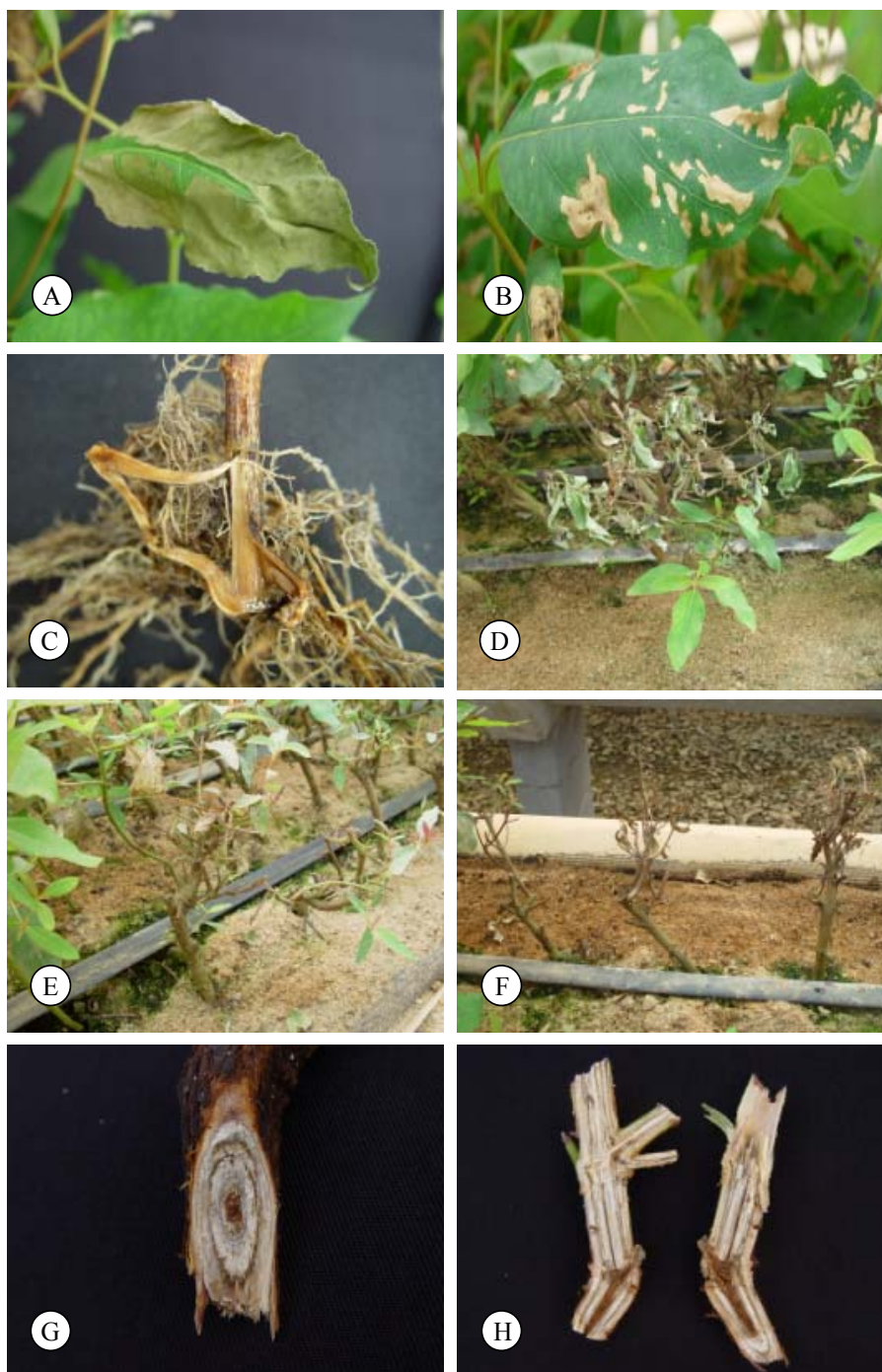


FIG. 1 - Sintomas da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* em minicepas de eucalipto: A - Lesões foliares grandes e irregulares escuras; B - Lesões foliares de coloração marrom claro a cor palha dispersas no limbo foliar; C - Malformação radicular; D e E - Declínio de minicepas; F - Morte de minicepas com infecção bacteriana; G - Escurecimento em anel dos tecidos da base da minicepa; e H - Descoloração dos tecidos internos de minicepa.

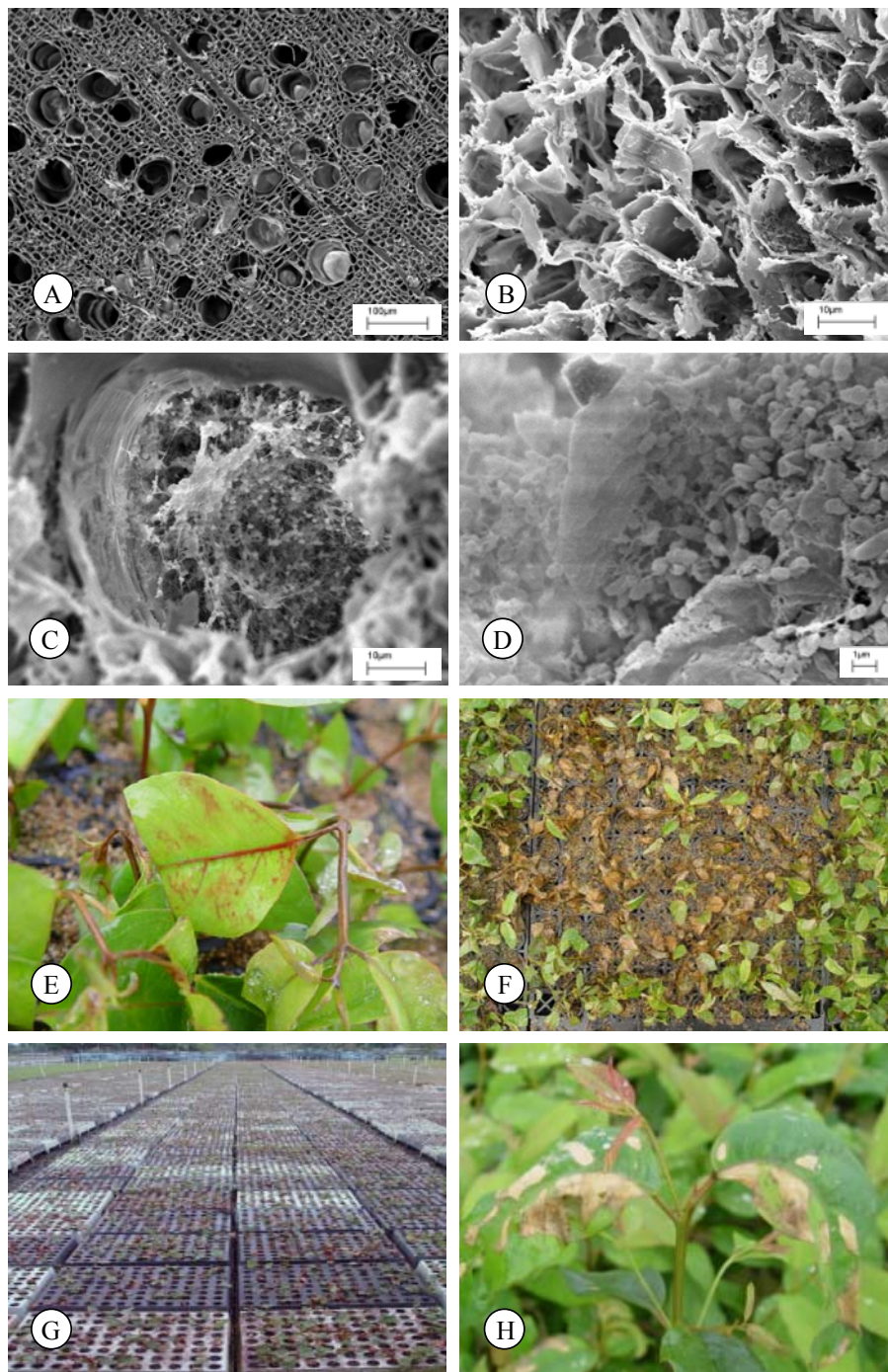


FIG. 2 - Sintomas da murcha bacteriana e colonização por *Ralstonia solanacearum* dos tecidos vasculares de minicepas de eucalipto: A - Aspecto do tecido sadio; B - Desestruturação das paredes celulares de tecido infectado; C - Colonização de um vaso do xilema; D - Detalhe da obstrução causada pela colonização bacteriana no interior do vaso; E - Arroxamento de nervuras foliares em miniestacas; F – Morte de miniestacas infectadas; G - Arroxamento foliar e morte de mudas em fase de aclimação a céu aberto; e H - Lesões foliares em mudas prontas para expedição.

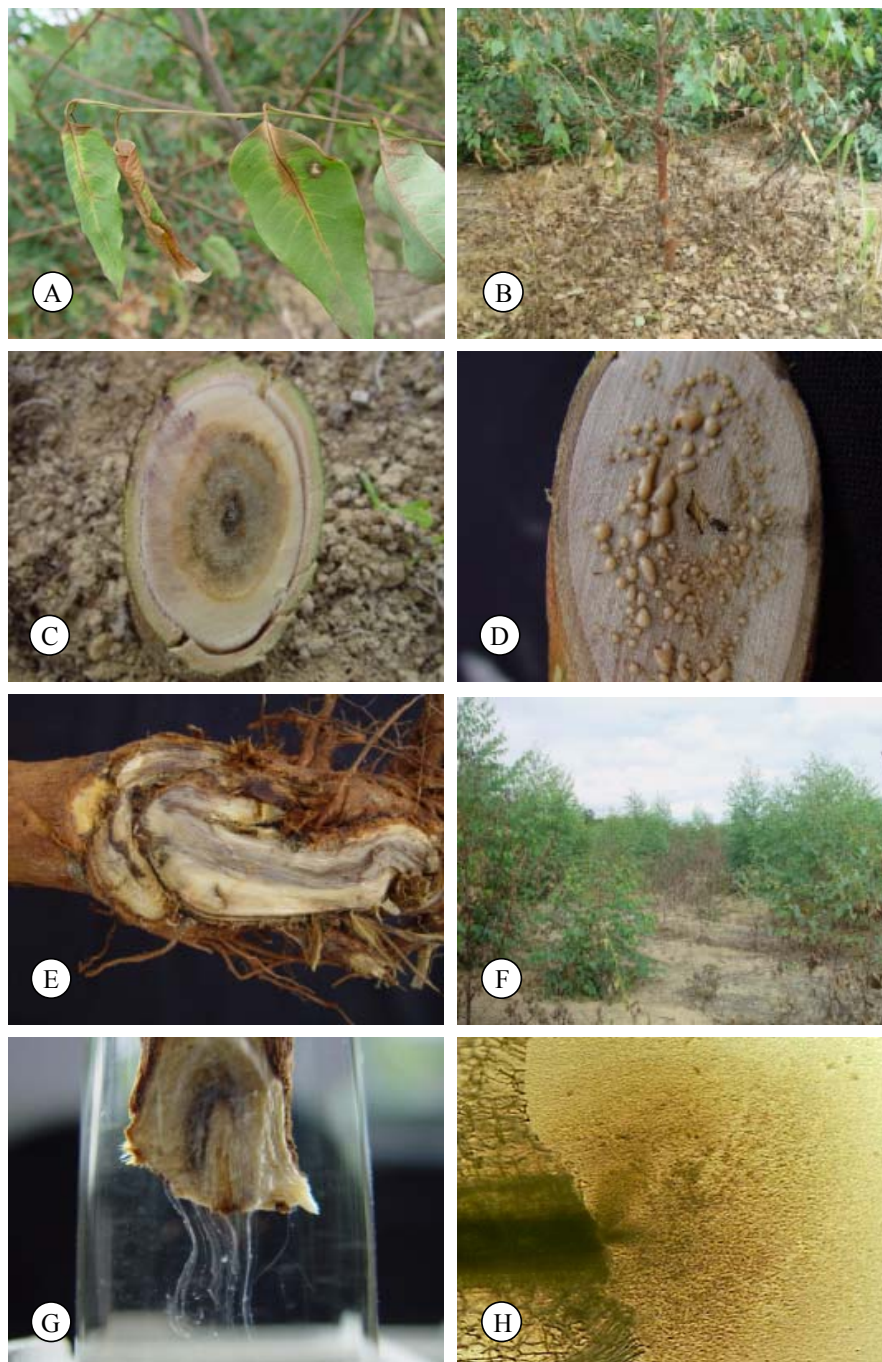


FIG. 3 - Sintomas de murcha bacteriana em campo e testes diagnósticos: A - Murcha e necrose de nervuras; B - Desfolha basal ascendente; C - Escurecimento do lenho causado pela infecção; D - Exsudação de pus bacteriano; E - Enovelamento radicular e sintomas de escurecimento causado pela colonização bacteriana; F - Falta de uniformidade no crescimento e mortalidade no campo; G - Exsudação de pus bacteriano em teste diagnóstico em tubo de ensaio; e H - Exsudação bacteriana em gota d'água.

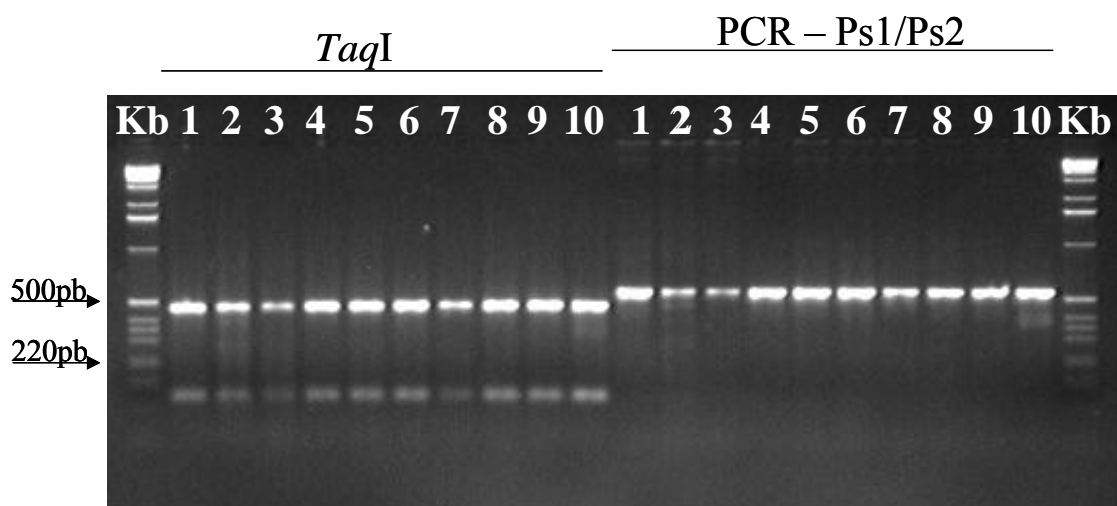


FIG. 4 – PCR-RFLP para detecção de *Ralstonia solanacearum*. Amplificação realizada a partir de colônias isoladas, utilizando-se os oligonucleotídeos PS1 (5' – AGTCGAACGGCAGCGGGG - 3') e PS2 (5' – GGGGATTCACATCGGTCTTGCA - 3') e clivagem com enzima *TaqI*. À direita, observa-se o produto da PCR realizada a partir de colônias de 10 isolados e, à esquerda, a clivagem do produto da PCR. Kb – Marcador molecular de comprimento (1Kb DNA Ladder); linha 1 – Controle positivo com isolado CNPH 174; linha 2 – Isolado de *Eucalyptus* spp. da Bahia (RS 38); linhas 3 e 4 isolados de *Eucalyptus* spp. de Minas Gerais (RS 30 e RS 31); linhas 5, 6 e 7 isolados de *Eucalyptus* spp. do Espírito Santo (RS 49, RS 20 e RS 18); linhas 8, 9 e 10 isolados de *Eucalyptus* spp. do Maranhão (RS 12, RS 10 e RS 9).

Mudas Clonais Como Fonte de Inóculo e Efeito da Murcha Bacteriana Sobre a Produtividade de Minijardins Clonais de *Eucalyptus* spp.

RESUMO

Objetivou-se comprovar a disseminação do patógeno por mudas clonais e avaliar efeito da interação entre *Ralstonia solanacearum* e eucalipto sobre a produtividade de minijardins clonais. Realizou-se a detecção do patógeno em material vegetal coletado nas diferentes fases de produção, bem como quantificou-se a colonização bacteriana em mudas de sete clones comerciais. Em outro experimento, avaliou-se o substrato de enraizamento como fonte de inóculo do patógeno. Mensalmente, entre fevereiro de 2004 e fevereiro de 2005, determinou-se o enraizamento médio. Para os três últimos meses do período, calculou-se o índice de produtividade (IP). Constatou-se o patógeno em minicepas de cinco dos sete clones avaliados, em miniestacas e em mudas de todos os sete clones, incluindo dois clones sem sintomas da doença em minijardim clonal, cuja contaminação dos propágulos vegetativos deu-se ao longo do processo de produção de mudas. Comprovou-se que o substrato também pode ser fonte de inóculo do patógeno. A incidência da doença no minijardim, a partir de novembro de 2004, resultou em redução de até quatro vezes no IP. Os distúrbios fisiológicos causados pelas infecções bacterianas afetaram a produtividade dos minijardins clonais. Brotações infectadas e substrato de enraizamento podem ser fontes de inóculo importantes para a disseminação do patógeno a partir de mudas clonais de eucalipto.

Palavras-chave adicionais: Eucalipto, murcha bacteriana, clonagem, fisiologia, temperatura foliar, produtividade.

INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana do eucalipto, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi et al. (1995), é uma doença importante, em virtude da natureza sistêmica das infecções, das perdas causadas em viveiro e no campo e das várias características do patossistema que dificultam o controle. Recentemente, a incidência da doença em viveiros clonais nos Estados da Bahia, do Espírito Santo, Maranhão, de Minas Gerais e do Pará totalizou um prejuízo estimado de seis milhões de reais (US\$ 2,7 milhões) (Alfenas et al., 2006).

Ralstonia solanacearum é considerada uma das bactérias fitopatogênicas mais importantes do mundo, em razão dos grandes prejuízos causados, da ampla distribuição geográfica, da extensa gama de hospedeiros e da elevada variabilidade genética na população do patógeno que dificulta o controle. A bactéria causa doença em mais de 200 espécies de, aproximadamente, 50 famílias botânicas (Hayward, 2000). Dentre as culturas de maior importância econômica e com maior número de estudos, incluem-se: batata (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), berinjela (*Solanum melongena* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.), pimentão (*Capsicum annum* L.), pimenta (*Capsicum frutescens* L.), banana (*Musa* spp.), gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) e amendoim (*Arachis hipogaea* L.) (Kelman, 1953; Pereira, 1990; Hayward, 1991; Hayward, 1994; Lopes, 1994; Lopes & Takatsu, 1997; Lopes, 2005). Em virtude de sua importância, *R. solanacearum* foi um dos primeiros patógenos de plantas a ter o genoma totalmente seqüenciado (Denny, 2000; Salanoubat et al., 2002).

Existem evidências de que várias espécies florestais são hospedeiras de *R. solanacearum*. Contudo, relatos sobre o declínio de árvores são limitados. Em geral, os sintomas em plantas arbóreas infectadas pela bactéria são murcha permanente, descoloração e bloqueio dos tecidos vasculares com massas de células. Todavia, os sintomas típicos podem variar de acordo com a espécie hospedeira (Supriadi et al., 2001). Para eucalipto, os sintomas da doença em viveiro diferem dos que ocorrem no campo. Em minijardim clonal, a doença caracteriza-se por necrose foliar, escurecimento anelar ou completo do lenho, murcha e morte de minicepas. Os sintomas na parte aérea são similares à morte gradual de minicepas submetidas a podas drásticas ou com sistema radicular malformado (Alfenas et al., 2006).

A disseminação de *R. solanacearum* a grandes distâncias pode ocorrer por materiais vegetais para plantio e por produtos e subprodutos florestais para consumo ou para indústria. Em curta distância, a bactéria pode ser disseminada por ferramentas e equipamentos utilizados durante as práticas agrícolas, insetos e pelo próprio homem (Supriadi et al., 2001). Para eucalipto, ainda não existe comprovação da transmissibilidade do patógeno durante a propagação clonal, o que pode comprometer sobremaneira o sistema de produção de mudas. Além disso, ainda não há estudos que demonstrem os efeitos da doença na produtividade de minijardins clonais. Sendo assim, objetivou-se neste trabalho comprovar a transmissão do patógeno por mudas clonais e determinar o efeito da interação de *Ralstonia solanacearum* e eucalipto sobre a produtividade de minijardins clonais.

MATERIAL E MÉTODOS

A detecção do patógeno nas diferentes fases de produção de mudas (*E. urophylla* Blake x *E. grandis* Hill ex Maiden), os dados de colonização dos tecidos vasculares de mudas clonais e de produtividade de minicepas foram obtidos a partir de material vegetal com infecção natural por *R. solanacearum* em um viveiro comercial localizado no Estado do Espírito Santo, de fevereiro de 2004 a fevereiro de 2005. Para avaliar o substrato de enraizamento como fonte de inóculo, instalou-se um experimento no viveiro de pesquisa do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Deteção do patógeno nas diferentes fases de produção de mudas

Objetivou-se avaliar a transmissibilidade do patógeno por meio de brotações contaminadas. Para isso, procurou-se detectar a bactéria em minicepas, com ou sem sintomas, em miniestacas colhidas em três posições (basal, mediana e apical) da brotação da minicepa, em miniestaca na fase de enraizamento e em mudas aptas para expedição. Efetuou-se a amostragem ao acaso, totalizando 30 minicepas, 30 miniestacas e 50 mudas para cada um dos sete clones avaliados.

O método de detecção utilizado foi o teste de exsudação em gota d'água. Para realização deste, retiraram-se três fragmentos da região medular do coleto das minicepas e mudas ou da base das miniestacas, de aproximadamente 25 mm² de área e espessura de 1 mm. Estes fragmentos foram depositados em gotas de água e, após 1 min, foram observados ao microscópio de luz (40 e 100 X) para constatação de exsudação de pus bacteriano a partir de suas extremidades.

Colonização bacteriana de mudas clonais

A colonização bacteriana foi determinada para mudas, com 90 dias de idade, dos sete clones avaliados anteriormente. Inicialmente, separou-se a parte aérea do sistema radicular. Retiraram-se as folhas e lavaram-se as hastes em água corrente. Com uma régua graduada, mediu-se o comprimento da haste e retirou-se um fragmento de 1cm de cada extremidade. Do restante da haste, retiraram-se mais três fragmentos, de igual tamanho e em posições equidistantes. Os fragmentos obtidos foram pesados e desinfestados superficialmente, pela imersão em álcool (50%) por 30 s e em hipoclorito de sódio (5%) por 1 min. Posteriormente, removeu-se o excesso de cloro em água destilada esterilizada. Sob condições assépticas, transferiu-se cada um dos fragmentos para tubos eppendorfs, contendo 1 mL de água estéril. Os fragmentos foram macerados por 3 min. Em seguida, os tubos eppendorfs foram submetidos à agitação em Mini-Beadbeater a 1500 rpm, por 40 s. Do macerado dos três primeiros fragmentos, enumerados a partir da base da haste, transferiu-se uma alíquota de 20 µL para um poço de uma placa de Elisa contendo 180 µL de água esterilizada. Com a suspensão obtida do primeiro fragmento efetuaram-se três diluições (10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³), com a suspensão obtida a partir do segundo fragmento, duas diluições (10⁻¹ e 10⁻²) e com a do terceiro fragmento, uma diluição (10⁻¹). Para os demais fragmentos não foram realizadas diluições da suspensão obtida após a maceração e agitação dos fragmentos. Aliquotas de 10 µl de cada diluição/suspensão foram transferidas para meio de Kado & Heskett (1970) em placas de Petri. Após 24 h de incubação, a 28 °C, no escuro, quantificou-se o número de unidades formadoras de colônias (ufc). A colonização bacteriana foi expressa em ufc/g de tecido fresco. Para cada clone, empregaram-se 10 repetições, cada uma constituída de uma muda, e, para cada fragmento, cinco repetições por diluição. O

experimento foi analisado em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial, composto dos fatores clone e posição de retirada do fragmento.

Substrato de enraizamento infestado artificialmente como fonte de inóculo

Objetivou-se determinar se o substrato de enraizamento pode constituir fonte de inóculo de *R. solanacearum*. O inóculo bacteriano foi produzido em meio sólido de Kado & Heskett (1970) a 28 °C. Após 48 h de incubação, procedeu-se à raspagem das colônias em solução salina (NaCl a 0,85%) e ajustou-se a concentração de inóculo, por espectrofotometria ($OD_{540} = 0,2$ Abs), para aproximadamente 1×10^8 ufc/mL. A infestação do substrato, constituído de casca de arroz carbonizada, vermiculita de granulometria média e composto de casca de pinus (1:1:1), foi realizada na proporção de 0,1 mL de inóculo por cm^3 de substrato. O substrato da testemunha foi umedecido com água esterilizada em igual proporção. Com o substrato infestado preencheram-se tubetes de 50 mL de capacidade, os quais foram dispostos em bandejas. Estacas de aproximadamente 10-12 cm de comprimento, de cinco clones de eucalipto (*E. urophylla* x *E. grandis*), colhidas de jardim clonal, foram postas para enraizar no substrato infestado, sob nebulização intermitente de água. Após 30 dias, avaliaram-se o número de estacas enraizadas e a ocorrência de infecções bacterianas (método de detecção descrito anteriormente) em estacas não enraizadas. As mudas obtidas foram aclimatadas à sombra (50 %) por 30 dias e avaliadas aos 30 dias após a aclimação, quanto à presença de infecções bacterianas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, constituído, para cada clone, de seis repetições de 20 estacas por tratamento.

Enraizamento e índice de produtividade de minicepas doentes

Mensalmente, de fevereiro de 2004 a fevereiro de 2005, determinou-se o enraizamento médio. Para os três últimos meses desse período, calculou-se o índice de produtividade (IP), definido pelo produto do enraizamento médio e do número de miniestacas produzido por minicepa. O monitoramento foi realizado para sete clones de

eucalipto, estabelecidos em minijardins distintos. As avaliações foram realizadas por censo em todo o minijardim e para todos os lotes de produção de mudas.

Análises estatísticas

Os dados dos experimentos sobre colonização bacteriana e do substrato de enraizamento como fonte de inóculo foram submetidos, separadamente, à análise de variância (ANOVA), empregando-se o teste F, a 5% de probabilidade. Posteriormente, a comparação entre as médias das variáveis qualitativas foi realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SAEG (Euclides, 1997).

RESULTADOS

Deteccão do patógeno nas diferentes fases de produção de mudas

Considerando-se as avaliações quanto à presença de *R. solanacearum* em minicepas, o patógeno não foi detectado apenas nos clones C1 (Minijardim 01) e C3 (Minijardins 04 e 09). Para os demais clones, independentemente da existência de sintomas externos, comprovou-se a presença de infecções bacterianas, porém, geralmente, com menor incidência para as minicepas sem sintomas (Tabela 1).

Evidenciou-se menor ocorrência de *R. solanacearum* em miniestacas coletadas a partir de minicepas assintomáticas, principalmente na parte apical da brotação. Para todos os clones avaliados, exceto o C2, cujas miniestacas apicais também apresentavam infecção. Para minicepas sintomáticas, em geral, houve tendência de redução na ocorrência de infecções bacterianas da base para o ápice da brotação (Tabela 2).

Em miniestacas não enraizadas, coletadas na casa de enraizamento, constatou-se a ocorrência do patógeno em todos os clones amostrados, com 100% de incidência para os clones C2, C4 e C5 (Tabela 3). Analogamente, houve exsudação bacteriana a partir de mudas de todos os clones avaliados. A menor intensidade da doença foi observada

para os clones C3 e C1, para os quais não foram constatadas infecções em minicepas. Os clones mais afetados foram o C2 e C6 (Tabela 3).

Colonização bacteriana de mudas clonais

Não houve diferença entre os clones avaliados quanto à extensão de colonização, sendo a presença de bactéria, em geral, confirmada em até 25% da altura total da muda, a partir da região do coleto. Todavia, houve diferença entre os clones quanto à colonização bacteriana, que, em média, variou de 7×10^3 a $2,7 \times 10^6$ ufc/g de tecido fresco. Os clones com menor colonização foram o C7, C3 e C1 e os com maior nível populacional da bactéria nos tecidos o C2, C4 e C6 (Figura 1).

Substrato de enraizamento infestado artificialmente como fonte de inóculo

O índice de enraizamento variou de acordo com a presença ou ausência da bactéria no substrato. Diferentemente do clone C3, nos clones C2, C4 e C5 ocorreu menor enraizamento em substrato infestado. Para o clone C1 não houve diferença quanto ao enraizamento para as mudas produzidas em substrato infestado ou não por *R. solanacearum*. A ocorrência da bactéria variou entre 80 e 98% em miniestacas não enraizadas. Nas mudas obtidas, a incidência da doença chegou a 100% para o clone C2 (Tabela 4).

Enraizamento e índice de produtividade de minicepas doentes

O enraizamento médio variou de acordo com a época e o clone de eucalipto, tendo ocorrido, a partir do mês de novembro de 2004, redução acentuada no índice, principalmente para cinco dos sete clones avaliados. Para os clones C1 e C3, cujas minicepas encontravam-se livres da doença, não houve redução do enraizamento. Entre fevereiro e outubro de 2004, o índice de enraizamento variou de 60 a 90%. No final do

período monitorado, o índice de enraizamento foi de 15, 17 e 19% para os clones C2, C4 e C7, respectivamente (Figura 2A).

Conforme ocorrido com o enraizamento, o índice de produtividade foi menor para os clones sabidamente infectados pelo patógeno no minijardim. Ao final do período de monitoramento, para os clones mais afetados (C2, C4 e C7) ocorreu redução de até quatro vezes no índice de produtividade (Figura 2B).

DISCUSSÃO

Segundo os resultados, a ausência de sintomas externos da doença não se correlaciona à sanidade de minicepas ou de mudas. Nesse último caso, mesmo para uma colonização de 25% do total da parte aérea e com uma população bacteriana igual ou superior a 7×10^3 ufc/g de tecido fresco, as mudas de eucalipto, para diferentes clones de eucalipto, não desenvolveram o sintoma de murcha, que é típico da doença causada por *R. solanacearum*. Assim, há alto risco de introdução involuntária do patógeno, seja em viveiro, seja em campo, por meio de mudas contaminadas assintomáticas. Aparentemente, a murcha bacteriana apresenta desenvolvimento lento em eucalipto, cuja colonização pelo patógeno e expressão dos sintomas parecem depender das condições de ambiente e da predisposição ou debilitação fisiológica do hospedeiro. Em minijardim clonal, é possível que os sintomas externos da doença sejam expressos somente em períodos mais quentes do ano, em minicepas submetidas a coletas intensas de brotações e, ou, com sistema radicular malformado.

A colonização bacteriana (7×10^3 a $2,7 \times 10^6$ ufc/g de tecido fresco) de mudas de eucalipto foi inferior ao normalmente encontrado para outras plantas hospedeiras. Em tomateiro, por exemplo, nos vasos do xilema, a população bacteriana atinge rapidamente níveis populacionais superiores a 10^{10} ufc/g de tecido fresco, concomitantemente ao aparecimento do sintoma de murcha, seguido da morte da planta (Genin & Boucher, 2002; Denny, 2000). Em eucalipto, além da baixa colonização, observou-se que nem mesmo os sintomas de murcha e de morte das plantas infectadas tendem a desenvolver, o que pode estar relacionado com as diferenças da parede celular de plantas lenhosas em relação a plantas arbustivas.

A produção de mudas de eucalipto, por meio da miniestaquia, apresenta inúmeras vantagens econômicas e operacionais (Alfenas et al., 2004). Contudo, ficou comprovado que por este sistema de produção, *R. solanacearum* é facilmente multiplicada e transmitida para as mudas via enraizamento de miniestacas infectadas, obtidas de minicepas doentes. Adicionalmente, existe o risco de contaminação dos propágulos vegetativos livres da doença ao longo do processo de produção de mudas. Nessa última afirmação, são levados em consideração os resultados obtidos quanto à avaliação do substrato de enraizamento como fonte de inóculo e da presença de mudas infectadas dos clones C3 e C1, para os quais foi comprovado não haver contaminação das minicepas. No primeiro caso, acredita-se que o patógeno foi capaz de infectar as miniestacas a partir de sua base, a qual, após seccionada, apresenta grande área para penetração da bactéria. No caso de clones livres da doença no minijardim, acredita-se que as mudas tenham apresentado a doença, mesmo que em menor intensidade (30 a 40%), devido à contaminação das miniestacas, seja no momento da coleta, por meio de tesouras de poda contaminadas previamente em outros minijardins, seja durante o armazenamento dos propágulos vegetativos em recipientes contaminados.

No setor florestal, ainda são escassos os estudos sobre transmissão de doenças vasculares por ferramentas de poda. No entanto, para culturas agrícolas, em ambiente protegido (estufas), sabe-se que as medidas de sanitização são importantes no manejo integrado, considerando diferentes patossistemas (Vida et al., 2004; Ventura & Costa, 2002; Zambolim et al., 1997). Vida et al. (2004) observaram que a desinfestação de tesouras de poda, em hipoclorito de sódio (2%), resultou em controle satisfatório da podridão gomosa, causada por *Didymella bryoniae* Auersew em cultivo protegido de melão rendilhado. Com base em informações em outros sistemas, em geral, temperaturas acima de 90 °C, por no mínimo 3 seg, têm resultado em controle de vários patógenos (Ehret et al., 2001; Runia et al., 1988). Sendo assim, é aconselhável a desinfestação de tesouras e de recipientes utilizados durante o preparo de miniestacas para enraizamento. Contudo, ainda não existem informações sobre o binômio temperatura e tempo de exposição letal a *R. solanacearum*.

De forma geral, observou-se menor incidência de infecções bacterianas em miniestacas apicais, principalmente para propágulos coletados de minicepas sem sintomas externos da doença. O objetivo inicial desta avaliação foi avaliar se na posição apical das brotações seria possível obter propágulos livres da doença. Todavia, pelos

resultados, não existe garantia da sanidade de miniestacas apicais. Desse modo, o mais seguro é realizar a limpeza clonal, a partir de técnicas de micropropagação, em meios de cultivo que não contenha antibióticos, a fim de evidenciar possíveis contaminações bacterianas. Além disso, há bactérias endofíticas em eucalipto, as quais podem ser confundidas com *R. solanacearum*.

A colonização bacteriana em mudas variou de acordo com o clone de eucalipto, o que pode estar relacionado principalmente ao nível de resistência e ao tempo de colonização. Assim, em trabalhos futuros é necessário determinar se existem diferenças genéticas relacionadas com a capacidade de colonização bacteriana ou se as diferenças observadas nesse trabalho são atribuídas apenas ao período de colonização. Avaliações do nível de resistência para eucalipto, devido à natureza sistêmica da doença, foram realizadas de forma qualitativa (Dianese & Dristig, 1993; Li & Wu, 1996).

As recentes constatações da murcha bacteriana em viveiros clonais em várias regiões do país indicam que água, mudas infectadas e, ou, areia contaminada podem constituir fontes potenciais de inóculo primário em minicepas clonais. Como se sabe, os sistemas hidropônicos, os quais são similares ao minijardins em leito de areia, com freqüentes fertirrigações, embora apresentem inúmeras vantagens, são favoráveis a disseminação de vários patógenos (Savvas, 2003). A água de irrigação (Newman, 2004) ou dos sistemas fechados de hidroponia (Ehret et al., 2001) é um dos veículos mais eficientes de disseminação para vários patógenos. Atualmente, existem diferentes métodos de tratamento, que podem ser assim divididos: i) tratamento térmico (pasteurização); ii) tratamento químico; iii) radiação ultravioleta; e iv) filtração. Para minijardins clonais de eucalipto, é importante considerar estas possibilidades de tratamento de água para prevenção de introdução do patógeno. Para estabelecimento dos canaletões, acredita-se que, idealmente, a areia deva ser desinfestada ou proveniente de jazidas e não coletadas em rio ou outros mananciais a céu aberto. Em relação às minicepas, estas devem ser formada a partir de mudas livres da bactéria, obtidas preferencialmente por cultura de tecidos.

Embora não tenha sido avaliado neste trabalho, é possível que plantas daninhas, que ocorrem normalmente em leitos de areia de viveiros clonais de eucalipto, sejam também importantes fontes de inóculo ou que garantam a sobrevivência da bactéria. *R. solanacearum* pode sobreviver por longos períodos, na forma de células viáveis, mas não cultiváveis (Grey & Steck, 2001), em associação com a matéria orgânica e plantas

daninhas. Embora saiba que *R. solanacearum* pode associar ao sistema radicular de plantas daninhas, há pouca informação acerca das espécies botânicas hospedeiras (Quezado-Soares & Lopes, 1994). Quanto aos níveis de suscetibilidade ao patógeno, as plantas daninhas podem ser altamente suscetíveis e evidenciar sintomas típicos de murcha bacteriana, como no caso de *Crassocephalum crepidioides* (Benth) S. Moore (Asteraceae); ser tolerantes e evidenciar poucos sintomas de murcha, como *Portulaca oleracea* L. (Portulacaceae); e, além do mais, há crescente evidência de hospedeiras, que, sob determinadas condições, permanecem assintomáticas ou com leves sintomas de infecção, por exemplo *Solanum carolinense* L. (Hayward, 1994; Tussime, 1997). Ademais, para certas hospedeiras, observam-se variações quanto ao aparecimento de sintomas (Miranda et al., 2004).

Ralstonia solanacearum pode ser disseminada dentro e entre países por solo, água e materiais para plantio com infecção latente (Ciampi et al., 1980; Hayward, 1991). Entre viveiros comerciais de eucalipto, é comum a permuta de material genético, o que aumenta o risco de introdução do patógeno de um viveiro para outro. Assim, é importante estabelecer protocolos de detecção da bactéria para certificação da sanidade de mudas clonais, bem como para substrato de enraizamento, uma vez que se comprovou que esse tipo de material pode funcionar como fonte de inóculo. Existem várias técnicas para detecção de *R. solanacearum* em material vegetal e solo. A técnica mais comum, mas menos sensível, consiste no cultivo do patógeno em meio de cultura diferencial (Kelman, 1954; Granada & Sequeira, 1981; Engelbrecht, 1994). Outras técnicas ainda incluem o uso de métodos sorológicos (ELISA ou imunofluorescência) (Janse, 1988; Robinson, 1993) ou testes de patogenicidade em plantas hospedeiras (Graham & Lloyd, 1978). Geralmente, estas técnicas são inadequadas, em termos de especificidade, sensibilidade de detecção e do tempo necessário, especialmente para detecção da bactéria a partir do solo. A amplificação de DNA, entretanto, oferece várias vantagens em relação às técnicas clássicas (Poussier et al., 2002). Há diversos protocolos de PCR (Polymerase Chain Reaction) e diferentes oligonucleotídeos a partir da região 16S e 23S rRNA descritos para diagnose e, ou, identificação de *R. solanacearum* (Seal et al., 1993; Elphinstone et al., 1996; Opina et al., 1997; Boudazin et al., 1999; Pastrok & Maiss, 2000; Poussier & Luisetti, 2000; Weller et al., 2000; OEPP/EPPO, 2004), os quais podem ser utilizados para detecção do patógeno a partir

de diferentes substratos naturais (água, solo, semente e plantas) (Poussier et al., 2002; Caruso et al., 2003).

Fatores ecológicos como temperatura e umidade do substrato e do ar podem limitar o desenvolvimento da murcha bacterina (Supriadi et al., 2001). Em minijardim clonal, além da manutenção de alta umidade da areia nos leitos dos canaletões, decorrente das freqüentes fertirrigações, ficou evidenciada a ocorrência de altas temperaturas na superfície da areia, em torno de 56 °C (dados não publicados). Em geral, temperaturas superiores a 46 °C causam injúrias em raízes finas e em pêlos absorventes, podendo favorecer a penetração de *R. solanacearum* através de ferimentos e nos locais de emergência de raízes secundárias. Após a penetração, a bactéria coloniza os espaços intercelulares do córtex da raiz e do parênquima vascular, culminando com a desestruturação das paredes celulares, o que facilita, em uma segunda etapa, a disseminação pelo sistema radicular (Vasse et al., 1995). Acredita-se que a disseminação da bactéria para o substrato ocorra pela morte das raízes ocasionada pela infecção bacteriana ou coleta de brotações das minicepas.

De forma conclusiva, comprovou-se, neste trabalho, a transmissão de *R. solanacearum* por meio de mudas clonais, a partir de duas fontes de inóculo (brotações de minijardim clonal e substrato de enraizamento), bem como os efeitos negativos das infecções bacterianas sobre a produtividade de minijardins clonais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G., SARTÓRIO, R.C., BINOTI, D.H.B., SILVA, R.R., LAU, D. & VANETTI, C.A. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. Fitopatologia Brasileira. 2006 (no prelo).
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.Â,V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Imprensa Universitária. 442p. 2004.
- BOUDAZIN, G., LE ROUX, A.C., JOSI, K., LABARRE, P., JOUAN, B. Design of division of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and amplification to the identification of European isolates. European Journal of Plant Pathology 105:373-380. 1999.
- CARUSO, P., BERTOLINI, E., MARIANO, C. & LÓPEZ, M.M. A new sensitive co-operational polymerase chain reaction for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. Journal of Microbiological Methods 55:257-272. 2003.
- CIAMPI, L., SEQUEIRA, L. & FRENCH, E.R. Latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. Am. Potato J. 57:377-386. 1980.
- DENNY, T.P. *Ralstonia solanacearum* – a plant pathogen in touch with its host. Trends in Microbiology. (8)11:486-489. 2000.
- 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, Kaoshiung, Taiwan. 28-31 october 1992. ACIAR Proc. (45):206-210. 1993.
- EHRET L.D., ALSINIUS B., WOHANKA W., MENEZIES G.J. & UTKHEDE R. Disinfestation of recirculating nutrient solutions in greenhouse horticulture. Agronomie 21:323-339. 2001.
- 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 26:663-678. 1996.
- ENGELBRECHT, M.C. Modification of a semi selective medium for isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. ACIAR Bacterial Wilt Newsletter 10:3-5. 1994.

- EUCLYDES, R.F. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análises Estatística e Genética). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 150p.
- GENIN, S. & BOUCHER, C. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Molecular Plant Pathology*. 3(3):111-118. 2002.
- GRAHAM, J. & LLOYD, A.B. An improved indicator plant method for the detection of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in soil. *Plant Disease Reporter* 62:35-37. 1978.
- GRANADA, G.A. & SEQUEIRA, L. A selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 71:220. 1981. (Abstract).
- GREY, B.E. & STECK, T.R. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied Environmental Microbiology*. 67:3866-3872. 2001.
- HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review Phytopathology* 29:65-87. 1991.
- HAYWARD, A.C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward, A.C. e Hartman, G.L. (Eds.). *Bacterial wilt: The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International – AVRDC. 1994.
- JANSE, J.O. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptom less potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO*. Bulletin 18:343-351. 1988.
- KADO, E.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969-976. 1970.
- KELMAN, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: a literature review and bibliography. North Caroline Agricultural Experimental Station. Technical Bulletin, 99. 1953.
- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695. 1954.
- LI, H., WU, X.Y. The current status, causes and control of forest diseases in Haiman province. *Tropical Forestry* 24:101-103. 1996.
- LOPES, C.A. Situação da murcha bacteriana no Brasil. In: *Enfermedades bacterianas de la papa. Memórias del taller sobre enfermedades bacterianas de la papa*. CNPH/EMBRAPA-CIP, Brasília, Brasil. 1994.

- LOPES, C.A. & TAKATSU, A. Controle da murcha bacteriana. *Fitopatologia Brasileira*. 22:224-225. 1997 (Resumo).
- LOPES, C.A. Murchadeira da batata. 1º ed. Itapetininga: Associação Brasileira da Batata. 2005. 65p.
- MIRANDA, E.F.O., TAKATSU, A. & UESUGI, C.H. Colonização de raízes de plantas daninhas cultivadas *in vitro* e em vasos por *Ralstonia solanacearum*, biovars 1, 2 e 3. *Fitopatologia Brasileira*. (29)2:121-127. 2004.
- NEWMAN, E.S. Disinfecting irrigation water for disease management. In: Annual conference on pest management on ornamentals, 20, San Jose, California. 2004. 10p.
- OEPP/EPPO. *Ralstonia solanacearum*. Diagnostic protocols for regulated pests. OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34:173-178. 2004.
- 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 Molecular Biology and Biotechnology* 5:19-33. 1997.
- PASTRIK, K.H. & MAISS, E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology* 148:619-626. 2000.
- PEREIRA, L.V. Efeito do controle de plantas daninhas na disseminação do moko da bananeira. *Fitopatologia Brasileira*. 15:203-203. 1990.
- POUSSIER, S., CHÉRON, J.J., COUTEAU, A. & LUISETTI, J. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. *Journal of Microbiological Methods* 51:349-359. 2002.
- POUSSIER, S. & LUISETTI, J. Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissue by nested PCR. *European Journal of Plant Pathology* 106:255-265. 2000.
- QUEZADO-SOARES, A.M. & LOPES, C.A. Murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em duas espécies de plantas daninhas da família Labiatae. *Fitopatologia Brasileira*. 19:581-584. 1994.
- ROBINSON, A. Serological detection of *Pseudomonas solanacearum* by ELISA. In: Hartman, G. L., Hayward, A. C. (Eds.). *Proceedings of the International Bacterial*

- Wilt Symposium, Kaohsiung, Taiwan, October 28-31, 1992. ACIAR Proceedings nº 45. Canberra, Austrália. 1993.
- RUNIA W.T., van Os, E. A., BOLLEN G.J. Disinfection of drainwater from soilless cultures by heat treatment, *Netherlands Journal of Agriculture Science* 36:231-238. 1988.
- SALANOUBAT, M., GENIN, S., ARTIGUENAVE, F., GOUZI, J., MANGENOT, S., ARLAT, M., BILAUT, A., BROTTIER, P., CAMUS, J.C., CATTOLICO, L., CHANDLER, M., CHOISNE, N., CLAUDEL-RENARD, C., CUNNAC, S., DEMANGE, N., GASPIN, G., LAVIE, M., MOISAN, A., ROBERT, C., SAURIN, W., SCHIEX, T., SIGUIER, P., THÉBAULT, P., WHALEN, M., WINCKER, P., LEVY, M., WEISSENBACH, J. & BOUCHER, C.A. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415: 497-502. 2002.
- SAVVAS, D. Hydroponics: A modern technology supporting the application of integrated crop management in greenhouse. *Food, Agriculture e Environment* 1:80-86. 2003.
- SEAL, S.E., JACKSON, L.A.YOUNG, J.P.W., DANIELS, M.J. 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. *J. Gen. Microbiol.* 139:1587-1594. 1993.
- SUPRIADI, KARDEN, M., SITEPU, D. Bacterial wilt disease of woody trees caused by *Pseudomonas solanacearum*: a review. *Jurnal Litbang Pertanian.* 20(3): 106-112. 2001.
- TUSSIME, G., ADIPALA, E., OPIO, F., BHAGSARI, A.S. Weeds as latent hosts of *Ralstonia solanacearum* in highland Uganda: Implications for lowland potato bacterial wilt control. In: *Second International Bacterial Wilt Symposium. Guadeloupe-Antilles Françaises. 22-27 de june. 1997.*
- VASSE, J., FREY, P., TRIGALET, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interaction.* 8:241-251. 1995.
- VENTURA J.A., COSTA, H. Manejo integrado de doenças fruteiras tropicais: abacaxi, banana e mamão. In: Zambolim, L. (Ed.) *Manejo integrado, Fruteiras Tropicais: Doenças e Pragas.* Viçosa: UFV. 2002. p.279-350.

- VIDA, B.J., TESSMANN, J.D., ZAMBOLIM, L. & VERZIGNASSI, R. J. Controle da podridão gomosa em melão rendilhado em cultivo protegido por sanitização de ferramenta de poda. *Fitopatologia Brasileira* 29:626-630. 2004.
- WELLER, S.A., ELPHINSTONE, J.G., SMITH, N.C., BOONHAM, N. & STEAD, D.E. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied Environmental Microbiology* 66:2853-2858. 2000.
- YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., YANO, I., HOTTA, H. & NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiology and Immunology* 39:897-904. 1995.
- ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R., COSTA, H. Controle integrado das doenças de hortaliças. Viçosa: UFV. 1997.

Tabela 1 - Ocorrência de infecções de *Ralstonia solanacearum* em minicepas de clones de eucalipto em diferentes minijardins e quanto à presença ou ausência de sintomas externos

Clone	Minijardim	Data de plantio	Sintomas	Ocorrência (%)
C1	01	04/10/04	Ausentes	0,0
C2	02	28/10/04	Ausentes	86,7
C2	02	28/10/04	Presentes	86,7
C2	03	11/11/04	Ausentes	96,7
C2	03	11/11/04	Presentes	93,3
C3	04	13/10/03	Ausentes	0,0
C4	06	23/02/05	Ausentes	46,7
C4	06	23/02/05	Presentes	100
C5	08	09/12/04	Ausentes	86,7
C5	08	09/12/04	Presentes	93,3
C3	09	07/10/03	Ausentes	0,0
C4	10	29/09/04	Ausentes	83,3
C4	10	29/09/04	Presentes	93,3
C6	11	30/12/04	Ausentes	73,3
C6	11	30/12/04	Presentes	93,3

Tabela 2 - Ocorrência de *Ralstonia solanacearum* em diferentes clones de *Eucalyptus* spp. para miniestacas colhidas em diferentes minijardins e nas três porções da minicepa

Clone	Minijardim	Sintomas	Terço da minicepa	Ocorrência (%)
C2	02	Ausentes	Basal	10,0
			Mediano	0,0
			Apical	10,0
		Presentes	Basal	70,0
			Mediano	60,0
			Apical	50,0
C2	03	Ausentes	Basal	30,0
			Mediano	10,0
			Apical	30,0
		Presentes	Basal	90,0
			Mediano	70,0
			Apical	60,0
C4	06	Ausentes	Basal	20,0
			Mediano	0,0
			Apical	0,0
		Presentes	Basal	70,0
			Mediano	60,0
			Apical	30,0
C5	08	Ausentes	Basal	10,0
			Mediano	20,0
			Apical	0,0
		Presentes	Basal	90,0
			Mediano	80,0
			Apical	60,0
C4	10	Ausentes	Basal	20,0
			Mediano	10,0
			Apical	0,0
		Presentes	Basal	70,0
			Mediano	70,0
			Apical	60,0
C6	11	Ausentes	Basal	10,0
			Mediano	0,0
			Apical	0,0
		Presentes	Basal	90,0
			Mediano	70,0
			Apical	80,0

Tabela 3 - Ocorrência de *Ralstonia solanacearum* em miniestacas não enraizadas oriundas dos diferentes minijardins e em mudas para diferentes clones de *Eucalytus* spp.

Clone	Minijardim	Ocorrência (%)	
		Miniestacas	Mudas
C2	02	100	90,0
C2	03	100	-
C6	11	80,0	90,0
C4	06	60,0	60,0
C4	10	100	-
C5	08	100	80,0
C7	-	-	70,0
C3	04	-	30,0
C1	01	-	40,0

Tabela 4 - Índice de enraizamento (E), porcentagem de estacas não enraizadas (ENE) e de mudas assintomáticas (MA) com a presença de infecções de *Ralstonia solanacearum*

Clone	E (%)*		ENE (%)	MA (%)
	Testemunha	Infestado		
C1	9,4 a	10,4 a	79,8	87,5
C2	69,8 a	20,8 b	86,2	100
C3	11,4 b	43,8 a	98,3	93,5
C4	68,7 a	21,9 b	89,5	87,5
C5	32,3 a	13,5 b	92,9	60,0

*Médias de enraizamento comparadas pelo teste t, a 5% de probabilidade de erro.

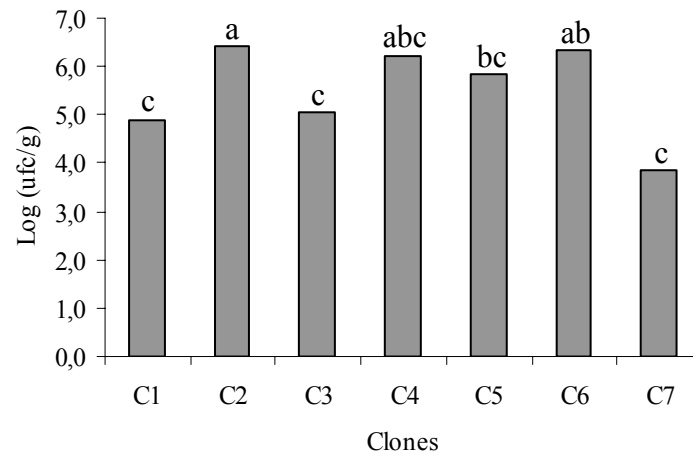
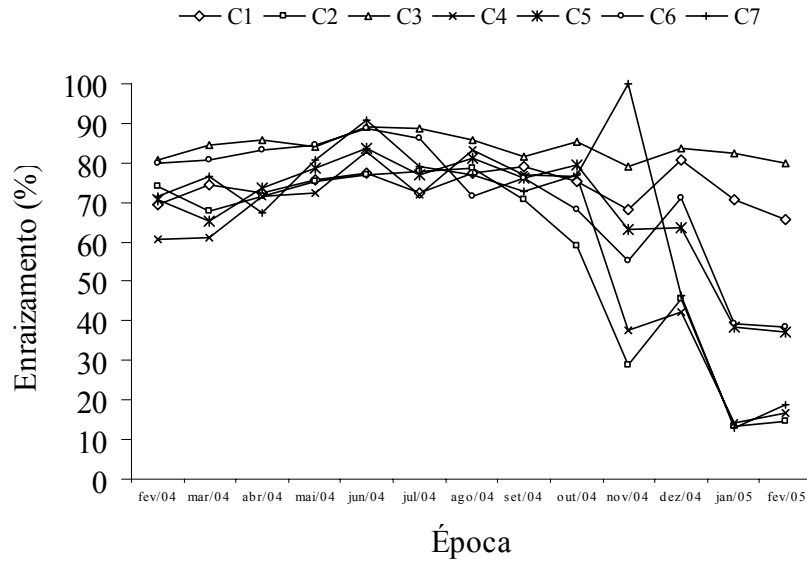


FIG. 1 - Colonização de *Ralstonia solanacearum* em mudas de diferentes clones de eucalipto. Barras sob a mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A



B

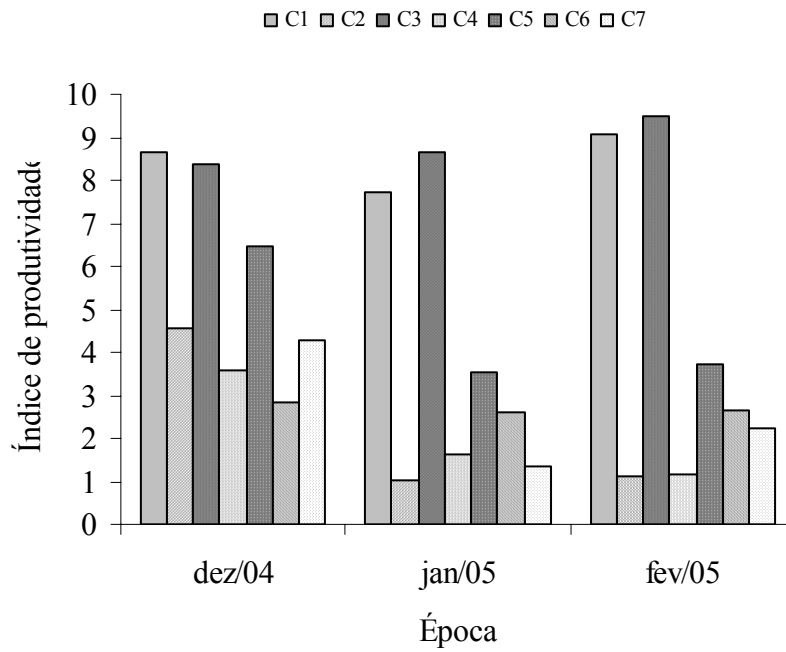


FIG. 2 - Índice de enraizamento (A) e de produtividade (B) de sete clones comerciais de eucalipto, em função do tempo de monitoramento.

Desenvolvimento de Protocolo e Avaliação da Resistência de *Eucalyptus* spp. à Murcha Bacteriana, Causada por *Ralstonia solanacearum*

RESUMO

Objetivou-se, nesse trabalho, desenvolver um protocolo e avaliar a resistência interespecífica de *Eucalyptus* spp. à murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*. Em uma primeira etapa, testaram-se métodos de inoculação da bactéria em mudas de quatro clones de eucalipto, produzidas e mantidas em tubetes de 55 cm³ de capacidade, bem como por transplante das mudas para um infectário. Os métodos testados de inoculação em mudas em tubetes foram: i) aplicação de 5 mL de inóculo na região do coleto; ii) corte de 1/3 do sistema radicular e imersão das raízes, por 1 min, em suspensão de inóculo; e iii) ferimento do coleto com o auxílio de um estilete e aplicação de 5 mL de inóculo nessa região. A concentração de inóculo foi ajustada para 10⁸ ufc/mL. O infectário foi desenvolvido de forma similar ao sistema de minijardim utilizado em viveiros de eucalipto, composto basicamente de calhas de fibrocimento, contendo areia. A infestação do infectário foi realizada em intervalos de 15 dias, com uma suspensão de inóculo ajustada para 10⁸ ufc/mL, na proporção de 0,25 L/m³ de areia. O transplante das mudas (60 dias de idade) foi realizado após o corte de 1/3 da porção basal do sistema radicular. A infecção bacteriana foi avaliada quatro meses após o transplante. Dentre os métodos de inoculação testados, o transplante das mudas para o infectário mostrou ser o mais eficiente, cuja frequência de infecção variou de 81 a 100%, dependendo do clone de eucalipto. Na segunda fase, avaliou-se a resistência interespecífica. Todas as espécies testadas foram suscetíveis à doença, mas a frequência de genótipos infectados variou de acordo com a espécie. *E. tereticornis* e *E. grandis* apresentaram, respectivamente, o menor (33,3%) e o maior (91,7%) percentual de genótipos suscetíveis. As demais espécies, *E. saligna*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis* e *E. dunnii*, exibiram entre 52 e 65% de plantas suscetíveis.

Palavras-chave adicionais: Eucalipto, infectário, seleção de genótipos.

INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana do eucalipto, causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi *et al.* (1995), é uma doença importante para a cultura. O patógeno é uma bactéria cosmopolita, variável, vascular e que se associa ao sistema radicular de várias plantas cultivadas e daninhas, em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Lopes & Takatsu, 1997). O patógeno causa doença em mais de 200 espécies de, aproximadamente, 50 famílias botânicas (Hayward, 1991; Hayward, 2000). A gama de hospedeiros inclui não somente solanáceas, mas também leguminosas, monocotiledôneas e várias espécies arbóreas (Supriadi *et al.*, 2001). Somado a essas características, a falta de conhecimentos básicos sobre ecologia e evolução do patógeno dificulta o seu controle (Kelman, 1953; Lopes, 1994).

A murcha bacteriana do eucalipto foi relatada, pela primeira vez, no início da década de 1980 (Sudo *et al.*, 1983). Além de ocorrer no Brasil, a doença já foi constatada nas principais regiões eucaliptocultoras do mundo, como China (Wu & Liang, 1988a), Taiwan (Wang, 1992), Indonésia (Alfenas, 1993), Austrália (Askiew *et al.*, 1994), Venezuela (Ciesla *et al.*, 1996) e África do Sul (Coutinho *et al.*, 2000). Na China, *E. urophylla* Blake, *E. tereticornis* Smith, *E. camaldulensis* Dehnh. e híbridos de *E. grandis* Hill ex Maiden \times *E. urophylla* ou *E. urophylla* \times *E. grandis* têm sido os materiais mais suscetíveis. Sob condições de infecção natural, *E. grandis*, *E. pellita* F. Muell., *E. propinqua* Deane & McKie e *E. saligna* Smith são as espécies mais suscetíveis (Wu & Liang, 1988b). No Brasil, há vários estudos para selecionar genótipos de eucalipto resistentes (Dianese & Takatsu, 1985; Cruz & Dianese, 1986; Dianese *et al.*, 1990). Dianese *et al.* (1990), por exemplo, selecionaram genótipos, os quais foram classificados pelos autores como tolerantes, em *E. deglupta* Blume, *E. pellita* e *E. tereticornis* Smith para o biovar 1 do patógeno. Dianese & Dristig (1993) obtiveram diferenciação de genótipos, também classificados pelos autores como tolerantes (*E. camaldulensis*, *Corymbia citriodora* (Hook.) Hill & Johnson, *E. cloeziana* F. Muell., *E. deanei* Maiden, *E. pellita*, *E. resinifera* Smith e *E. tereticornis*) e resistentes (*E. grandis* e *C. torelliana* (F. Muell) Hill & Johnson) à murcha bacteriana.

Diferentes métodos de inoculação foram desenvolvidos para avaliação da resistência de *Eucalytus* à murcha bacteriana (Dianese & Takatsu, 1985; Cruz & Dianese, 1986; Dianese *et al.*, 1990; Coutinho *et al.*, 2000). Ainda, com a utilização

desses métodos, raramente reproduziram-se os sintomas da doença (dados não publicados). Ademais, com a produção de mudas de eucalipto em recipientes do tipo tubetes (Alfenas *et al.*, 2004) e com a constatação da doença em minijardins clonais (Alfenas *et al.*, 2006), onde prevalecem condições mais favoráveis à murcha bacteriana (temperatura e umidade elevadas, alta disponibilidade de nutrientes e mortalidade de raízes), acredita-se que é possível desenvolver um método mais eficiente de inoculação do patógeno, empregando-se um infectário que simule as condições de minijardim clonal. Assim, objetivou-se nesse trabalho desenvolver um protocolo e avaliar a resistência do eucalipto à murcha bacteriana.

MATERIAL E MÉTODOS

Monitoramento das condições climáticas

Os experimentos foram realizados entre início de setembro e final de dezembro. Nesse período, monitoraram-se as condições climáticas diariamente, em intervalos de 30 min. Coletaram-se dados de temperatura (mínima, média e máxima) e umidade relativa do ar, com o auxílio de um coletor automático de dados (Modelo CR-10X, Campbell Scientific Inc. Logan, UT, USA).

Isolado do patógeno e preparo do inóculo

Empregou-se o isolado UFV 34 de *R. solanacearum*, obtido de *E. grandis*, proveniente da região de Eunápolis, Bahia. Para produção de inóculo da bactéria, realizou-se a multiplicação inicial do patógeno a partir da coleção do Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, cujas culturas são mantidas em água destilada esterilizada (Wakimoto *et al.*, 1982). O isolado foi selecionado em meio de Kelman com cloreto de tetrazólio (Kelman, 1954) e caracterizado, previamente, como pertencente à biovar 1, segundo Hayward, 1991. A multiplicação da bactéria foi

realizada em meio sólido de Kado & Heskett (1970) a 28 °C, por 24 h. A concentração de inóculo foi ajustada por espectrofotometria ($OD_{540} = 0,2$ Abs), para 10^8 ufc/mL.

Produção das mudas clonais e seminais de eucalipto

As mudas de eucalipto (clonais e seminais) foram produzidas em tubetes de 55 cm³ de capacidade, com substrato composto da mistura de casca de arroz carbonizada, vermiculita de granulometria média e substrato comercial (MecPlant[®]) (1:1:1). As mudas foram inoculadas ou transplantadas para o infectário com 60 dias de idade. Os clones de eucalipto testados foram C1 (híbrido natural de *E. urophylla*), C2, C3 e C4 (híbridos de *E. urophylla* x *E. grandis*).

Estrutura, infestação e manutenção do infectário

O infectário foi construído com calhas de fibrocimento (Canalete 49, Eternit[®]), de forma similar ao sistema de minijardim clonal empregado para eucalipto. As calhas possuem dimensões de 181 mm de altura, largura variando de 191 (parte interna) a 490 mm (parte superior) e comprimento de 2000 mm (Figura 1). As calhas foram dispostas lateralmente sobre suportes de alvenaria (0,5 m de altura) com inclinação no sentido longitudinal, de 1% em direção ao dreno, instalado no final da calha. O interior das calhas foi recoberto por filme plástico transparente, sob o qual foi adicionada uma camada de aproximadamente 5 cm de brita nº 2. Posteriormente, recobriu-se a camada de brita nº 2 com tela sombrite (50%) e, finalmente, sobre a tela sombrite completou-se o espaço disponível com areia, previamente esterilizada.

A manutenção da população bacteriana no substrato do infectário foi mantida por infestações, realizadas em intervalos de 15 dias, com uma suspensão de inóculo ajustada para $10^8 \pm 100$ ufc/mL. A infestação foi realizada na proporção de 0,25 L/m³ de areia. Em cada calha foram transplantadas quatro mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill 'St. Clara'), com 20 dias de idade, como comparador suscetível.

Transplante e manutenção das plantas no infectário

As mudas de eucalipto foram transplantadas para o infectário com 60 dias de idade, as quais foram dispostas em zigue-zague, com espaçamento de 10 cm entre plantas. Antes do plantio, removeu-se 1/3 da porção basal do sistema radicular das mudas. Após o plantio, realizou-se, diariamente, uma fertirrigação com uma solução nutritiva composta por nitrato de cálcio (23,0 g/L), cloreto de potássio (6,0 g/L), nitrato de potássio (3,5 g/L), monoamônio fosfato (2,4 g/L), sulfato de magnésio (9,1 g/L), tenso ferro (1,3 g/L), ácido bórico (3,5 g/L), sulfato de zinco (0,6 g/L), sulfato de manganês (1,0 g/L), sulfato de cobre (0,125 g/L) e molibdato de sódio (0,05 g/L). A solução nutritiva foi aplicada na proporção de 0,25 L/m³ de areia. Aos 30 dias após o transplantio, realizou-se a poda apical das mudas de eucalipto visando à formação das minicepas, e, subseqüentemente, a cada 15 dias, realizaram-se coletas de brotações, a fim de simular o manejo de minicepas praticado para a obtenção de miniestacas para enraizamento.

Inoculação do patógeno em mudas clonais em tubetes

De forma simultânea ao transplantio das mudas clonais para o infectário, testaram-se três métodos de inoculação em mudas mantidas em tubetes. Os métodos de inoculação empregados foram: i) aplicação de 5 mL de inóculo na região do coleto; ii) corte de 1/3 do sistema radicular e imersão das raízes, por 1 min, em suspensão de inóculo; e iii) ferimento do coleto com o auxílio de um estilete e aplicação de 5 mL de inóculo nessa região. A concentração de inóculo foi ajustada para 10⁸ ufc/mL.

Materiais genéticos de eucalipto avaliados

Empregaram-se quatro clones de eucalipto (3486, 3016, 3281 e 2486) para comparação entre os métodos de inoculação e, para avaliação da resistência interespecífica, as espécies *E. grandis*, *E. saligna*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e *E. dunnii*.

Avaliação das plantas inoculadas

As mudas de eucalipto foram avaliadas quanto à presença de sintomas externos (murcha e morte de plantas) e internos (presença de infecções vasculares). A presença da bactéria nos tecidos vasculares foi confirmada pela avaliação microscópica de exsudação de pus bacteriano. Para isso, três fragmentos (25 mm² de área e espessura de 1 mm) de tecido, retirados da região vascular, foram depositados em uma gota d'água destilada sobre uma lâmina microscópica. Posteriormente, os fragmentos foram observados ao microscópio de luz (40 X e 100 X) e avaliados quanto à presença de exsudação contínua de pus bacteriano.

Delineamento experimental e análises estatísticas

Os métodos de inoculação foram comparados empregando-se, para cada clone de eucalipto, o delineamento inteiramente casualizado, composto por quatro métodos de inoculação (três métodos de inoculação de mudas em tubetes e o método do infectário), além da testemunha. Para cada tratamento, foram realizadas cinco repetições, cada uma constituída de 16 plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o teste F, a 5% de probabilidade. Posteriormente, a comparação entre as médias foi feita por meio de análise de contraste. A avaliação da resistência interespecífica foi realizada para 50 plantas de cada espécie, as quais foram divididas em cinco repetições de 10 plantas.

RESULTADOS

No período de realização dos experimentos, a temperatura média diária variou entre 15 e 25 °C, sendo as maiores temperaturas diárias ocorridas no mês de outubro. A umidade relativa do ar, na maior parte do tempo, foi superior a 80%. Menores valores de umidade relativa foram observados também nesse mês (Figura 2).

Métodos de inoculação do patógeno

Não houve correlação entre a ocorrência de morte ou do sintoma de murcha, típico das doenças causadas por *Ralstonia solanacearum*, com a exsudação de pus bacteriano. Diferentemente dos demais métodos testados, no infectário observaram-se plantas com sintomas de murcha. Independentemente do clone de eucalipto testado, constatou-se maior número de plantas infectadas a partir do transplante das mudas para o infectário. De forma geral, o método de inoculação por aplicação de inóculo na região do coleto não resultou em infecção. Para o clone C4, a inoculação da bactéria após o ferimento do coleto resultou em maior incidência de doença (50%) entre os métodos de inoculação em plantas mantidas em tubetes. Todavia, por meio do transplante das mudas desse clone para o infectário, obteve-se o dobro de incidência da doença (Tabela 1). Não houve exsudação de pus bacteriano a partir das plantas testemunhas.

Resistência interespecífica

Não houve reprodução consistente do sintoma de murcha para as diferentes espécies avaliadas no infectário. Constatou-se, porém, que houve morte de plantas para as espécies *E. dunnii*, *E. grandis* e *E. urophylla*, que foram atribuídas à ocorrência de infecção de *R. solanacearum*. Dentre as espécies, *E. grandis* destacou-se como a mais suscetível à doença, sendo classificada como altamente suscetível. Entretanto, *E. tereticornis* apresentou o maior percentual de genótipos resistentes à murcha bacteriana, sendo classificado como moderadamente resistente (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Na primeira fase deste trabalho, avaliaram-se diferentes métodos de inoculação do patógeno. De forma geral, as inoculações realizadas em mudas contidas em tubetes não resultaram em expressão do sintoma de murcha e exsudação de pus bacteriano. Por outro lado, o transplante das mudas para o infectário resultou em maior intensidade da doença. O sistema de infectário desenvolvido neste estudo difere do normalmente

utilizado, que, em geral, é montado na forma de canteiros de alvenaria contendo solo infestado artificialmente com o patógeno (Araújo *et al.*, 2005; Gava *et al.*, 2002). Acredita-se que a utilização de areia como substrato, aliada às freqüentes fertirrigações, cria condições mais favoráveis para o estabelecimento e multiplicação do patógeno, principalmente em termos de temperatura mais elevada e maior disponibilidade de água e nutrientes. Além disso, as coletas freqüentes de brotações induzem a morte de raízes, o que pode aumentar subseqüentemente as portas de entrada para o patógeno. Como se sabe, a penetração de *R. solanacearum* ocorre através de ferimentos no sistema radicular e, ou, nos locais de emergência de raízes secundárias. Após a penetração, a bactéria coloniza os espaços intercelulares do córtex da raiz e do parênquima vascular, culminando com a desestruturação das paredes celulares, o que facilita, em uma segunda etapa, a disseminação do patógeno para o substrato a partir do sistema radicular (Vasse *et al.*, 1995).

A temperatura é um dos principais fatores ambientais que interfere na interação patógeno-hospedeiro. Temperaturas elevadas favorecem o desenvolvimento da murcha bacteriana, sob condições de campo, bem como a multiplicação de *R. solanacearum* no solo. Para esse patógeno, adaptado em regiões tropicais, a temperatura ótima oscila entre 25 e 35 °C (Kelman *et al.*, 1994; Takatsu & Lopes, 1997). Neste estudo, durante a realização dos experimentos, a temperatura média diária variou de 15 a 25 °C, enquanto a umidade relativa do ar foi superior a 80%, na maior parte do tempo. Tais condições climáticas podem explicar, em parte, a falta de desenvolvimento do sintoma de murcha, que depende de temperaturas mais elevadas e, provavelmente, umidades relativas do ar mais baixas.

A expressão do sintoma de murcha em eucalipto, conforme observado no infectário, aparentemente depende da colonização e, fundamentalmente, das condições de ambiente e, ou, da debilitação das plantas. Após a coleta de brotações, notou-se que algumas plantas com o sintoma de murcha recuperavam-se e emitiam novas brotações. Além disso, geralmente apenas brotações mais próximas do coleto exibiam sintomas de murcha. Tais brotações apresentavam intensa exsudação de pus bacteriano, em contraste com as brotações colhidas em porções mais altas da mesma planta.

As plantas de tomate mantidas no infectário, ao final do período do estudo, continham intensa colonização bacteriana (dados não apresentados). Acredita-se que, por serem muito suscetíveis, a utilização dessas plantas pode aumentar a estabilização

da população bacteriana. Sabe-se que nos vasos xilemáticos do tomatreiro, a população bacteriana rapidamente atinge altos níveis populacionais, superiores a 10^{10} ufc/g de tecido fresco (Denny, 2000; Genin & Boucher, 2002). Em trabalhos futuros, é necessário determinar se o uso dessa planta realmente aumenta a estabilização da população bacteriana, o que pode reduzir a necessidade de realizar constantes re-infestações. Neste trabalho, quinzenalmente, realizaram-se reaplicações de inóculo no infectário, o que depende também de um estudo para otimização dessa prática.

Atualmente, ainda não existem protocolos definidos para avaliação da resistência de eucalipto à murcha bacteriana. Os resultados obtidos indicam que o infectário aqui desenvolvido cria condições favoráveis à infecção. Métodos de seleção de genótipos resistentes à doença foram também desenvolvidos por Dianese & Dristig (1993). Estes autores estabeleceram que inoculações com suspensão de inóculo ajustada para 10^6 ufc/mL, em plantas com 10-12 pares de folhas expandidas, por meio de injeção do inóculo (10 μ L) nas axilas foliares foram consistentes quanto à expressão dos sintomas de murcha e de morte. Embora, por esse método, tenha sido constatada a ocorrência de colonização bacteriana, sem expressão de murcha, conforme observado também por Dianese *et al.* (1990).

De acordo com os dados obtidos, selecionou-se o uso do infectário como sendo o método mais adequado para avaliação da resistência de eucalipto à murcha bacteriana. A avaliação da resistência em infectário apresentou algumas vantagens em relação aos métodos de inoculação em plantas em tubetes, entre elas o maior percentual de incidência da doença para clones suscetíveis, o que garante maior confiabilidade; a facilidade de execução, por meio do transplante de mudas clonais produzidas em tubetes; e a possibilidade de multiplicação de genótipos estabelecidos no infectário, o que confere a esse método a característica de não ser destrutivo. Como desvantagens do uso do infectário, pode-se citar a demanda de maiores cuidados referentes à fertirrigação e coleta de brotações.

Constataram-se variações quanto à frequência de genótipos suscetíveis de eucalipto à murcha bacteriana, conforme previamente observado em outros estudos (Dianese & Takatsu, 1985; Cruz & Dianese, 1986; Dianese *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1996; Li & Wu, 1996; Shi *et al.*, 2000). Dentre as espécies avaliadas, *E. tereticornis* destacou-se por apresentar a maior frequência de genótipos resistentes. Embora não tenha sido avaliado, é possível que existam diferenças quanto aos níveis de resistência entre

diferentes procedências de uma mesma espécie, conforme constatado por Dianese & Dristig (1993). Em trabalhos futuros, é necessário avaliar a estabilidade da resistência, considerando diferentes isolados do patógeno, incluindo pelo menos as biovars 1 (Dianese & Takatsu, 1985) e 3 (Coutinho et al., 2000), identificados para eucalipto no Brasil e África do Sul, respectivamente. Como se sabe, o uso da resistência de plantas para o controle da murcha bacteriana, tanto para espécies agrícolas quanto florestais, é extremamente difícil. A alta variabilidade na população do patógeno, as interações com fatores abióticos e bióticos e a variabilidade quanto à agressividade de isolados locais de *R. solanacearum* afetam a severidade da doença e, possivelmente, a estabilidade da resistência (Mew & Ho, 1977; Prior & Steva, 1990; Darasse et al., 1998; Coelho Neto et al., 2003).

Analogamente ao encontrado por Li & Wu (1996), constatou-se que *E. grandis* apresentou o maior percentual de plantas suscetíveis à doença. Na China, híbridos interespecíficos de *E. grandis* mostram-se altamente suscetíveis (Lin et al., 1996; Shi et al., 2000). No Brasil, acredita-se que a maioria dos clones comerciais também seja suscetível à doença, pois geralmente envolvem cruzamentos com *E. grandis* e *E. urophylla*. Nesse caso, futuramente será necessário avaliar esta hipótese em inoculações realizadas para os clones comerciais.

Desenvolveu-se, neste trabalho, uma nova concepção de infectário para *R. solanacearum*, cujos resultados permitiram concluir que a inoculação do patógeno por este método resultou em maior frequência de infecção. Ademais, todas as espécies testadas foram suscetíveis à doença, mas a frequência de genótipos infectados variou com a espécie, sendo que *E. tereticornis* e *E. grandis* apresentaram, respectivamente, o menor (33,3%) e o maior (91,7%) percentual de genótipos suscetíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. Potential and present status of *Eucalyptus* and *Acacia mangium* diseases in Northern Sumatra. Consultancy Report to P.T. Inti Indorayon Utama Company, Indonesia. 53p. (Relatório Técnico-Científico). 1993.
- ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G., SARTÓRIO, R.C., BINOTI, D.H.B., SILVA, R.R., LAU, D. & VANETTI, C.A. *Ralstonia solanacearum* Em Viveiros Clonais de Eucalipto no Brasil. Fitopatologia Brasileira. 2006 (no prelo).
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa, MG. Imprensa Universitária. 2004.
- ARAÚJO, J.S.P., GONÇALVES, K.S., OLIVEIRA, B.C., RIBEIRO, R.L.D. & POLIDORO, J.C. Efeito do acibenzolar-S-methyl sobre murcha-bacterina do tomateiro. Horticultura Brasileira 23:05-08. 2005.
- ASKIEW, E. & TEVOROW, P.R. Management of bacterial wilt of tobacco. In: Hayward, A.C. & Hartman, G.L. (Eds.). Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB, Wallingford. UK. p. 179-198. 1994
- CIESLA, W.M., DIEKMANN, M. & PUTTER, C.A. *Eucalyptus* spp. FAO/IPGRI. Technical Guide-lines for the safe movement of germplasm, nº 17. Rome, Italy: FAO/IPGRI. 1996.
- COELHO NETO, R.A., PEREIRA, B.G., NODA, H. & BOHER, B. Caracterização de isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de tomateiros em várzea e em terra firme, no Estado do Amazonas. Fitopatologia Brasileira 28:362-366. 2003.
- COUTINHO, T.A., ROUX, J., RIEDEL, K.H., TERBLANCHE, J. & WINGFIELD, M.J. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. Forest Pathology 30:205-210. 2000.
- CRUZ, A.P. & DIANESE, J.C. Tolerância à murcha bacteriana em eucalipto. Fitopatologia Brasileira 11:396. 1986.
- DARRASSE, A., TRIGALET, A. & PRIOR, P. Correlation of aggressiveness with genomic variation in *Ralstonia solanacearum* Race 1. In: Prior, P. & Elphinstone, J. (Eds.). Bacterial Wilt Disease. Molecular and Epidemiological Aspects. Berlin. Springer-Verlag. p.89-98. 1998.
- DENNY, T.P. *Ralstonia solanacearum* – a plant pathogen in touch with its host. Trends in Microbiology 11:486-489. 2000.

- 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. Kaohsiung, Taiwan. ACIAR Proceedings, p.206-210. 1993.
- DIANESE, J.C. & TAKATSU, A. *Pseudomonas solanacearum* biovar 1 isolada de eucalipto em Monte Dourado, Estado do Pará. Fitopatologia Brasileira 10:362. 1985.
- DIANESE, J.C. & TAKATSU, A. *Pseudomonas solanacearum* biovar 1 isolada de eucalipto em Monte Dourado, Estado do Pará. Fitopatologia Brasileira 10:362. 1985.
- DIANESE, J.C., DRISTIG, M.C.G. & CRUZ, A.P. Susceptibility to wilt associated with *Pseudomonas solanacearum* among six species of *Eucalyptus* growing in equatorial Brazil. Australasian Plant Pathology 19:71-76. 1990.
- GAVA, C.A.R., PEREIRA, J.C., FERNANDES, M.C. & NEVES, M.C.P. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira 37:1373-1380. 2002.
- GENIN, S. & BOUCHER, C. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. Molecular Plant Pathology 3:111-118. 2002.
- HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:65-87. 1991.
- HAYWARD, A.C. *Ralstonia solanacearum*. In: Encyclopedia of Microbiology. (Lederberg, J. ED.). vol. 4. San Diego: Academic Press. p.32-42. 2000.
- KADO, E.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969-976. 1970.
- KELMAN, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: a literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experimental Station. Technical Bulletin, n. 99. 1953.
- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44:693-695. 1954.
- LI, H. & WU, X.Y. The current status, causes and control of forest diseases in Haiman province. Tropical Forestry 24:101-103. 1996.

- LIN, X.P., LIN, X.J., WU, G.J., LI, X.X., CAI, J.S. & SU, S.C. The epidemic law of bacterial wilt in *Eucalyptus*. Journal Central South Forestry University 16:49-55. 1996.
- LOPES, C.A. Situação da murcha bacteriana no Brasil. In: Enfermedades bacterianas de la papa. Memórias del taller sobre enfermedades bacterianas de la papa. CNPH/EMBRAPA-CIP, Brasília, Brasil. 1994.
- LOPES, C.A. & TAKATSU, A. Controle da murcha bacteriana. Fitopatologia Brasileira. 22:224-225. 1997 (Resumo).
- MEW, T.W. & HO, W.C. Effect of soil temperature on resistance of tomato cultivars to bacterial wilt. Phytopathology 67:909-911. 1977.
- PRIOR, P. & STEVA, H. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies. Plant Disease 74:13-17. 1990.
- SHI, Z.M., XI, F.S., HE, G.Z., LI, J.H., WANG, S.M., XIAN, S.H. & PENG, S.Y. Studies on selection of *Eucalyptus* for resistance to bacterial wilt and resistance stability. Guangxi Forestry Science 29:1-6. 2000.
- 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 8:631. 1983. (Resumo).
- SUPRIADI, KARDEN, M. & SITEPU, D. Bacterial wilt disease of woody trees caused by *Pseudomonas solanacearum*: a review. Jurnal Litbang Pertanian 3:106-112. 2001.
- TAKATSU, A. & LOPES, C.A. Murcha bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas futuras de controle. Horticultura Brasileira 15:170-177. 1997.
- VASSE, J., FREY, P. & TRIGALET, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. Molecular Plant-Microbe Interaction 8:241-251. 1995.
- WAKIMOTO, S., UTATSU, K., MATSUO, N. & HAYASHI, N. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in pure water. Annals of Phytopathology Society of Japan 48:620-627. 1982.
- WANG, W.Y. Survey of *Eucalyptus* disease in Taiwan. Bull. Taiwan For. Res. Inst. 7, 179-194. 1992.

- WU, Q.P. & LIANG, Z.C. Identification and pathogenic tests of the causal organism of the bacterial wilt of *Eucalyptus*. Journal South China Agriculture University 9:59-67. 1988a.
- WU, Q.P. & LIANG, Z.C. Selection of species and provenance of *Eucalyptus* for resistance to bacterial wilt. Journal South China Agriculture University 9:41-45. 1988b.
- 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. & *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiology and Immunology 39:897-904. 1995.

Tabela 1 - Porcentagem de plantas com exsudação de *Ralstonia solanacearum* para quatro clones de eucalipto submetidos a diferentes métodos de inoculação do patógeno

Método	Clone			
	C1	C2	C3	C4
Aplicação do inóculo na região do coleto	0,0	0,0	0,0	0,0
Imersão de 2/3 das raízes no inóculo	0,0	0,0	18,8	12,5
Ferimento do coleto e aplicação do inóculo	0,0	0,0	12,5	50,0
Média	0,0	0,0	10,4	20,8
Transplante das mudas para infectário	93,8*	81,3*	87,5*	100*

*Valores de porcentagem de infecção significativamente diferentes, por análise de contraste, em relação à média dos demais métodos de inoculação.

Tabela 2 - Índices de mortalidade, infecção e classificação quanto à resistência de diferentes espécies de eucalipto à murcha bacteriana

Espécie	Procedência	Mortalidade (%)	Infecção (%)	Classificação**
<i>E. camaldulensis</i>	VM Florestal MG	0,0 ± 0,0*	62,5 ± 3,7	S
<i>E. dunnii</i>	Klabin Florestal PR	8,3 ± 2,9	64,6 ± 4,5	S
<i>E. globulus</i>	Klabin Florestal PR	8,3 ± 3,5	64,6 ± 4,0	S
<i>E. grandis</i>	Suzano Bahia Sul BA	0,0 ± 0,0	91,7 ± 2,9	AS
<i>E. saligna</i>	Suzano Bahia Sul BA	0,0 ± 0,0	52,1 ± 4,6	S
<i>E. tereticornis</i>	Suzano Bahia Sul BA	0,0 ± 0,0	33,3 ± 2,9	MR
<i>E. urophylla</i>	VM Florestal MG	2,1 ± 2,1	60,4 ± 3,5	S

*Desvio-padrão da média. **Classificação das espécies em: AS - altamente suscetível; S - suscetível; e MR - moderadamente suscetível, com base na frequência de genótipos suscetíveis à doença.

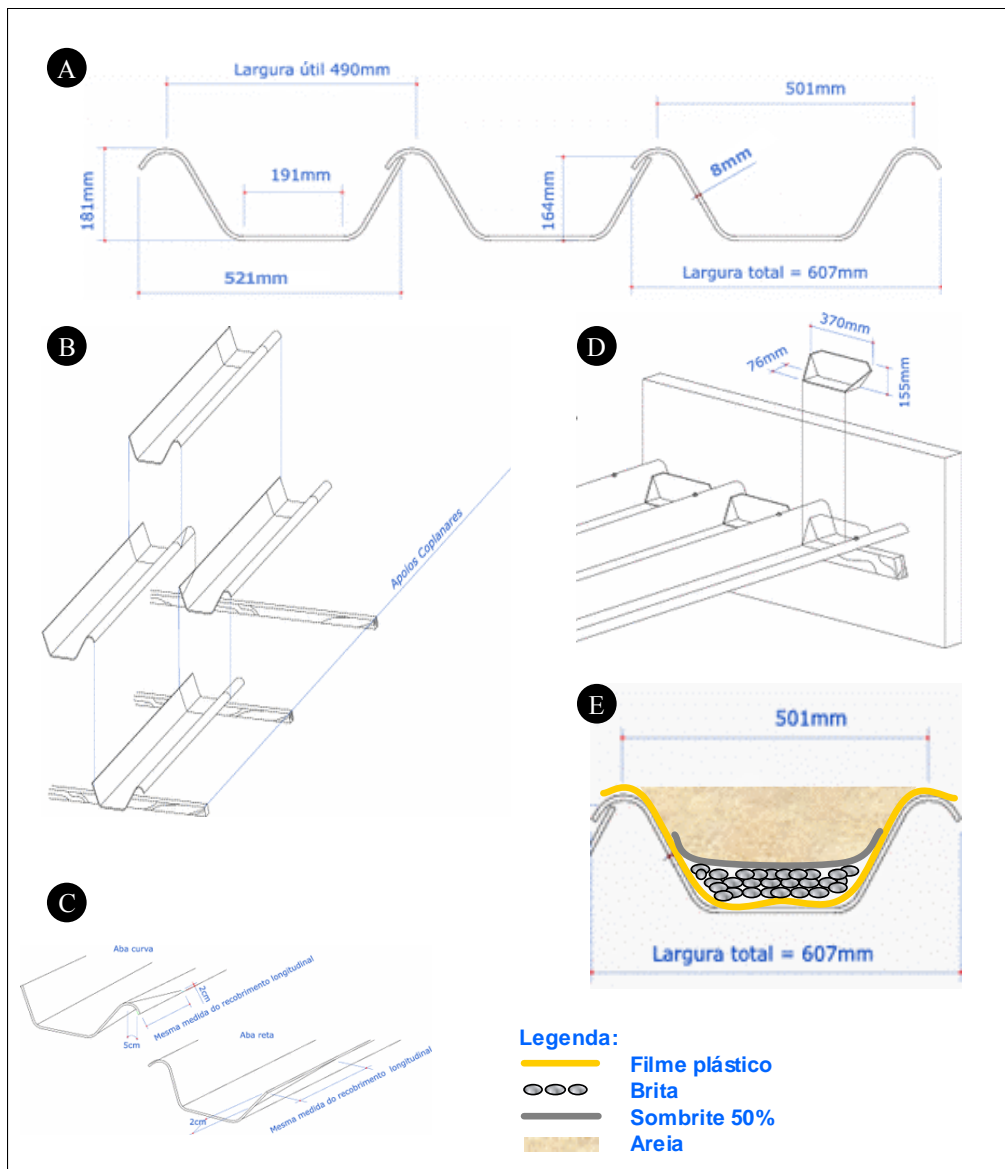


FIG. 1 - Esquema ilustrativo da estrutura do infectário: A - Vista frontal das calhas de fibrocimento com respectivas dimensões; B - Montagem lateral das calhas; C - Detalhe dos encaixes laterais; D - Vedação das extremidades; e E - Preenchimento das calhas.

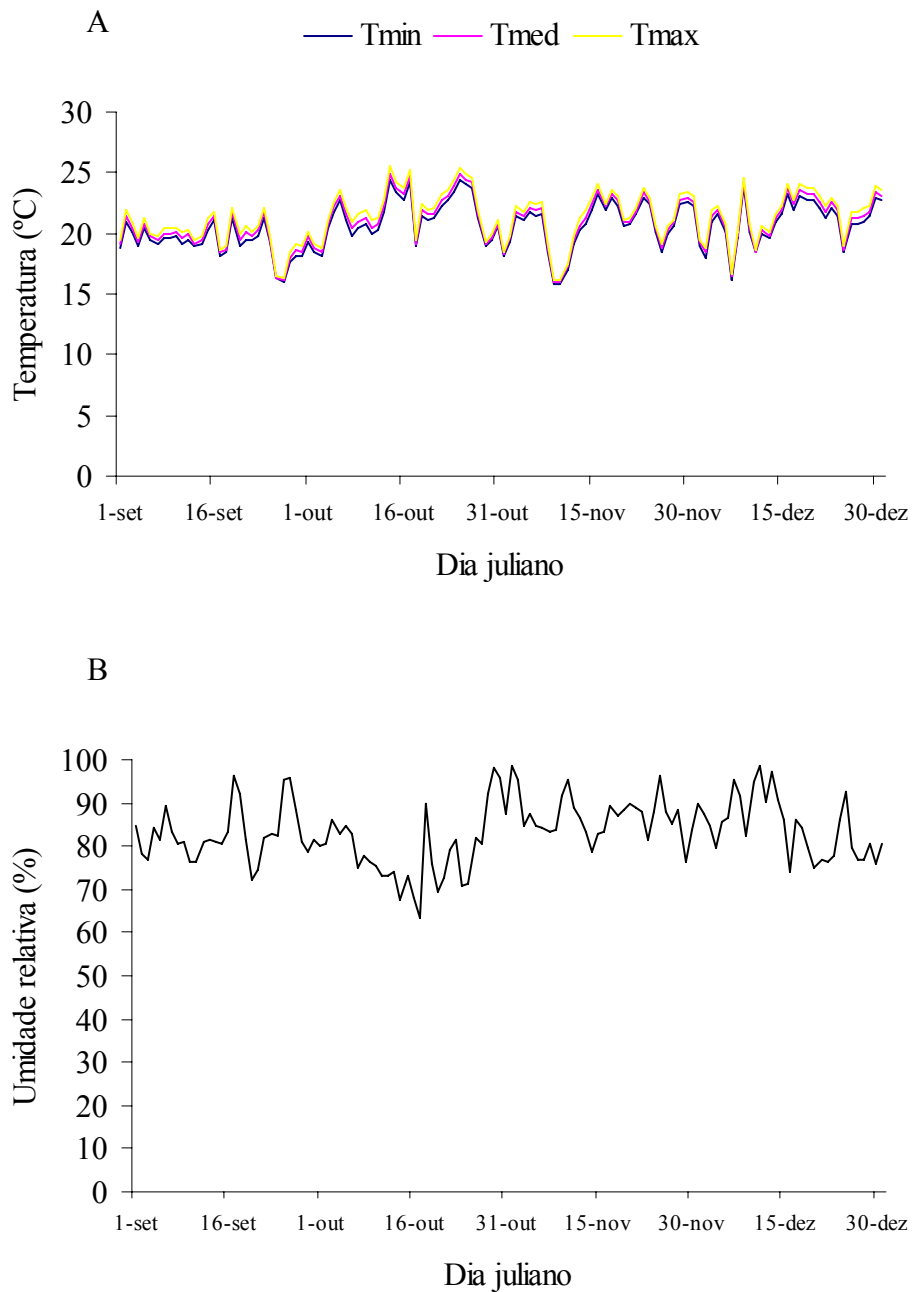


FIG. 2 - Condições climáticas monitoradas durante a realização dos experimentos: A - Flutuação da temperatura (°C) mínima (Tmin), média (Tmed) e máxima (Tmax) diária; e B - Umidade relativa do ar (%) diária.

CONCLUSÕES GERAIS

Verificaram-se, com base nos resultados desse trabalho, para o patossistema *R. solanacearum*-eucalipto, os seguintes aspectos:

- i) Os sintomas da doença em minijardim clonal caracterizaram-se por necrose foliar, escurecimento anelar ou completo do lenho, pela murcha e morte de minicepas, bem como arroxamento das nervuras do limbo foliar e podridão de miniestacas. A etiologia da doença foi confirmada por meio de testes de exsudação, microscopia de varredura, isolamento da bactéria, análises de PCR/RFLP, reação de hipersensibilidade (HR) em mudas de tabaco, testes de patogenicidade em plântulas de eucalipto e tomate e re-isolamento da bactéria inoculada. A incidência da doença em viveiros clonais, no período de abril a setembro de 2005, resultou em um prejuízo estimado de seis milhões de reais;
- ii) A doença afetou a produtividade de minijardins clonais. Considerando brotações ou substrato contaminados como fonte de inóculo, o patógeno pode ser disseminado por mudas clonais de eucalipto; e
- iii) Desenvolveu-se um método de avaliação da resistência empregando-se um infectário que simula as condições de minijardim clonal. Entre as espécies avaliadas, *E. tereticornis* e *E. grandis* apresentaram, respectivamente, o menor (33,3%) e o maior (91,7%) percentual de genótipos suscetíveis.