

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Potencial de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas no controle
da murcha-de-ralstonia em eucalipto**

Vítor Morais de Sousa
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

VÍTOR MORAIS DE SOUSA

Potencial de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas no controle da murcha-de-ralstonia em eucalipto

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

Orientador: Rafael Ferreira Alfenas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S725p
2024

Sousa, Vitor Morais de, 1997-
Potencial de rizobactérias promotoras de crescimento no
controle da murcha-de-ralstonia em eucalipto / Vitor Morais de
Sousa. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (41 f.): il. (algumas color.).

.
Inclui anexo.

Orientador: Rafael Ferreira Alfenas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Fitopatologia, 2024.

Referências bibliográficas: f. 37-40.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.045>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Ralstonia solanacearum* - Controle biológico. 2. Rizóbio.
I. Alfenas, Rafael Ferreira, 1983-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de
Pós-Graduação em Fitopatologia. III. Título.

CDD 22. ed. 579.332

VÍTOR MORAIS DE SOUSA

Potencial de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas no controle da murcha-de-ralstonia em eucalipto

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

APROVADA: 19 de dezembro de 2024.

Assentimento:

Vítor Morais de Sousa
Autor

Rafael Ferreira Alfenas
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 11/02/2026 às 14:09:10 e pelo orientador em 11/02/2026 às 16:19:02. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **WZWR.PUQ5.L7MJ** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e sabedoria em todas as etapas deste trabalho.

Aos meus pais, que são minha base e as figuras mais importantes para mim, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, e que, mesmo estando distantes, nunca estiveram longe de mim.

Aos Professores Acelino Alfenas e Rafael Alfenas, pela orientação, paciência e compreensão durante a realização das atividades, e pelo apoio incondicional diante das dificuldades que enfrentei ao longo dessa jornada.

À equipe Patomol, minha segunda casa, que sempre me recebeu de braços abertos e me forneceu todo o apoio necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

À Clonar Resistência a Doenças Florestais, pela disponibilização da estrutura, materiais e pessoal nos vários momentos que necessitei.

Aos meus parceiros de trabalho e amigos, Sabrina, Elenice e Mara, pelo companheirismo, dedicação e amizade ao longo dos anos.

À minha namorada Mary, que esteve ao meu lado do primeiro ao último dia, oferecendo apoio, compreensão e amor durante a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação e pelo ambiente acadêmico enriquecedor.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

SOUSA, Vítor Morais de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2024. **Potencial de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas no controle da murcha-de-ralstonia em eucalipto.** Orientador: Rafael Ferreira Alfenas.

A murcha-de-ralstonia, causada por *Ralstonia solanacearum*, é uma das doenças mais destrutivas em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. Este estudo avaliou o potencial de sete isolados de rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR) no controle biológico da doença. Os isolados foram identificados através de análise multigênica: *Bacillus velezensis* (3918, S2), *Bacillus amyloliquefaciens* (S1), *Pseudomonas aeruginosa* (FI2), *Pseudomonas oleovorans* (Ca) e *Pseudomonas putida* (MF2, MF4). A atividade antimicrobiana in vitro foi avaliada por difusão em ágar e emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs), ambos contra *R. solanacearum*. O isolado FI2 (*P. aeruginosa*) apresentou os maiores halos de inibição (1,07-1,08 cm), enquanto todos os isolados de *Pseudomonas* spp. produziram COVs capazes de reduzir significativamente o crescimento do patógeno em até 96,2%. Em mudas seminais de *Eucalyptus urophylla* cultivadas em substrato infestado com *R. solanacearum*, o isolado 3918 reduziu a incidência de murcha em 72,4%, enquanto FI2 reduziu em 48,1%. Em minicepas clonais do híbrido CLR 371 (*E. grandis* × *E. urophylla*), a eficiência de controle foi de 87,5% (isolado 3918) e 62,5% (isolado FI2). Todos os tratamentos com rizobactérias apresentaram menor detecção de *R. solanacearum* no ápice das plantas, sugerindo interferência nos processos iniciais de colonização vascular. Esses resultados evidenciam o potencial de rizobactérias, particularmente *B. velezensis* (3918) e *P. aeruginosa* (FI2), como agentes promissores no biocontrole da murcha-de-ralstonia em eucalipto. A aplicação dessas rizobactérias representa uma estratégia viável para o manejo integrado da doença em viveiros florestais.

Palavras-chave: *Bacillus velezensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, biocontrole, *Ralstonia solanacearum*, *Eucalyptus* spp.

ABSTRACT

SOUSA, Vítor Morais de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2024. **Potential of plant growth-promoting rhizobacteria in the management of ralstonia wilt in eucalyptus.** Adviser: Rafael Ferreira Alfenas.

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the most destructive diseases in eucalyptus clonal nurseries in Brazil. This study evaluated the biocontrol potential of seven plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) isolates against this pathogen. The isolates were identified through multilocus sequence analysis: *Bacillus velezensis* (3918, S2), *Bacillus amyloliquefaciens* (S1), *Pseudomonas aeruginosa* (FI2), *Pseudomonas oleovorans* (Ca), and *Pseudomonas putida* (MF2, MF4). In vitro antimicrobial activity was evaluated through agar diffusion assays and volatile organic compound (VOC) emission against *R. solanacearum*. Isolate FI2 (*P. aeruginosa*) produced the largest inhibition halos (1.07–1.08 cm), while all *Pseudomonas* spp. isolates produced VOCs capable of reducing pathogen growth by up to 96.2%. In *Eucalyptus urophylla* seedlings cultivated in *R. solanacearum*-infested substrate, isolate 3918 reduced wilt incidence by 72.4%, while FI2 reduced it by 48.1%. In clonal minihedges of hybrid CLR 371 (*E. grandis* × *E. urophylla*), control efficiency was 87.5% (isolate 3918) and 62.5% (isolate FI2). All rhizobacteria treatments showed reduced *R. solanacearum* detection in plant apexes, suggesting interference with initial vascular colonization processes. These results demonstrate the biocontrol potential of rhizobacteria, particularly *B. velezensis* (3918) and *P. aeruginosa* (FI2), against *Ralstonia* wilt in eucalyptus. Application of these rhizobacteria represents a viable strategy for integrated disease management in forest nurseries.

Keywords: *Bacillus-velezensis*, *Pseudomonas-aeruginosa*, biocontrol, *Ralstonia-solanacearum*, *Eucalyptus* spp

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	7
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
2.1	Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de rizobactérias.....	9
2.2	Isolado de <i>Ralstonia solanacearum</i>	11
2.3	Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i> contra <i>Ralstonia solanacearum</i> 11	
2.4	Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i> de COVs produzidos por rizobactérias contra <i>Ralstonia solanacearum</i>	13
2.5	Controle de <i>Ralstonia solanacearum</i> em mudas seminais de <i>Eucalyptus urophylla</i>	15
2.6	Controle de <i>Ralstonia solanacearum</i> em minicepas clonais de eucalipto...	18
3	RESULTADOS.....	22
3.1	Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de rizobactérias.....	22
3.2	Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i> contra <i>Ralstonia solanacearum</i> 27	
3.3	Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i> de COVs produzidos por rizobactérias contra <i>Ralstonia solanacearum</i>	29
3.4	Controle de <i>Ralstonia solanacearum</i> em mudas seminais de <i>Eucalyptus urophylla</i>	30
3.5	Controle de <i>Ralstonia solanacearum</i> em minicepas clonais de eucalipto...	32
3	DISCUSSÃO.....	34
4	CONCLUSÕES.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37
	ANEXO A – Composição das soluções de fertirrigação.....	41

1. INTRODUÇÃO

A murcha-de-ralstonia, causada por bactérias pertencentes ao complexo *Ralstonia solanacearum*, é uma das doenças de plantas mais destrutivas do mundo, afetando mais de 450 espécies vegetais em diversas regiões geográficas, desde áreas tropicais até climas temperados (WICKER et al., 2007). Em eucalipto, no Brasil, a doença incide tanto em viveiro quanto em campo e, é causada principalmente por *R. solanacearum* e, mais recentemente, por *R. pseudosolanacearum* (FREITAS et al., 2020) e *R. syzygii* (DE REZENDE et al., 2025). Essas bactérias são residentes do solo e infectam as plantas via raízes e podem ser dispersadas por ferramentas de poda infestadas (HAYWARD, 1991). Após a infecção, as bactérias colonizam o córtex radicular, invadem o xilema e comprometem o transporte de água, levando à murcha e à morte da planta (AGRIOS, 2005; VASSE; FREY; TRIGALET, 1995)

Atualmente, o plantio de mudas assintomáticas para formar o minijardim clonal é a principal forma de disseminação da doença em viveiros, embora outras fontes de inóculo, como a água de irrigação e a areia utilizada no leito dos canaletões, também são importantes (ALFENAS et al., 2006). Após a bactéria se estabelecer no minijardim clonal, a doença é disseminada por meio da coleta de miniestacas infectadas, porém assintomáticas. Essas miniestacas, ao se desenvolverem em mudas, são posteriormente plantadas no campo, perpetuando o ciclo de infecção. No campo, como as plantas, as variações climáticas desempenham um papel importante na expressão dos sintomas da doença, uma vez que debilitam a planta e favorecem a multiplicação da bactéria (ALFENAS, 2017; MAFIA et al., 2012).

Quando a bactéria se estabelece em viveiros, as alternativas de controle são limitadas. Neste caso, a reforma do minijardim com mudas comprovadamente, a erradicação das fontes de inóculo, a desinfestação das tesouras de poda, tubetes e bandejas em água quente, são as principais formas de controle da doença (ALFENAS et al., 2006). No campo, o plantio de clones resistente é a única estratégia de manejo atualmente disponível.

Na China, o tratamento de mudas com isolados da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* demonstraram potencial para utilização do controle da doença (RAN et al., 2005). Assim, a produção de mudas rizobacterizadas bem como a aplicação de microrganismos antagonistas na areia utilizada para formar o minijardim clonal, pode constituir uma prática importante a ser adotada no manejo integrado da doença.

Entre os agentes de controle biológico mais estudados, as rizobactérias do tipo Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), ou rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, têm se destacado como agentes eficazes no controle de doenças de plantas. As PGPR são microrganismos benéficos que colonizam a rizosfera, o rizoplane e os tecidos radiculares das plantas, promovendo seu crescimento por meio da fixação de nitrogênio, produção de fitormônios e indução de resistência a estresses abióticos (KLOEPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989; MOHANTY et al., 2021; SANTOYO et al., 2021; TEIXEIRA et al., 2007) e bióticos (TEIXEIRA et al., 2005). Além disso, essas bactérias podem ter ação contra patógenos por meio de interações antagônicas diretas e indiretas, como a produção de antibióticos e competição por nutrientes e espaço (CONRATH et al., 2015; PIETERSE et al., 2014).

Diversos gêneros bacterianos têm mostrado potencial para o controle biológico de doenças em plantas, incluindo *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*, com destaque para as cepas de *Bacillus spp.*, e *Pseudomonas fluorescens*, que possuem propriedades antimicrobianas comprovadas (HAAS; DÉFAGO, 2005; RAAIJMAKERS; MAZZOLA, 2012). Especificamente, cepas de *B. velezensis* têm sido eficazes no controle de patógenos como *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum* (JIANG et al., 2018; WEI et al., 2023), enquanto *Pseudomonas fluorescens* tem demonstrado atividade inibitória contra uma ampla gama de fitopatógenos, incluindo *Rhizoctonia solani* e *Alternaria sp.* (HOWELL; STIPANOVIC, 1979). Tais propriedades, somadas à sua capacidade de induzir resistência nas plantas, tornam as PGPRs uma estratégia importante no controle de doenças, especialmente contra a murcha-de-ralstonia em eucalipto.

Estudos preliminares sugerem que isolados de rizobactérias do gênero *Bacillus* possuem a capacidade de reduzir a incidência de *Ralstonia solanacearum* em mudas de eucalipto (SANTIAGO et al., 2015). Esse potencial de biocontrole abre novas perspectivas para o manejo da doença.

Nesse contexto, esta dissertação teve como objetivos (i) identificar sete isolados de rizobactérias obtidos da rizosfera de *Eucalyptus urophylla*, selecionados com base em estudos anteriores com base no potencial de promover o crescimento e o enraizamento de plantas de eucalipto; (ii) avaliar o potencial desses sete isolados na supressão *in vitro* de *R. solanacearum*, por meio de ensaios de difusão em ágar e emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs); e (iii) testar a eficácia biológica

desses isolados no controle da murcha-de-ralstonia em mudas seminais e minicepas clonais de *Eucalyptus* spp.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de rizobactérias

Os isolados de rizobactérias foram obtidos da coleção de cultura do Laboratório de Patologia Florestal (UFV/Bioagro). Dentre os 96 isolados disponíveis, sete foram selecionados devido ao seu potencial de indução de enraizamento e promoção do crescimento de plantas de eucalipto em experimentos prévios (TEIXEIRA et al., 2005, 2007) (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação dos isolados de rizobactérias com base na análise da região 16S do rRNA (Teixeira et al., 2007)

Código dos isolados	Classificação Teixeira 2007
3918	<i>Bacillus subtilis</i>
Ca	<i>Pseudomonas fulva</i>
FI2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MF2	<i>Pseudomonas</i> sp.
MF4	<i>Pseudomonas</i> sp.
S1	<i>Bacillus subtilis</i>
S2	<i>Bacillus subtilis</i>

Os isolados, armazenados em ultra freezer (-80 °C), foram reativados em meio de cultura Kado 523, incubados por 24 h a 28°C com fotoperíodo de 12 h, e posteriormente utilizados nos ensaios. Efetuou-se a caracterização morfológica das rizobactérias quanto à forma, coloração, elevação e bordas das colônias.

O DNA das rizobactérias foi extraído utilizando o kit Wizard® e quantificado em NanoDrop 2000c. Os produtos de PCR foram purificados usando o kit PCR ExoSAP-IT™ e sequenciados em um equipamento ABI PRISM 3500, utilizando os mesmos primers empregados na reação de PCR (Tabela 2). Os reagentes e equipamentos utilizados para sequenciamento dos fragmentos de DNA foram da Applied Biosystems. A qualidade dos eletroferogramas gerados foi avaliada utilizando o software Sequence Scanner v. 1.0 (Applied Biosystems) e PHPH

(<http://lbi.cenargen.embrapa.br/phph/>). Posteriormente, as sequências consenso foram montadas usando o software SeqAssem e as posições ambíguas dos nucleotídeos foram esclarecidas usando sequências de ambas as fitas de DNA. Para a realizar a análise filogenética, além das sequências geradas, outras sequências de espécies tipo pertencentes ao gênero analisado foram obtidas do banco de dados de nucleotídeos do GenBank do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). O alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas foi realizado utilizando o MAFFT v. 7.0 (KATO et al. 2019) e visualizado no MEGA v. 11 (TAMURA et al. 2021). Foi gerado um conjunto de dados com 28 unidades taxonômicas operacionais (OTUs) para identificação dos isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* e 90 OTUs para identificação dos isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. As árvores filogenéticas foram construídas por máxima verossimilhança (RAxML) usando a plataforma CIPRES (Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research) A visualização e edição da árvore filogenética foram geradas nos programas FigTree v. 1.4.4. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Tabela 2 – Primers e regiões gênicas correspondentes utilizados na identificação molecular dos isolados de rizobactérias

Região/gene	Tamanho do amplicon (pb)	Nome do primer	Oligonucleotídeo
16S rRNA	1000	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
		1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'
<i>recA</i>	540	recA-F	5'-GATCGTCAAGCAGCCTTAGAT-3'
		recA-R	5'-TTACCGACCATAACGCCGAC-3'
<i>gyrA</i>	740	gyrA3-F	5'-GCDGCHGCNATGCGTTAYAC-3'
		gyrA3-R	5'-ACAAGMTCWGCKATTTTTTC-3'
<i>rpoB</i>	1247	LAPS	5'-TGGCCGAGAACCAGTTCCGCGT-3'
		LAPS27	5'-CGGCTTCGTCCAGCTTGTTTCAG-3'
<i>rpoD</i>	760	PsEG30F	5'-ATYGAAATCGCCAARCG-3'
		OsEG790R	5'-CGGTTGATKTCCTTGA-3'

2.2 Isolado de *Ralstonia solanacearum*

O isolado LPF 710 de *Ralstonia solanacearum*, comprovadamente agressivo (FREITAS et al., 2021), foi utilizado no presente trabalho. O isolado foi cultivado em meio Caseína-Pepton-Glicose (CPG) (KELMAN, 1954) por 48 h a 28°C e a concentração bacteriana foi ajustada para 10⁸ UFC/mL (OD₆₀₀=0,5) para todos os experimentos.

2.3 Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* contra *Ralstonia solanacearum*

Avaliou-se o potencial antagônico de sete isolados de rizobactérias (Tabela 1), previamente selecionados com base em estudos anteriores (TEIXEIRA et al., 2007), para o controle do crescimento de *Ralstonia solanacearum*, por meio do ensaio de difusão em ágar com discos de papel (TAHIR et al., 2017). Para isso, cinco µL de uma suspensão de *R. solanacearum* ajustada para 10⁸ UFC/mL (OD₆₀₀ = 0,5) foram adicionados a um frasco Erlenmeyer contendo 150 mL do meio CPG (KELMAN, 1954) fundido (≤ 50 °C) e homogeneizado. Em seguida, cerca de 20 mL desse meio foi vertido em placas de Petri, que foram mantidas por 24 horas a 28 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, para permitir o crescimento bacteriano.

Posteriormente, 10 µL de uma suspensão ajustada para 10⁸ UFC/mL (OD₆₀₀=0,5) de cada uma das sete culturas de rizobactérias, crescidas em meio Luria Bertani (LB) líquido (BERTANI, 1951) foram depositados sobre discos de papel filtro estéreis (5 mm de diâmetro), distribuídos equidistantemente sobre a superfície das placas contendo *R. solanacearum*. Como testemunha negativa foi aplicada apenas água destilada estéril nos discos de papel (Figura 1).

As placas foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, com nove repetições por tratamento, e o experimento foi repetido ao menos uma vez. Após 24 horas de incubação a 28 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, mediu-se o diâmetro dos halos de inibição para avaliar o potencial antagônico das rizobactérias.

A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA fatorial (dois fatores) para verificar os efeitos principais dos tratamentos e do tempo, bem como sua interação. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5% (p < 0,05).

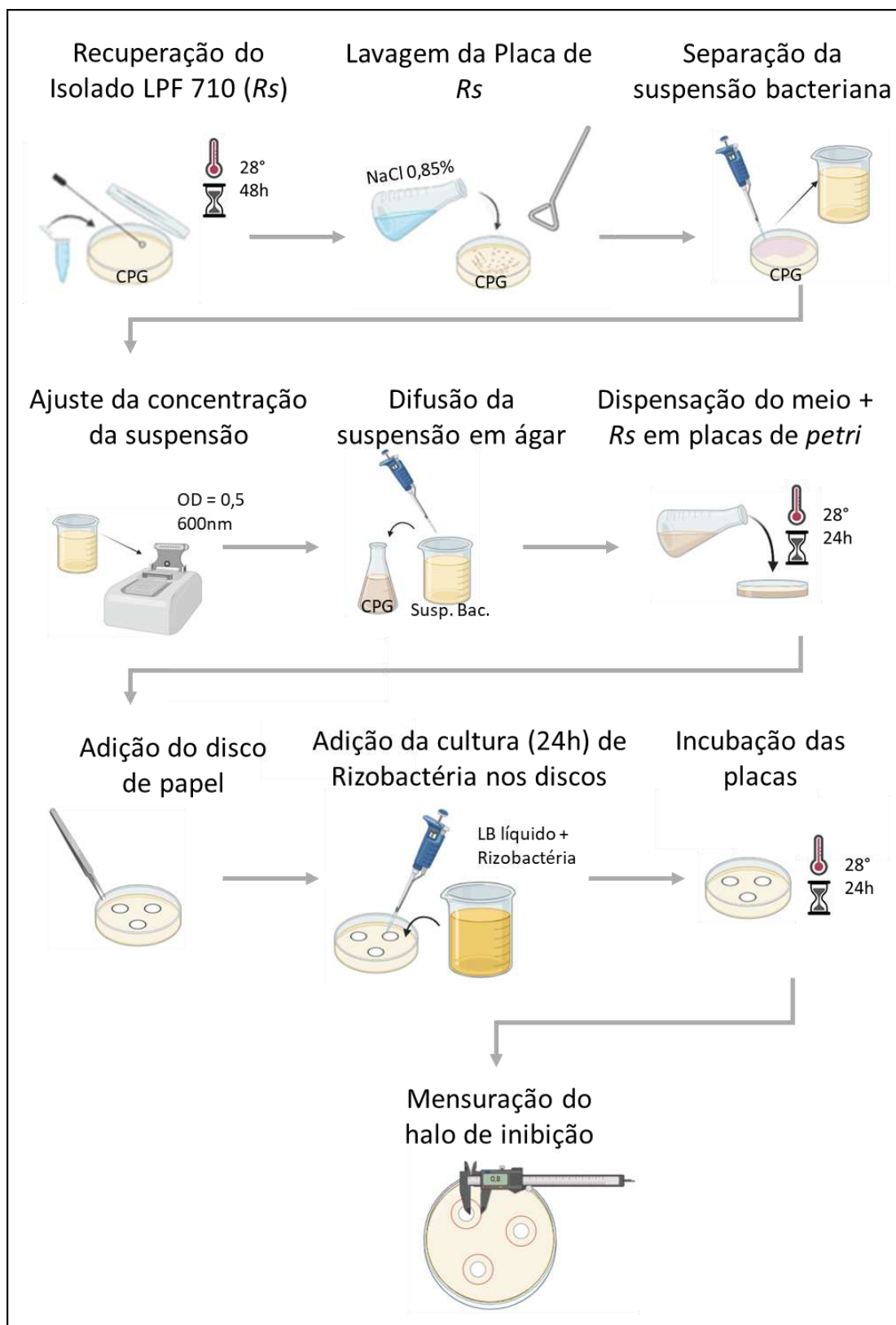


Figura 1 – Desenho esquemático da metodologia utilizada para avaliar antagonismo *in vitro* de rizobactérias contra *Ralstonia solanacearum*

2.4 Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de COVs produzidos por rizobactérias contra *Ralstonia solanacearum*

O ensaio de placas duplas foi utilizado para avaliar o potencial de produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) por rizobactérias com capacidade de inibir o crescimento de *Ralstonia solanacearum* (TAHIR et al., 2017).

Vinte μL de uma suspensão de *R. solanacearum*, ajustada para 10^8 UFC/mL ($\text{OD}_{600} = 0,5$), foram depositados em uma das metades de uma placa de Petri contendo meio CPG (KELMAN, 1954). Na outra metade, contendo meio salino mínimo modificado (MS) (1,5% de ágar, 1,5% de sacarose e 0,4% de TSA p/v) (RAZA et al., 2016), foram aplicados 20 μL de culturas de rizobactérias previamente crescidas overnight em meio LB líquido (BERTANI, 1951). Como testemunha negativa foi aplicada apenas água destilada estéril em meio MS e na outra metade foi aplicado a suspensão de *R. solanacearum* seguindo a mesma metodologia acima.

As placas foram imediatamente seladas com Parafilm® e incubadas a 28 °C por 24 horas. Após o período de incubação, a concentração de *R. solanacearum* foi determinada por meio da leitura da absorbância da suspensão obtida pela lavagem da superfície da placa com o meio CPG (Figura 2). As leituras foram feitas em triplicadas por tratamento, com ao menos uma repetição temporal.

A análise estatística foi conduzida por meio de ANOVA fatorial (dois fatores), considerando os efeitos principais dos tratamentos e do tempo, além da interação entre esses fatores. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

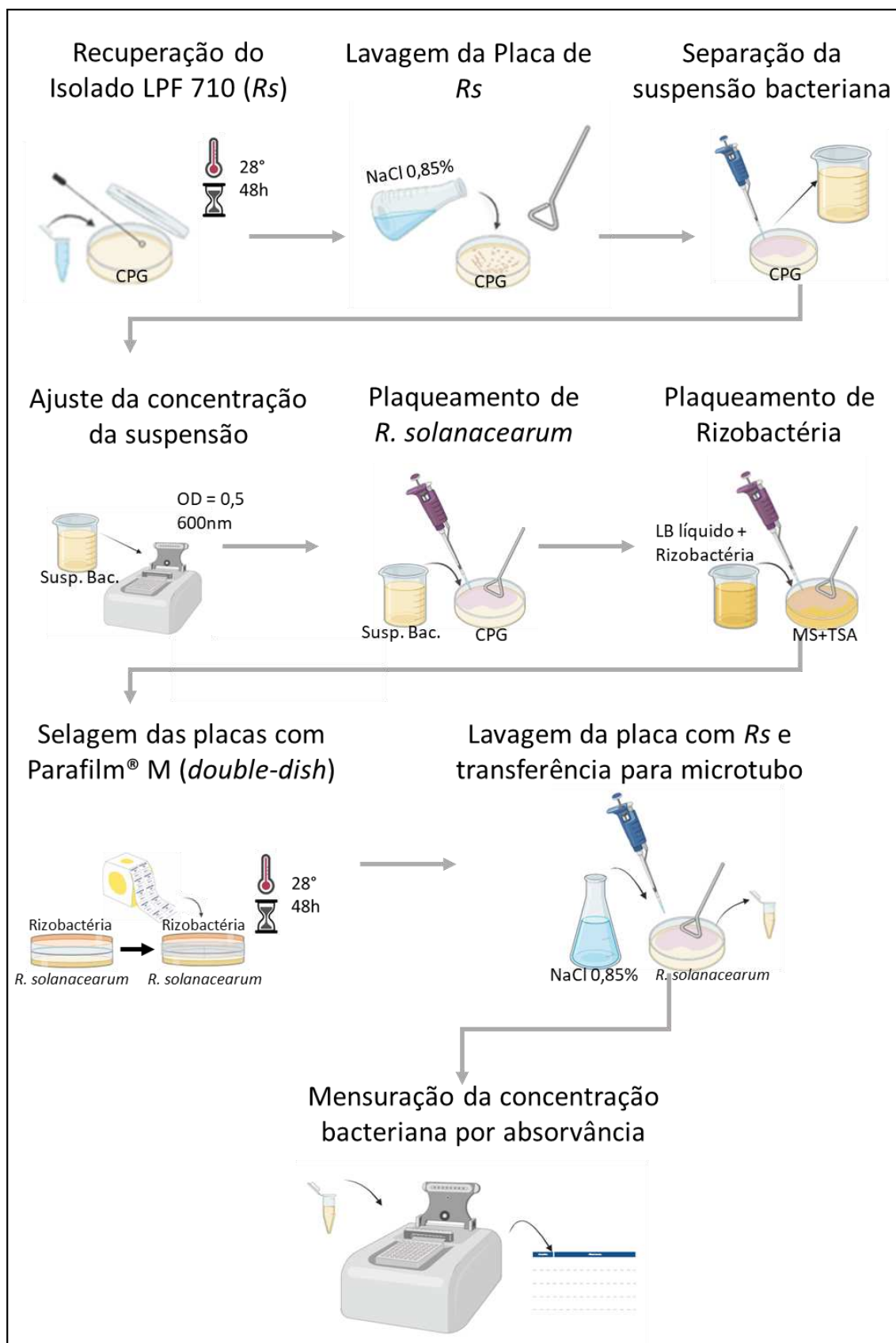


Figura 2 – Desenho esquemático da metodologia utilizada para avaliar *in vitro* o potencial das rizobactérias em produzir compostos orgânicos voláteis (COVs) capazes de inibir o crescimento de *Ralstonia solanacearum*

2.5 Controle de *Ralstonia solanacearum* em mudas seminais de *Eucalyptus urophylla*

Uma amostra de 11 L de substrato comercial (Carolina Soil®), previamente enriquecido com superfosfato simples e fertilizante de liberação controlada (Osmocote®), foi infestada com uma suspensão bacteriana de *R. solanacearum* na concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 0,5), na proporção de 0,1 mL·cm⁻³ de substrato. Após incubação por 72 horas a 28 °C, parte desse substrato infestado foi tratada, separadamente, com suspensões dos isolados UFV3918 e FI2 de rizobactérias, preparados na mesma concentração e proporção (0,1 mL·cm⁻³) (Figura 3).

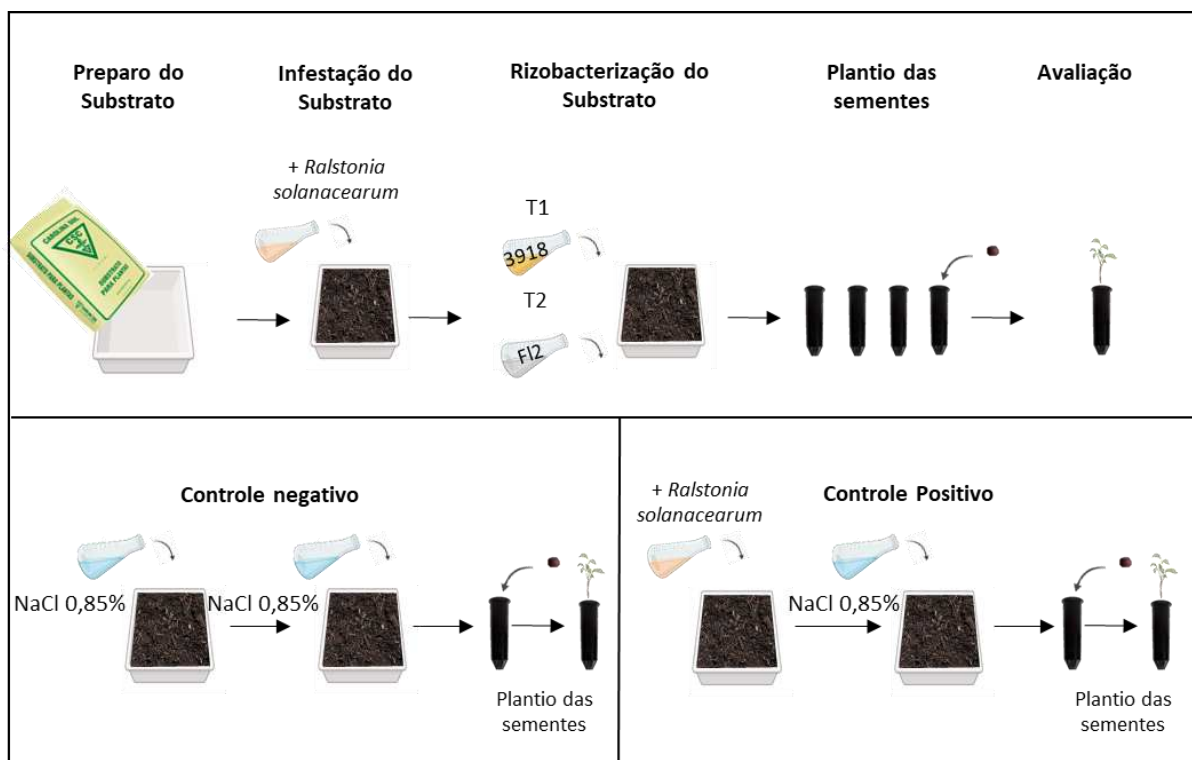


Figura 3 – Esquema de avaliação do potencial de rizobactérias como agentes de biocontrole da murcha-de-ralstonia, causada por *Ralstonia solanacearum* em mudas seminais de eucalipto.

O substrato infestado e rizobacterizado foi distribuído em tubetes plásticos com volume de 55 cm³, nos quais se realizou a semeadura de *E. urophylla*. Em seguida, os tubetes foram mantidos em câmara de crescimento a 28 °C, com fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 137 $\mu\text{mol f\u00f3tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Como testemunha negativa, utilizou-se substrato infestado com *R. solanacearum*, sem adição de rizobactérias. O

experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (isolados UFV3918 e FI2), duas testemunhas, e 177 tubetes por tratamento (Tabela 3).

Tabela 3 – Relação de tratamentos na avaliação do biocontrole de *Ralstonia solanacearum* em mudas seminais de eucalipto

Tratamento	Isolado de rizobactéria	Bactéria Fitopatogênica
T1 - Testemunha negativa		
T2 - Testemunha negativa		<i>Ralstonia solanacearum</i>
T3 - 3918 + Rs	3918-	<i>Ralstonia solanacearum</i>
T4 - FI2+ Rs	FI2-	<i>Ralstonia solanacearum</i>

T1 - Testemunha negativa, sem inoculação de *Ralstonia solanacearum* e sem aplicação de rizobactérias; T2 - Testemunha positiva, inoculação de *R. solanacearum* e sem aplicação de rizobactérias; T3 - 3918+ Rs, com inoculação de *R. solanacearum* e aplicação do isolado de rizobactéria 3918; T4 - FI2 + Rs, com inoculação de *R. solanacearum* e aplicação do isolado de rizobactéria FI2.

A cada cinco dias, durante um período de 75 dias após a semeadura, foi avaliada a incidência da doença por meio da quantificação do número de mudas murchas. A presença de *R. solanacearum* nas mudas sintomáticas foi confirmada por exsudação microscópica de pus, teste imunocromatográfico (Agdia®) e isolamento em meio de Kelman suplementado com cloreto de tetrazólio (ALFENAS et al., 2015; KELMAN, 1954) (Figura 4).

A incidência de mortalidade foi calculada, em cada avaliação (DAI), como a razão entre o número de mudas mortas e o total de mudas por tratamento.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator para avaliar o efeito dos tratamentos, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

A área sob a curva de progresso da incidência (AUDC, %·dia) foi calculada pela regra do trapézio entre DASs consecutivos de 15 a 75, a partir das curvas de incidência percentuais. Para comparação entre tratamentos, ajustou-se ANOVA de um fator sobre a AUDC por repetição e aplicou-se o teste de Tukey (5%).

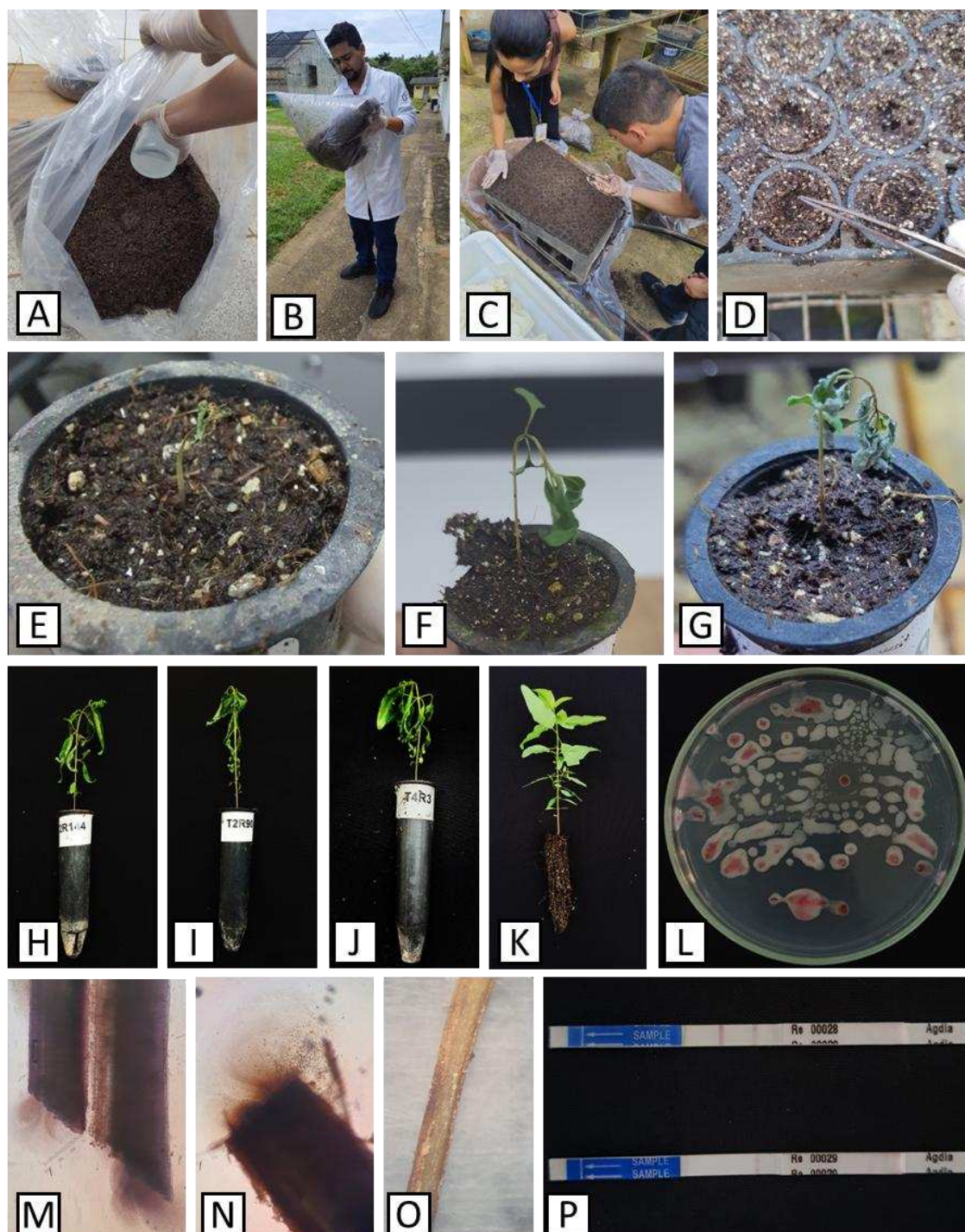


Figura 4 – Experimento *in vivo* com mudas seminais de *Eucalyptus urophylla*: (A) Aplicação do inóculo no substrato; (B) homogeneização do substrato; (C) distribuição do substrato nas bandejas; (D) plantio das sementes de eucalipto por tubete; (E) muda emergida do T1 com sintomas de murcha aos 15 D.A.I.; (F) muda do T2 com sintomas aos 30 D.A.I.; (G) muda do T2 com sintomas aos 45 D.A.I.; (H, I) mudas do testemunha positiva com sintomas aos 65 D.A.I.; (J) mudas do T2 com sintomas aos 65 D.A.I.; (K) Muda sadia do T2 aos 75 D.A.I.; (L) isolamento de *Ralstonia solanacearum* em meio Kelman; (M, N) exsudação de pus bacteriano em lâmina; (O) sintoma de escurecimento do caule em mudas infectadas; (P) teste ágdia de imunocromatografia, sendo o primeiro positivo e o segundo negativo para presença de *Ralstonia solanacearum*.

2.6 Controle de *Ralstonia solanacearum* em minicepas clonais de eucalipto

Mudas do clone híbrido CLR 371 (*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*) foram produzidas em tubetes contendo substrato rizobacterizado com os isolados UFV3918 e FI2, com o objetivo de promover a colonização da rizobactéria na zona pilífera das raízes. Aos 50 e 70 dias após o estaqueamento, foram aplicados 5 mL por muda de uma suspensão bacteriana ajustada para 10^8 UFC·mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 0,5) dos respectivos isolados UFV3918 e FI2.

Aos 90 dias após o estaqueamento, as mudas foram inoculadas com *Ralstonia solanacearum* por imersão das raízes em uma suspensão ajustada para 10^8 UFC·mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 0,5). Em seguida, as mudas foram transplantadas para calhas metálicas contendo, em sua base, uma lona plástica preta. Sobre a lona foi adicionada uma camada de brita nº 2 (5 cm), seguida por uma tela de sombreamento tipo sombrite (50%) e, por fim, uma camada de areia grossa lavada. A areia foi infestada com uma suspensão bacteriana das rizobactérias, correspondentes com os tratamentos, na concentração de 10^8 UFC·mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 0,5), na proporção de 0,1 mL·cm⁻³ de substrato. Esta composição visou simular as condições estruturais de um minijardim clonal comercial com a rizobacterização da planta desde a etapa de enraizamento até o estabelecimento do minijardim (Figura 5 e Figura 6).

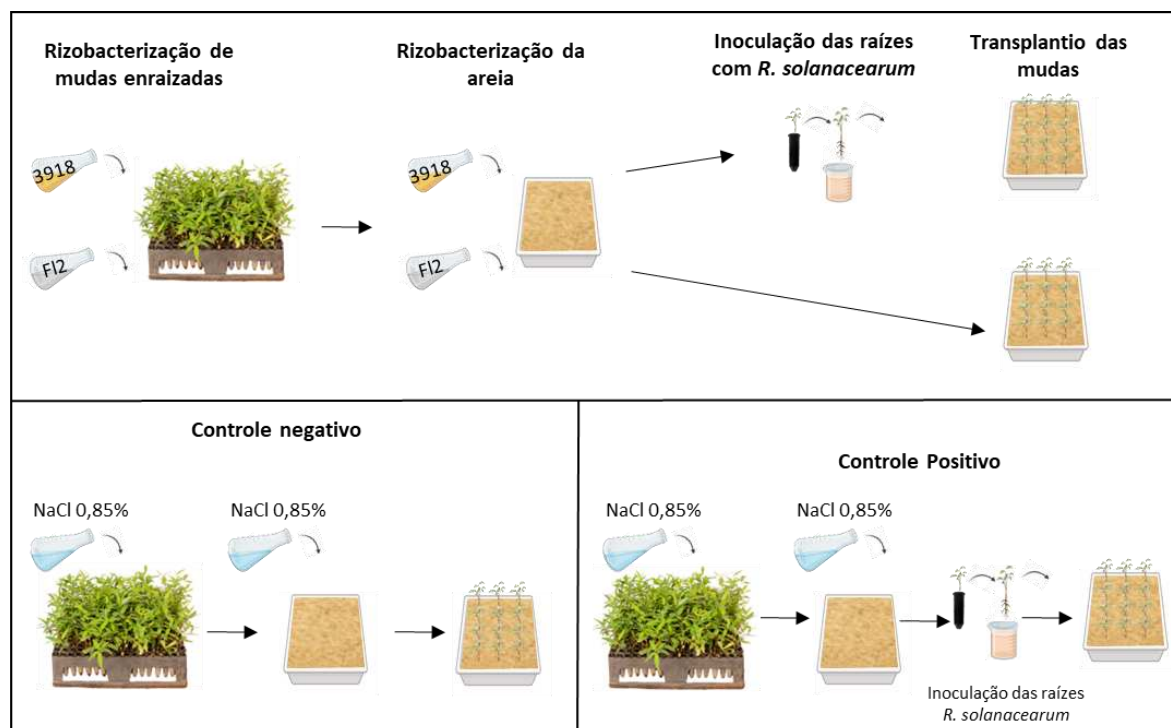


Figura 5 – Esquema da metodologia utilizada na avaliação do controle de *Ralstonia solanacearum* em minicepas clonais de eucalipto mediado por rizobactérias

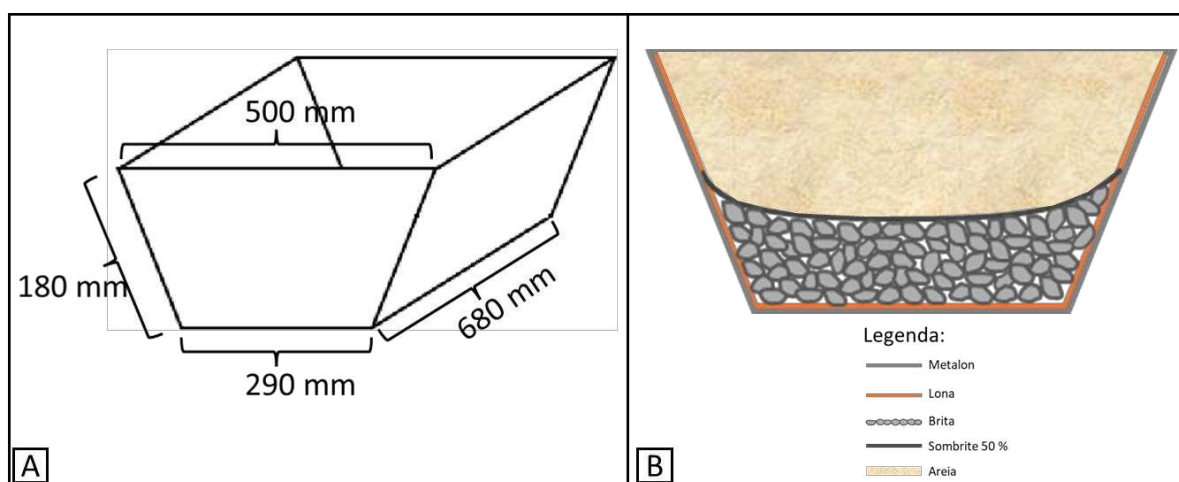


Figura 6 – Calha utilizada como leito de minicepas clonais para avaliação do controle de *Ralstonia solanacearum* em minicepas de eucalipto mediado por rizobactérias: (A) Dimensões das calhas; (B) Preenchimento das calhas.

Em cada calha foram transplantadas 12 mudas, dispostas em espaçamento de 10 × 10 cm entre plantas e entre linhas, sob sistema de fertirrigação manual (Anexo A). O experimento foi conduzido em ambiente com temperatura controlada ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo de 12 horas e irradiância de $137\text{ }\mu\text{mol f\acute{o}tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e 12 repetições por tratamento (Tabela 4).

Tabela 4 – Relação de tratamentos na avaliação do controle de *Ralstonia solanacearum* em minicepas de eucalipto mediado por rizobactérias

Tratamento	Isolado de Rizobactéria	Bactéria Fitopatogênica
T1 - Testemunha negativa	-	-
T2 - Testemunha positiva	-	<i>Ralstonia solanacearum</i>
T3 - 3918 + Rs	3918	<i>Ralstonia solanacearum</i>
T4 - FI2+ Rs	FI2	<i>Ralstonia solanacearum</i>
T5 - 3918	3918-	-
T6 - FI2	FI2-	-

T1 - Testemunha negativa, sem inoculação de *Ralstonia solanacearum* e sem aplicação de rizobactérias; T2 - Testemunha positiva, inoculação de *R. solanacearum* e sem aplicação de rizobactérias; T3 - 3918+ Rs, com inoculação de *R. solanacearum* e aplicação do isolado de rizobactéria 3918; T4 - FI2 + Rs, com inoculação de *R. solanacearum* e aplicação do isolado de rizobactéria FI2; T5 - 3918, sem inoculação de *R. solanacearum* e aplicação do isolado de rizobactéria 3918; T6 - FI2, sem inoculação de *Ralstonia solanacearum* e aplicação do isolado de rizobactéria FI2.

A avaliação consistiu na quantificação da incidência de murcha nas minicepas e em suas brotações. A presença de *R. solanacearum* nos tecidos foi confirmada por exsudação de pus bacteriano, isolamento em meio semisseletivo de Kelman suplementado com cloreto de tetrazólio (KELMAN, 1954) e teste imunocromatográfico (Agdia®) (Figura 7)

A incidência de mortalidade foi calculada, em cada avaliação (DAI), como a razão entre o número de mudas mortas e o total de mudas avaliadas por repetição (4 plantas), resultando em proporções entre 0 e 1.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator para avaliar o efeito dos tratamentos, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

A área sob a curva de progresso da incidência (AUDC, %·dia) foi calculada pela regra do trapézio entre DAIs consecutivos de 15 a 115, a partir das curvas de incidência percentuais. Para comparação entre tratamentos, ajustou-se ANOVA de um fator sobre a AUDC por repetição e aplicou-se o teste de Tukey (5%).

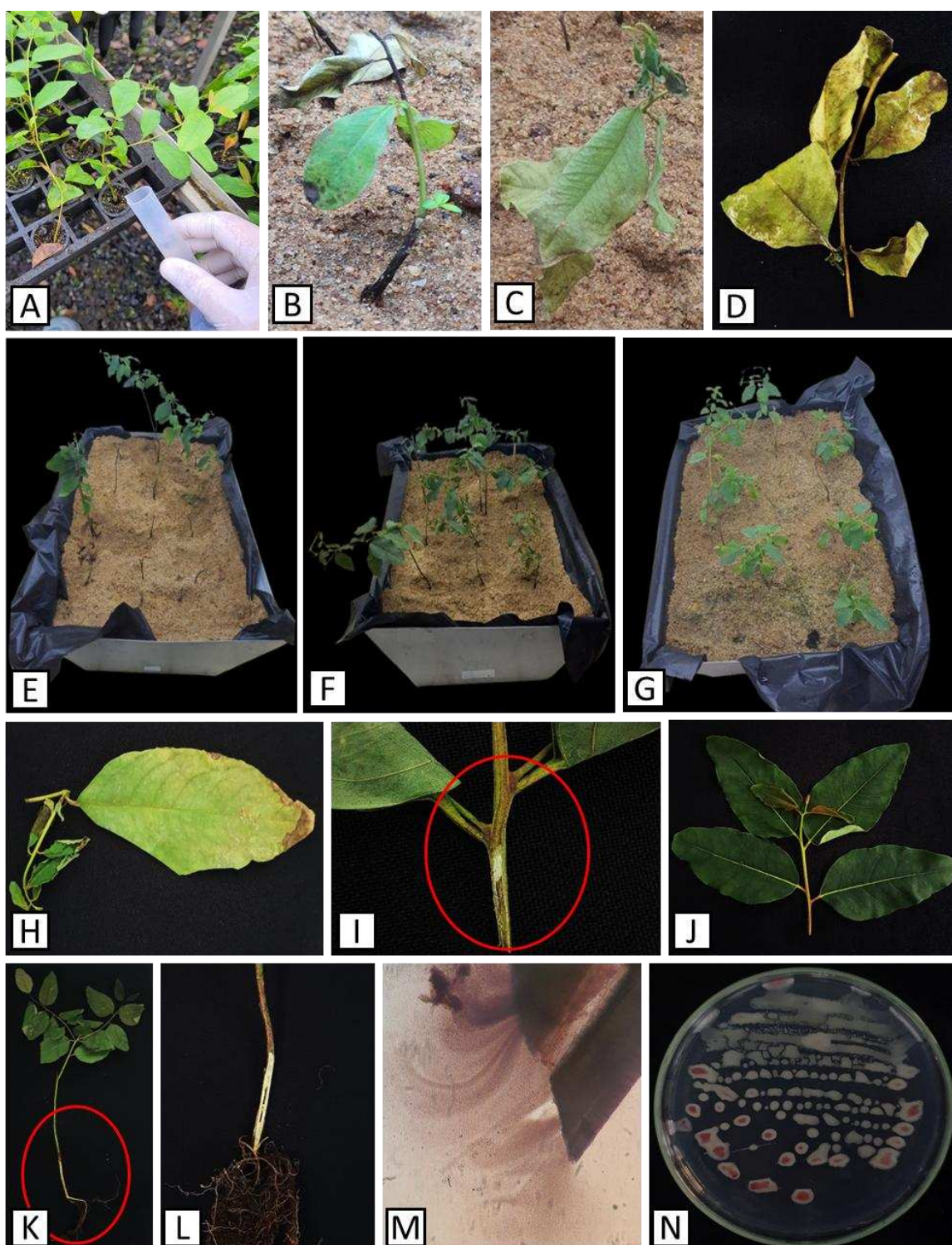


Figura 7 – Experimento *in vivo* com minicapsulas do clone CLR 371 (*E. grandis* x *E. urophylla*): (A) aplicação da suspensão de rizobactérias nas mudas em tubetes; (B) muda da testemunha positiva com sintomas de murcha; (C e H) muda do tratamento FI2+Rs com sintomas de murcha; (D) mudas do tratamento 3918+Rs com sintomas de murcha; (E) calhas da testemunha positiva contendo minicapsulas mortas; (F) calhas do tratamento 3918+Rs; (G) calhas do tratamento FI2+Rs; (I) sintomas de infecção por *Ralstonia solanacearum* em mudas da testemunha positiva; (J) estaca sadia do tratamento 3918+Rs; (K) muda da testemunha positiva com escurecimento central do

caule; (L) muda sadia do tratamento FI2-Rs; (M) exsudação de pus bacteriano em microscópio e (N) isolamento de *Ralstonia solanacearum* em meio Kelman.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de rizobactérias

Todos os sete isolados de rizobactérias investigados foram recuperados com sucesso e sua identidade foi confirmada por meio de características morfológicas e análise de sequência multilocos (Tabela 5) (Figura 8 e Figura 9).

Tabela 5 – Classificação dos isolados de rizobactérias com base na análise multigênica em contraste com a identificação por sequenciamento da região 16S do rRNA (Teixeira et al., 2007)

Código dos isolados	MLSA	Classificação Teixeira 2007
3918	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Ca	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	<i>Pseudomonas fulva</i>
FI2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MF2	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas</i> sp
MF4	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
S1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
S2	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>

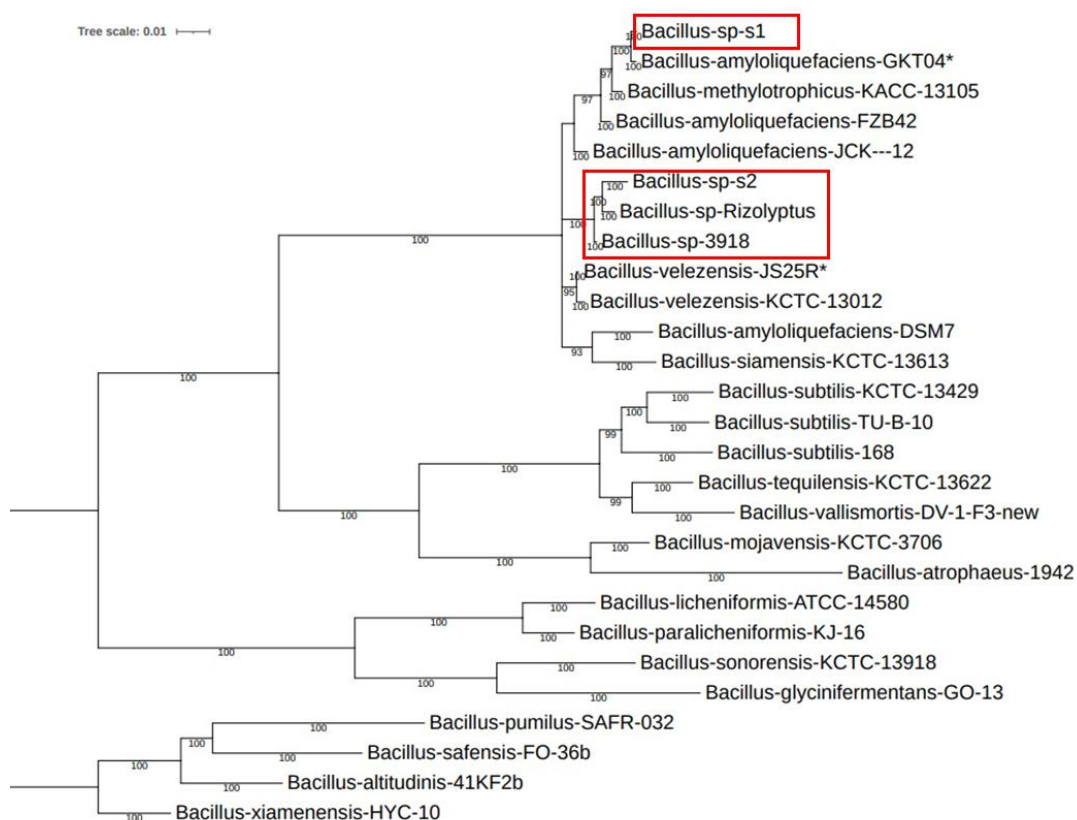


Figura 8 – Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança construída com as sequências concatenadas das regiões rDNA *gyrA* e *recA* para identificação dos isolados 3918, S1, S2 de *Bacillus*.

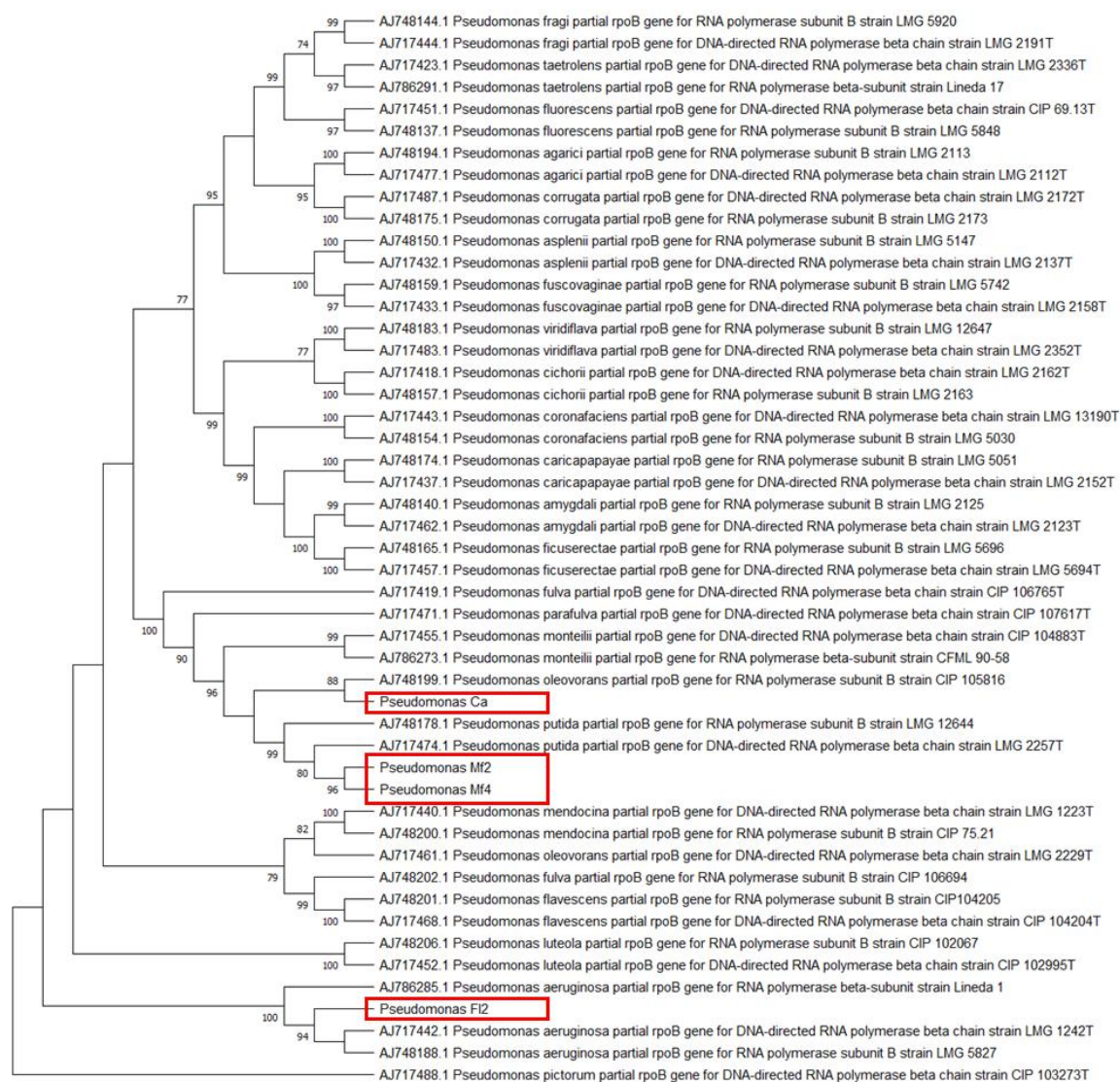


Figura 9 – Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança construída com as seqüências concatenadas das regiões rDNA *rpoB* e *rpoD* para identificação dos isolados Ca, MF2, MF4 e FI2 de *Pseudomonas*.

Observou-se que todos os isolados apresentaram crescimento expressivo em meio de cultura Kado 523. Os isolados 3918, S1 e S2, pertencentes ao gênero *Bacillus*, apresentaram características morfológicas e padrões de crescimento semelhantes entre si. Apesar de serem todos pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, os isolados MF2 e MF4 apresentaram morfologia mais similar entre si do que com os isolados CA e FI2. Os isolados CA e FI2 apresentaram características mais distintas, com colônias ligeiramente fluorescentes que se difundiram pelo meio de cultura, sendo a característica mais evidente no isolado FI2 (Figura 10)

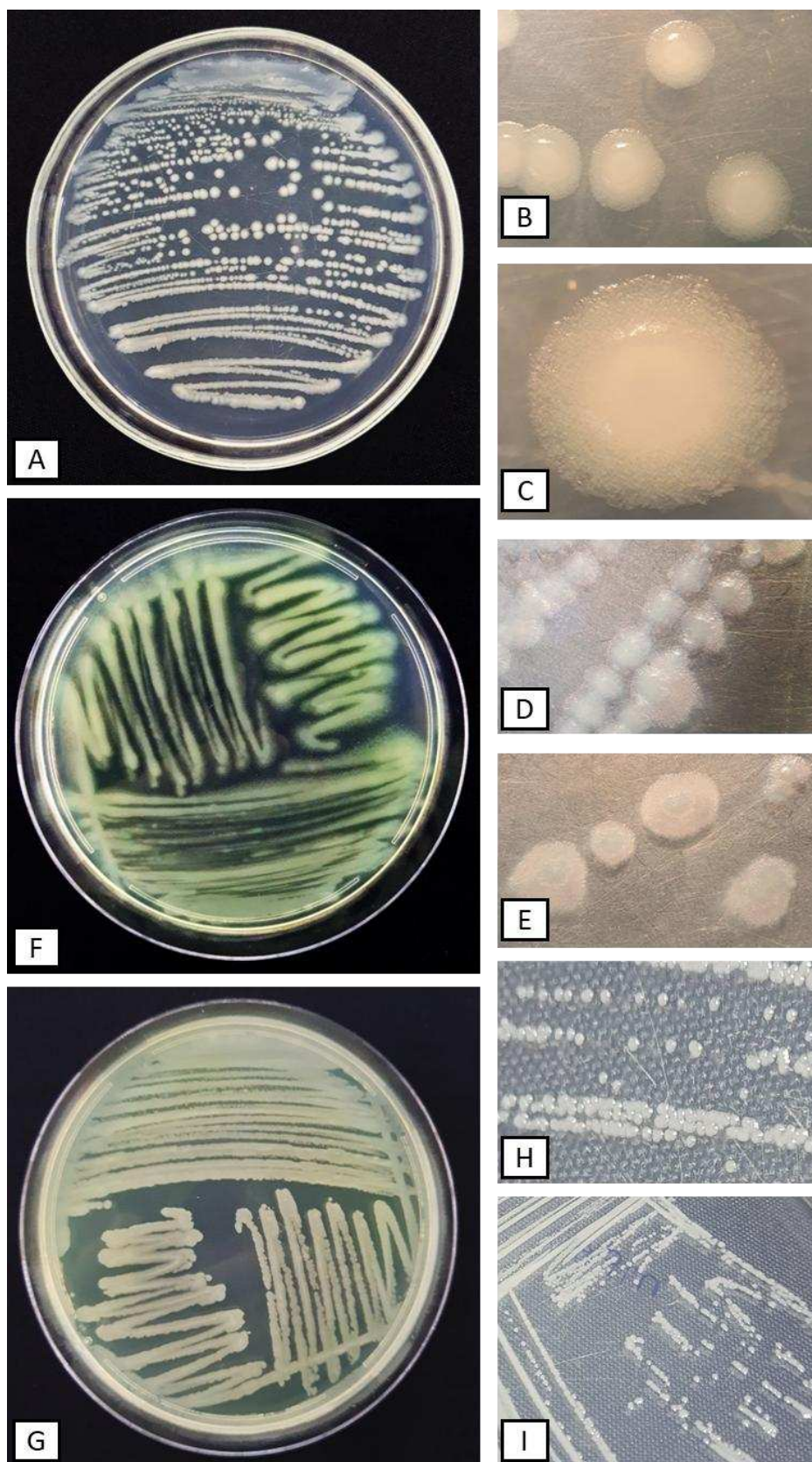


Figura 10 – Morfologia das colônias dos isolados de rizobactérias cultivados em meio 523, após 24 h de incubação. (A, B, C) isolado 3918 – *Bacillus velezensis*; (D) isolado S1 – *Bacillus amyloliquefaciens*; (E) isolado S2 – *Bacillus velezensis*; (F) isolado FI2 – *Pseudomonas aeruginosa*; (G) isolado CA – *Pseudomonas oleovorans*.; (H) isolado MF2 – *Pseudomonas putida*; (I) isolado MF4 – *Pseudomonas putida*.

Com base na análise molecular para identificação dos isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, conclui-se que os isolados 3918 e S2 pertencem à espécie *B. velezensis*, enquanto o isolado S1, pertence a *B. amyloliquefaciens* (Tabela 6, Figura 8). Tanto *B. velezensis*, quanto *B. amyloliquefaciens* fazem parte do clado *amyloliquefaciens* (DUNLAP et al., 2016). Anteriormente, esses isolados haviam sido identificados como *B. subtilis*, porém essa classificação foi feita utilizando apenas a região 16s do rRNA, que não apresenta resolução suficiente para identificação ao nível de espécie.

Já para os isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, conclui-se que os isolados MF2 e MF4 pertencem a *P. putida*; o isolado CA pertence a *P. oleovorans* e o FI2 a *P. aeruginosa* (Tabela 6, Figura 9)

Tabela 6 – Classificação dos isolados de rizobactérias com base na análise multigênica em contraste com a identificação por sequenciamento da região 16S do rRNA (Teixeira et al., 2007)

Código dos isolados	MLSA	Classificação Teixeira 2007
3918	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Ca	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	<i>Pseudomonas fulva</i>
FI2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MF2	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas</i> sp
MF4	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
S1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
S2	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>

3.2 Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* contra *Ralstonia solanacearum*

Foram observadas diferenças na formação dos halos de inibição do crescimento de *R. solanacearum* em placa entre os diferentes tratamentos, ou seja, entre as distintas combinações com rizobactérias (Figura 11).

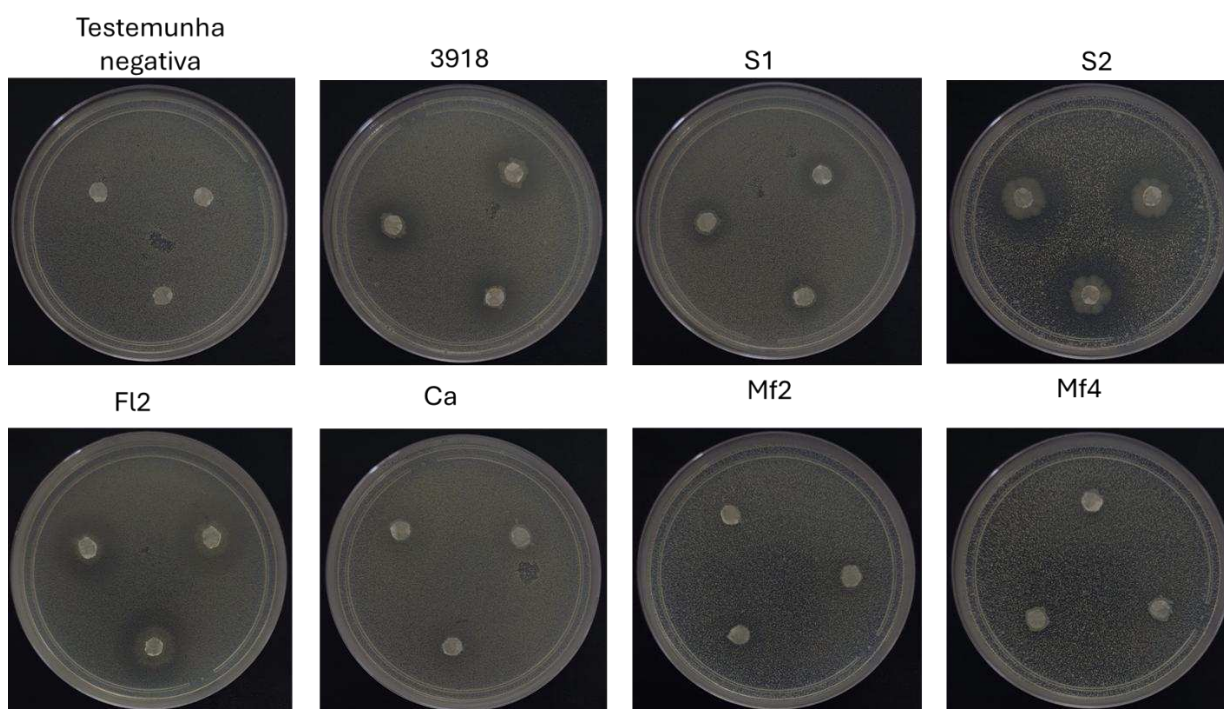


Figura 11 – Formação de halos de inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* em meios com diferentes rizobactérias. A testemunha negativa consistiu em discos de papel estéreis com água destilada estéril em placas com *Ralstonia solanacearum* difusa em meio. Os isolados 3918, S1 e S2 são espécies de *Bacillus* e Fl2, CA, MF2 e MF4 são espécies de *Pseudomonas*.

Esta resposta também variou entre os ensaios, com interação significativa ensaio × tratamento (Tabela 7). Desta forma as comparações foram interpretadas dentro de cada ensaio.

Tabela 7 – Relação de tratamentos e média dos halos de inibição mensurados na avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* contra *R. solanacearum*

Tratamento	Média de Halo Ensaio 1 (cm)	Média de Halo Ensaio 2 (cm)
Testemunha negativa	0,00 c	0,00 c
3918	0,77 a	0,82 a
S1	0,64 f	0,69 e
S2	1,09 d	0,88 f
Fl2	1,07 d	1,08 d
Ca	0,59 b	0,62 b
Mf2	0,19 e	0,00 c
Mf4	0,00 c	0,00 c

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No primeiro ensaio, os isolados Fl2 (*P. aeruginosa*) e S2 (*B. velezensis*) apresentaram os maiores halos de inibição frente ao patógeno, sem diferença estatística entre si. Esse resultado está em consonância com os achados de Anith et al. (2004), que relataram inibição *in vitro* de *R. solanacearum* por cepas de espécies filogeneticamente relacionadas aos isolados de *Pseudomonas* e *Bacillus* analisados neste estudo. Os isolados 3918 (*B. velezensis*), S1 (*B. amyloliquefaciens*) e CA (*P. oleovorans*) exibiram halos intermediários, sendo agrupados individualmente. O isolado MF2 (*P. putida*) apresentou um pequeno halo de inibição, ao passo que a testemunha negativa e o isolado MF4 (*P. putida*) não mostraram formação do halo.

Quando o ensaio foi repetido, o isolado Fl2 (*P. aeruginosa*) novamente provocou maior halo de inibição do crescimento do patógeno enquanto o isolado S2 apresentou comportamento semelhante ao observado nos isolados 3918 (*B. velezensis*), S1 (*B. amyloliquefaciens*) e CA (*P. oleovorans*) no primeiro ensaio. A testemunha negativa e MF4 (*P. putida*) continuaram sem causar halo de inibição. Diferentemente do primeiro ensaio, o isolado MF2 (*P. putida*) não diferiu estatisticamente em relação à testemunha negativa e do isolado MF4 (*P. putida*), segundo o teste Tukey HSD.

3.3 Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de COVs produzidos por rizobactérias contra *Ralstonia solanacearum*

A análise estatística indicou que o tempo de coleta não afetou a absorvância, permitindo a análise conjunta das duas análises de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) realizadas.

Observou-se redução significativa do crescimento do patógeno entre os tratamentos aplicados, isto é, em função da exposição com COVs de diferentes rizobactérias (Figura 12).

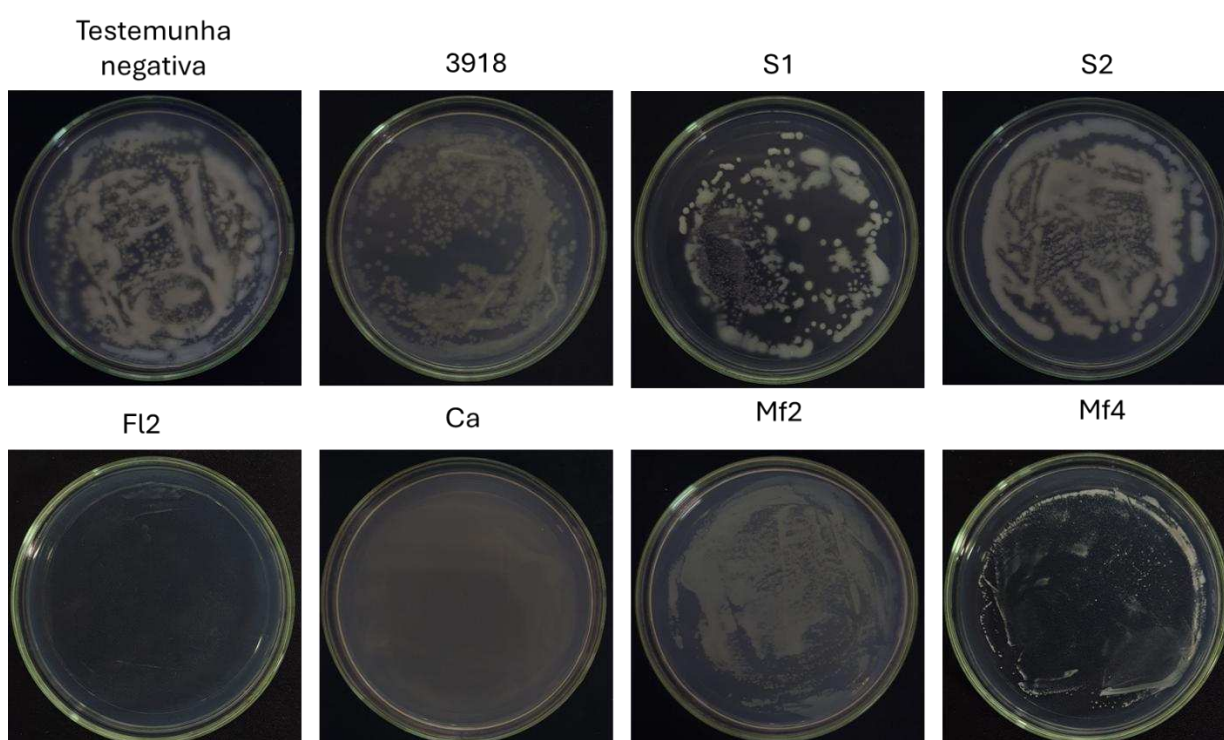


Figura 12 – Placas da avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de Compostos Orgânicos Voláteis produzidos por rizobactérias contra *Ralstonia solanacearum*. A testemunha negativa é constituída por água destilada em meio CPG.

Os isolados FI2, CA, MF2 e MF4 reduziram o crescimento de *R. solanacearum* em relação à testemunha negativa, indicando inibição pelos compostos voláteis pelas espécies de *Pseudomonas*. Já os isolados de *Bacillus* spp., 3819, S1 e S2, não inibiram o crescimento da bactéria patogênica, apresentando valores de absorvância semelhantes à testemunha negativa (Tabela 8).

Tabela 8 – Absorbância média mensurada como inferência da atividade antibacteriana *in vitro* promovida por Compostos Orgânicos Voláteis produzidos por rizobactérias (tratamentos) contra *R. solanacearum*

Tratamentos de COVs	Absorbância média
Testemunha negativa	1,878 a
3918	1,313 a
S1	1,138 a
S2	1,582 a
FI2	0,483 b
Ca	0,615 b
Mf2	0,613 b
Mf4	0,623 b

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4 Controle de *Ralstonia solanacearum* em mudas seminais de *Eucalyptus urophylla*

A germinação das sementes variou entre os tratamentos, com diferenças observadas entre os substratos infestados com *R. solanacearum* e rizobacterizados com os isolados 3918 ou FI2. O pico de germinação ocorreu aos dez dias após a semeadura (D.A.S.), com um mínimo de 116 mudas germinadas por tratamento. A partir do 15º dia após a semeadura, observaram-se sintomas de murcha e morte em mudas de todos os tratamentos. No entanto, apenas as mudas com mortalidade da testemunha negativa (não inoculada e não rizobacterizada) apresentaram resultado soronegativo no teste imunocromatográfico (Agdia®), indicando que o sintoma observado não foi causado pela bactéria. As demais mudas sintomáticas foram soropositivas para *R. solanacearum*.

Após 20 dias de incubação, a testemunha positiva apresentou a maior incidência de murcha-da-ralstonia (15,2%). A menor incidência da doença (4,1%) foi observada no tratamento contendo o isolado 3918 inoculado no substrato de plantio (Figura 13 Tabela 9).

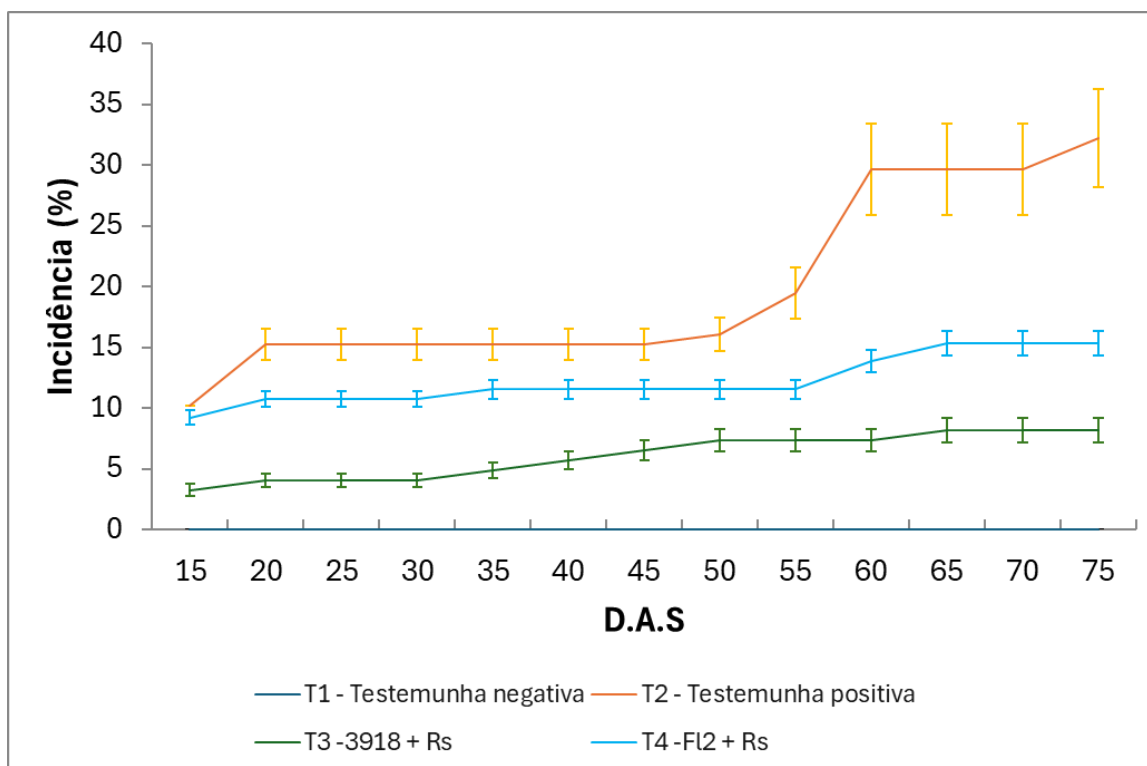


Figura 13 – Incidência da murcha-de-Ralstonia em mudas seminais de *Eucalyptus urophylla* no período 15 a 75 dias após a sementeira. A testemunha negativa corresponde ao substrato de plantio sem inoculação de *Ralstonia solanacearum* e sem aplicação de rizobactérias; já a testemunha positiva corresponde ao substrato de plantio inoculado com *R. solanacearum* e sem aplicação de rizobactérias.

Tabela 9 – Relação de tratamentos, média de sobrevivência geral e Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no experimento com mudas seminais

Tratamentos do solo	Média de Sobrevivência	AACPD
T1 - Testemunha negativa	0a	0 a
T2 - Testemunha positiva	0,09 c	1186,28 c
T3 - 3918+ Rs	0,32 b	369 b
T4 - FI2 + Rs	0,15 b	734,62 b

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para os resultados, a ANOVA de um fator apontou efeito de tratamentos sobre a AUDC (%·dia) e tendência para a incidência final aos 75 dias; no desdobramento por Tukey (5%), o tratamento T2 (Testemunha positiva: inoculação de *R. solanacearum* e sem aplicação de rizobactérias) apresentou média de severidade superior e distinta, enquanto T3 (com inoculação de *R. solanacearum* e aplicação do isolado de rizobactéria 3918) e T4 (inoculação de *R. solanacearum* e aplicação do isolado de

rizobactéria FI2.) compuseram o mesmo grupo estatístico. A testemunha negativa T1 (sem inoculação de *R. solanacearum* e sem aplicação de rizobactérias) também se diferenciou dos demais, formando grupo próprio, mantendo a interpretação previamente descrita.

Observou-se aumento progressivo da incidência de murcha-da-ralstonia na testemunha positiva, que atingiu 32,2% aos 75 D.A.S. Em contraste, os tratamentos com rizobactérias apresentaram valores significativamente inferiores de incidência: 15,4% para o isolado FI2 e 8,2% para o isolado 3918. Esses resultados evidenciam o efeito benéfico das rizobactérias na redução da incidência da murcha em *E. urophylla* e na promoção da sobrevivência das mudas

3.5 Controle de *Ralstonia solanacearum* em minicepas clonais de eucalipto

No decorrer do experimento observou-se um rápido progresso da doença, com pico de incidência registrado aos 30 dias após a inoculação independentemente do tratamento. Os primeiros sintomas foram detectados na testemunha positiva aos 15 dias, com incidência de 16,7%.

Os tratamentos inoculados com *R. solanacearum* e com as rizobactérias 3918 (T3) e FI2 (T4) reduziram a incidência da murcha-da-ralstonia em comparação à testemunha positiva (Figura 14 e Tabela 10).

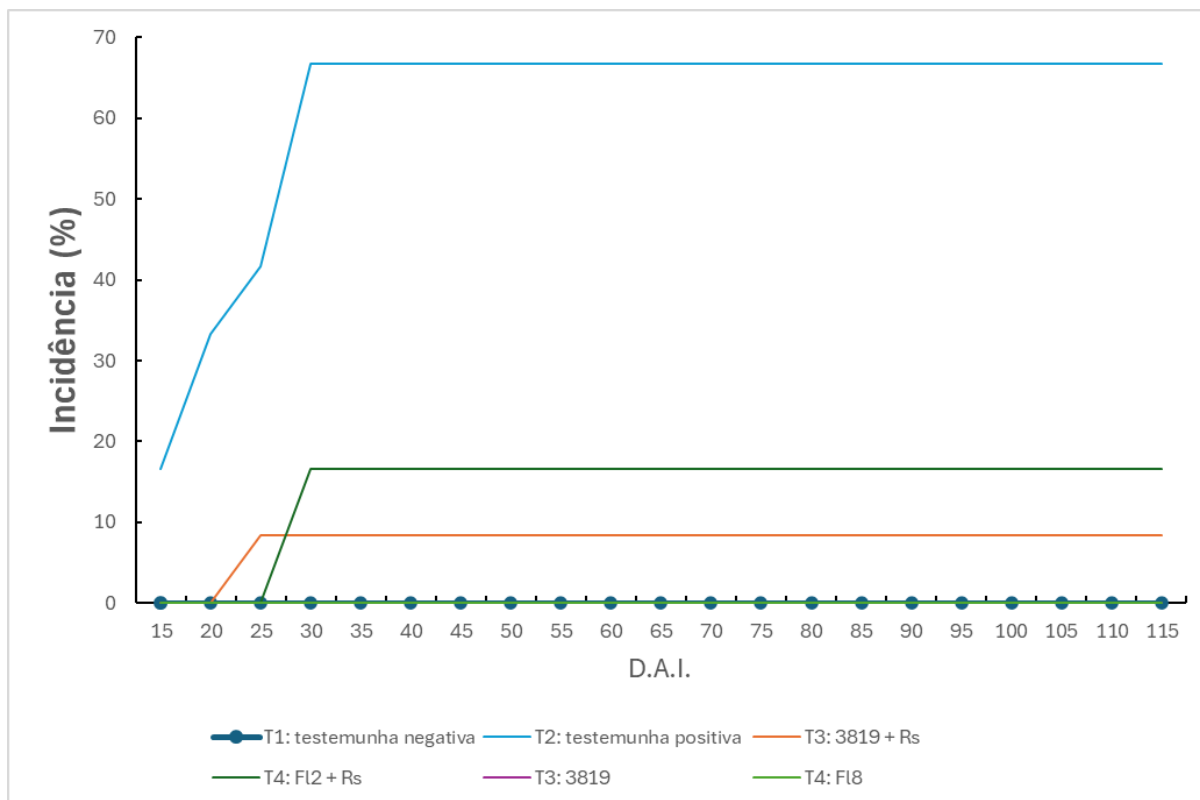


Figura 14 – Incidência da murcha-de-Ralstonia em minicepas de *Eucalyptus urophylla* em função dos dias após inoculação. A testemunha negativa corresponde ao cultivo livre de *Ralstonia solanacearum* e sem aplicação de rizobactérias; Já a testemunha positiva corresponde ao cultivo na presença de *R. solanacearum* e sem aplicação de rizobactérias.

Tabela 10 – Incidência da murcha-de-ralstonia e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) em minicepas rizobacterizadas e detecção de *R. solanacearum* em miniestacas assintomáticas.

Tratamento	Minicepas				Miniestacas	
	Incidência (%)	AACPD	Exsudação (%)	Detecção	Exsudação (%)	Detecção (%)
T1 - Testemunha negativa	0,0 a	0,0 a	0,0	0,00	0,0	0,0
T2 - Testemunha positiva	66,7 b	755,0 b	0,25	100,00	25,0	100
T3 - 3918 + Rs	8,3 a	92,5 a	0,27	100,00	9,0	54,5
T4 - FI2 + Rs	16,7 a	172,5 a	0,11	100,00	0,0	22,2
T5 - 3918 - Rs	0,0 a	0,0 a	0,0	0,00	0,0	0,0
T6 - FI2 - Rs	0,0 a	0,0 a	0,0	0,00	0,0	0,0

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A eficiência de controle foi de 87% e 75%, quando utilizado os isolados 3918 e FI2, respectivamente.

Ao analisar a curva de progresso da doença, evidencia-se o potencial de controle destes isolados na redução da incidência da murcha-de-ralstonia em minicepas de eucalipto. Entretanto, quando aos 40 dias após a inoculação, avaliou-se a presença de *R. solanacearum* nas miniestacas assintomáticas coletadas, foi possível detectar a presença de *R. solanacearum* de todos os tratamentos, embora com menor frequência de 22,2% e 54,5%, relacionados nos tratamentos T3 (com inoculação de *R. solanacearum* e aplicação do isolado de rizobactéria 3918) e T4 (com inoculação de *R. solanacearum* e aplicação do isolado de rizobactéria FI2) respectivamente (Tabela 10). Já aos 115 dias, em 100% das plantas que foram inoculadas foi detectada a presença do patógeno a partir de fragmentos retirados da região do coleto das minicepas.

A análise de variância (ANOVA) de um fator indicou efeito significativo de tratamentos tanto para a incidência final quanto para a área sob a curva de progresso (AUDC, %·dia), com comparações múltiplas pelo teste de Tukey a 5% destacando o T2 (Testemunha positiva: inoculação de *R. solanacearum* e sem aplicação de rizobactérias) como o único grupo que diferiu estatisticamente dos demais.

3 DISCUSSÃO

Este trabalho se insere em uma linha de pesquisa consolidada no Laboratório de Patologia Florestal UFV/BIOAGRO, que há mais de duas décadas investiga o potencial de rizobactérias promotoras de crescimento como agentes de biocontrole e bioestimulação em *Eucalyptus* spp. Estudos pioneiros identificaram isolados com capacidade de promover enraizamento (MAFIA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005, 2007) e de controlar patógenos em miniestacas (TEIXEIRA et al., 2005), culminando na formulação do bioinoculante Rizolyptus®. Além disso, efeitos antibióticos *in vitro* e mecanismos de antagonismo contra fitopatógenos bacterianos foram explorados por Zarpelon, (2007), ampliando a compreensão sobre os modos de ação desses microrganismos. O presente estudo dá continuidade a esse arcabouço, avaliando a eficácia de isolados previamente caracterizados contra *R. solanacearum*, um patógeno de elevada importância para o cultivo de eucalipto.

O controle da murcha-de-ralstonia em viveiros florestais é um desafio que tem demandado esforços para o desenvolvimento de estratégias que sejam eficazes para supressão da bactéria. O controle biológico por meio da aplicação de rizobactérias

promotoras do crescimento tem despontado como alternativa promissora, uma vez que essas bactérias também podem exercer o antagonismo a patógenos por meio da síntese de metabólitos secundários antimicrobianos, por meio da competição por espaço e nutrientes e até mesmo pela síntese de compostos orgânicos voláteis (FILHO et al., 2010; LEELASUPHAKUL et al., 2008). Indiretamente, essas as rizobactérias podem exercer o controle da doença por meio da indução da resistência sistêmica na planta hospedeira.

Nos ensaios de antagonismo por difusão em ágar, o isolado FI2 (*P. aeruginosa*) produziu halos de inibição significativamente maiores que os demais isolados de rizobactérias para o controle de *R. solanacearum*, indicando forte atividade antimicrobiana.

A atuação antimicrobiana por compostos voláteis também foi confirmada, sendo que os isolados de *Pseudomonas* (FI2, CA, MF2 e MF4) reduziram significativamente o crescimento de *R. solanacearum* (absorbância) em meio líquido. Embora os mecanismos exatos não tenham sido definidos, a comparação com estudos de Chen et al. (2020) e Raza et al. (2016), que relataram até 70% de inibição de *R. solanacearum* por COVs em comparação com 96,2% de inibição pela testemunha, sugere que compostos voláteis e difusíveis produzidos por *Pseudomonas* possam agir de forma sinérgica na contenção do patógeno.

Em mudas seminais de *E. urophylla* cultivadas em substrato infestado com *R. solanacearum* o isolado 3918 (*B. velezensis*), também presente no substrato, reduziu a incidência de murcha em 72,4%, enquanto FI2 (*P. aeruginosa*) reduziu em 48,1%. Já em minicepas clonais, o isolado 3918 reduziu a incidência de murcha em 87,5%, enquanto FI2 reduziu em 62,5%. Esses dados são particularmente relevantes quando comparados com a testemunha positiva, onde a infecção foi generalizada, e indicam não apenas um efeito protetor, mas uma possível indução de resistência.

Além da inibição direta, a ausência de *R. solanacearum* no ápice de plantas rizobacterizadas sugere interferência em processos de colonização vascular, como motilidade, adesão e formação de biofilme Wang et al. (2019) demonstraram que *Bacillus cereus* AR156 reduziu a produção de biofilme de *R. solanacearum*, atribuindo o efeito a metabólitos capazes de interferir na matriz extracelular do patógeno. Assim, é plausível que lipopeptídeos e outros compostos antimicrobianos produzidos pelas rizobactérias tenham limitado a estabilidade do biofilme e, conseqüentemente, a disseminação do patógeno rumo ao ápice. Essa distribuição diferencial do patógeno

ao longo da planta também é compatível com a atuação primária das rizobactérias na rizosfera e no sistema radicular, formando uma “zona de proteção” que, embora não impeça completamente a entrada do patógeno, tende a reduzir sua multiplicação inicial e a probabilidade de disseminação sistêmica. Adicionalmente, os resultados deste trabalho, especialmente a menor detecção/ausência de *R. solanacearum* no ápice de plantas rizobacterizadas, são compatíveis com uma limitação de etapas iniciais de colonização vascular, como adesão e formação de biofilme. Em condições que mimetizam o xilema de tomate, o tempo de adesão e as taxas de fluxo são determinantes para a formação de biofilme por *R. solanacearum* (CHU et al., 2024). Assim, é plausível que metabólitos produzidos pelas rizobactérias tenham modulado o microambiente vascular, reduzindo a eficiência de adesão/estabelecimento e dificultando a progressão do patógeno. No caso de *Pseudomonas putida* (isolados MF2 e MF4), mecanismos de invasão/modificação de biofilmes, incluindo sistemas de secreção tipo IVB e produção de putisolvin (PURTSCHERT-MONTENEGRO et al., 2022), oferecem uma explicação adicional para a menor persistência do patógeno e sua distribuição diferencial ao longo da planta.

No presente estudo, a consistência dos resultados entre diferentes métodos (ensaio de antibiose direto, indireto e avaliação em plantas) fortalece a hipótese de que os isolados, especialmente 3918 (*B. velezensis*) e FI2 (*P. aeruginosa*), não apenas interferem diretamente no crescimento do patógeno, mas também podem modular o ambiente rizosférico em favor da planta hospedeira.

Estudos bioquímicos adicionais e análises metagenômicas da rizosfera são recomendados para quantificar cada mecanismo e otimizar formulações, potencializando o uso dessas rizobactérias como bioinoculantes no manejo integrado da murcha-da-ralstonia.

4 CONCLUSÕES

- Rizobactérias têm potencial promissor no manejo biológico da murcha-de-ralstonia, causada por *R. solanacearum*, em condições de viveiro.
- Os isolados mais eficazes do estudo foram o 3918 (*B. velezensis*) e FI2 (*P. aeruginosa*).
- Estes isolados apresentaram efeito de antibiose direta, através de compostos voláteis e favorecendo as plantas hospedeiras.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, George N. **Plant Pathology** . 5a. ed. [S.l.]: Elsevier, 2005.
- ALFENAS, Acelino C. *et al.* *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 357–366, jul. 2006.
- ALFENAS, Acelino Couto. **Murchas vasculares e seus impactos na produção florestal**. **Revista Opiniões**, 2017.
- ANITH, K. N. *et al.* Efficacy of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Acibenzolar-S-Methyl, and Soil Amendment for Integrated Management of Bacterial Wilt on Tomato. **Plant disease**, v. 88, n. 6, p. 669–673, 2004.
- BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293–300, set. 1951.
- CHEN, Meichun *et al.* Biocontrol of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737 and its lipopeptides. **BMC microbiology**, v. 20, n. 1, 15 jun. 2020.
- CHU, Lan Thanh *et al.* Development of a tomato xylem-mimicking microfluidic system to study *Ralstonia pseudosolanacearum* biofilm formation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, p. 1395959, 2024.
- CONRATH, Uwe *et al.* Priming for Enhanced Defense. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, n. Volume 53, 2015, p. 97–119, 4 ago. 2015.
- DE REZENDE, Rafael Reis *et al.* First Report of *Ralstonia syzygii* Causing Bacteria Wilt on Eucalyptus in Brazil. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-24-2229-PDN>, v. 109, n. 3, p. 710, 18 mar. 2025.
- DUNLAP, Christopher A. *et al.* *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1212–1217, 1 mar. 2016.
- FILHO, Roberto Lanna *et al.* Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. n. 2, p. 12, 2010.
- FREITAS, Rodrigo G. *et al.* Detection and characterization of *Ralstonia pseudosolanacearum* infecting Eucalyptus sp. in Brazil. **Forest Pathology**, v. 50, n. 3, p. e12593, 1 jun. 2020.
- FREITAS, Rodrigo G. *et al.* Molecular characterization and aggressiveness of the *Ralstonia solanacearum* species complex from Eucalyptus spp. in Brazil. **Forest Pathology**, v. 51, n. 4, p. e12704, 1 ago. 2021.

HAAS, Dieter; DÉFAGO, Geneviève. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology** 2005 3:4, v. 3, n. 4, p. 307–319, 10 mar. 2005.

HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual review of phytopathology**. Vol. 29, p. 65–87, 1991.

HOWELL, C. R.; STIPANOVIC, R. D. Control of *Rhizoctonia solani* on Cotton Seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and With an Antibiotic Produced by the Bacterium. **Phytopathology**, v. 69, n. 5, p. 840–842, 1979.

JIANG, Chun Hao *et al.* *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v. 126, p. 147–157, 1 nov. 2018.

KATOH, Kazutaka; ROZEWICKI, John; YAMADA, Kazunori D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1160–1166, 19 jul. 2019.

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. **Phytopathology**, 1954.

KLOEPPER, Joseph W.; LIFSHITZ, Ran; ZABLOTOWICZ, Robert M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 39–44, 1 fev. 1989.

LEELASUPHAKUL, Wichitra; HEMMANEE, Punpen; CHUENCHITT, Samerchai. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 113–121, 1 abr. 2008.

MAFIA, Reginaldo Gonçalves *et al.* Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 843–851, dez. 2005.

MAFIA, Reginaldo Gonçalves *et al.* Murcha-bacteriana: disseminação do patógeno e efeitos da doença sobre a clonagem do eucalipto. **Revista Árvore**, v. 36, n. 4, p. 593–602, jul. 2012.

MOHANTY, Pratikhya *et al.* Insight Into the Role of PGPR in Sustainable Agriculture and Environment. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 667150, 30 jun. 2021.

PIETERSE, Corné M. J. *et al.* Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, n. Volume 52, 2014, p. 347–375, 4 ago. 2014.

PURTSCHERT-MONTENEGRO, Gabriela *et al.* *Pseudomonas putida* mediates bacterial killing, biofilm invasion and biocontrol with a type IVB secretion system. **Nature Microbiology** 2022 7:10, v. 7, n. 10, p. 1547–1557, 19 set. 2022.

RAAIJMAKERS, Jos M.; MAZZOLA, Mark. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, n. Volume 50, 2012, p. 403–424, 8 set. 2012.

RAN, L. X. *et al.* Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas spp.* in China. **Biological Control**, v. 32, n. 1, p. 111–120, 1 jan. 2005.

RAZA, Waseem *et al.* Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. **Scientific Reports** 2016 6:1, v. 6, n. 1, p. 1–13, 22 abr. 2016.

SANTIAGO, Thais R. *et al.* Biological control of eucalyptus bacterial wilt with rhizobacteria. **Biological Control**, v. 80, p. 14–22, 1 jan. 2015.

SANTOYO, Gustavo *et al.* Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). **Biology**, v. 10, n. 6, p. 475, 1 jun. 2021.

TAHIR, Hafiz Abdul Samad *et al.* *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 16 jan. 2017.

TAMURA, Koichiro; STECHER, Glen; KUMAR, Sudhir. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 25 jun. 2021.

TEIXEIRA, Débora A. *et al.* Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 350–356, ago. 2005.

TEIXEIRA, Débora A. *et al.* Promoção do enraizamento e crescimento de eucalipto por rizobactérias. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 118–123, 2007.

VASSE, Jacques; FREY, Pascal; TRIGALET, Andre. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Microbe Interactions**, v. 8, n. 2, p. 241–251, 1995.

WANG, Ning *et al.* Plant root exudates are involved in *Bacillus cereus* AR156 mediated biocontrol against *Ralstonia solanacearum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JAN, p. 418477, 31 jan. 2019.

WEI, Jinbin *et al.* Biocontrol mechanisms of *Bacillus velezensis* against *Fusarium oxysporum* from *Panax ginseng*. **Biological Control**, v. 182, p. 105222, 1 jul. 2023.

WICKER, Emmanuel *et al.* *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 21, p. 6790–6801, nov. 2007.

ZARPELON, Talyta Galafassi. **Caracterização de rizobactérias e eficiência do Rizolyptus® no enraizamento e crescimento de eucalipto**. Universidade Federal de Viçosa, , 21 mar. 2007. Disponível em: <<http://locus.ufv.br/handle/123456789/4360>>. Acesso em: 25 ago. 2024

ANEXO A – Composição das soluções de fertirrigação

Tabela A.1 - Concentração (g/L) de nutrientes nas soluções de fertirrigação (Clonar)

Solução	Nutriente	Concentração (g/L)
1	Nitrato de Cálcio	46
2	Cloreto de Potássio	12
2	Nitrato de Cálcio	7
2	MAP	4,8
2	Sulfato de magnésio	18,2
2	quelato de ferro	3
2	boro	14
2	sulfato de zinco	25
2	sulfato de manganês	56
2	sulfato de cobre	5
2	Molibidato de sódio	2