



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PROGRAMAS ESPECIAIS**

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)

Relatório Parcial das Atividades

TÍTULO DO PROJETO

Ecologia, epidemiologia e genômica de isolados de *Ralstonia* spp., agentes causais da murcha bacteriana em solanáceas e Moko da bananeira.

TÍTULO DO PLANO DE TRABALHO

Análise comparativa da sobrevivência no solo de isolados de *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*, agentes causais da murcha bacteriana do tomateiro

Recife, PE

Abril/2024

SUMÁRIO

1- IDENTIFICAÇÃO	3
2- TÍTULO DO PROJETO	3
3- RESUMO DO RELATÓRIO	3
5- OBJETIVOS	5
5.1. Geral:	5
5.2. Específicos:	6
6- METODOLOGIA	6
6.1. Obtenção de isolados de <i>Ralstonia</i> spp.	6
6.2- Teste de patogenicidade dos isolados	7
6.3- Preservação dos isolados pelo método de Castellani (água destilada esterilizada)	9
6.4- Eficácia de meios de cultura para recuperação de <i>Ralstonia</i> spp. do solo	10
6.5- Solo	11
6.6- Sobrevivência de diferentes isolados de <i>Ralstonia</i> spp. no solo	12
7- RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
7.1. Obtenção e reativação dos isolados de <i>Ralstonia</i> spp.	13
7.2. Teste de patogenicidade dos isolados	13
7.3 - Eficácia de meios de cultura para recuperação de <i>Ralstonia</i> spp. do solo	15
7.4- Sobrevivência de diferentes isolados de <i>Ralstonia</i> spp. no solo	16
8- CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	17
9- CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
10- ATIVIDADES RELEVANTES DESENVOLVIDAS PELO BOLSISTA	18
11- DIFICULDADES ENCONTRADAS	18
12- PARECER DO ORIENTADOR	19
13- REFERÊNCIAS	19

1- IDENTIFICAÇÃO

ALUNA: Winny Vitória Alves Barbosa

CURSO: Agronomia

PROGRAMA: (X) PIBIC () PIC () PIBIC-EM

ORIENTADOR (A): Elineide Barbosa de Souza

DEPARTAMENTO/UNIDADE ACADÊMICA: SEDE

RELATÓRIO: () PARCIAL (X) FINAL

2- TÍTULO DO PROJETO

Ecologia, epidemiologia e genômica de isolados de *Ralstonia* spp., agentes causais da murcha bacteriana em solanáceas e Moko da bananeira.

3- RESUMO DO RELATÓRIO

A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*, é uma importante doença que afeta o tomateiro sendo responsável por danos significativos na produtividade da cultura. Uma vez que *Ralstonia* spp. sobrevive por longos períodos no solo, pesquisas relacionadas ao controle e epidemiologia dependem de técnicas capazes de detectar e quantificar a presença dessa bactéria nesse ambiente. Inexistem estudos sobre a sobrevivência de *R. pseudosolanacearum* no solo. O objetivo da pesquisa é realizar a análise comparativa da sobrevivência no solo de isolados de *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*, avaliando a eficácia de meios de cultura na recuperação da bactéria do solo, determinando o tempo de sobrevivência e a influência da temperatura na sobrevivência. Inicialmente os isolados CCRMRs95 (*R. pseudosolanacearum*) e o CCRMRs92 (*R. solanacearum*) foram reativados e submetidos a teste de patogenicidade em tomateiro. Uma vez que o isolado CCRMRs92 não foi patogênico, foi substituído pelo isolado CCRMRs206. Apenas o isolado CCRMRs95 foi utilizado na avaliação da eficiência dos meios de cultura NYDA e TZC na recuperação da bactéria do solo. A suspensão bacteriana foi ajustada nas concentrações 1×10^7 e 1×10^3 UFC/g solo e plaqueadas nos meios de cultura nas diluições de 10^{-1} a 10^{-5} . O maior número de colônias de *R. pseudosolanacearum* foi observado no meio TZC e quando o solo foi infestado com a maior concentração da bactéria (1×10^7 UFC/g). O maior número de

colônias bacterianas foi detectado nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} , não sendo verificado crescimento nas diluições de 10^{-4} e 10^{-5} , em ambos os meios de cultura. O melhor meio de cultura para recuperação de *R. pseudosolanacearum* do solo foi o meio TZC. O estudo de sobrevivência no solo foi realizado com os isolados de *R. pseudosolanacearum* (CCRMRS95) e *R. solanacearum* (CCRMRS206), usando 50 g do solo por placa de Petri adicionado de 12,5 mL de suspensão bacteriana (5×10^8 UFC/ml). As placas foram incubadas a 28°C em BOD e avaliadas a cada cinco dias, retirando 0,5 g de solo, adicionado a 4,5 mL de ADE em tubos e realizando diluições seriadas com plaqueamento em meio TZC. Verificou-se uma maior capacidade adaptativa do isolado de CCRMRS95 que sobreviveu até o momento por 29 dias, com Área Abaixo da Curva da População (AACPOP) de $3,10 \times 10^3$ UFC/ g solo, em detrimento do isolado CCRMRS206 (22 dias; AACPOP $4,34 \times 10^3$ UFC/ g solo).

4- INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum L.*) é uma das hortaliças mais produzidas no Brasil. Desenvolvido sob diferentes sistemas de cultivo, épocas de semeadura e manejos culturais, o que garante uma produção em larga escala e oferta de tomate durante a maior parte do ano, essa espécie é cultivada nas mais diferentes regiões e, portanto, de grande importância econômica para o país (EPAGRI, 2018).

O tomateiro (*Solanum lycopersicum L.*) tem suas origens na região andina, que engloba o Equador e se estende até a Colômbia, embora sua domesticação em larga escala ocorreu principalmente no México (Brito Júnior, 2012). No Brasil, de acordo com dados do IBGE (IBGE, 2022), em 2022 a produção totalizou 3.809.986 toneladas, sendo o estado de Goiás destacado como o principal produtor do país.

A cultura do tomateiro enfrenta diversos problemas de caráter fitossanitário devido a sua alta suscetibilidade ao ataque de pragas e doenças. Dentre as doenças que afetam o tomateiro podemos destacar a murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* e *Ralstonia pseudosolanacearum*, que fazem parte do complexo de espécies *R. solanacearum* (Fegan; Prior, 2005; Safni *et al.*, 2014). *Ralstonia spp.* é uma bactéria transmitida pelo solo, sendo o segundo fitopatógeno mais prejudicial a plantas no mundo (Mansfield *et al.*, 2012). No Brasil foram identificadas as duas espécies causando doença em solanáceas: *R. solanacearum* (Biovars 1 e 2, Filotipo II), com distribuição ampla, e *R. pseudosolanacearum* (Biovar 3, Filotipo I), mais concentrada

nas regiões Norte e Nordeste, onde as temperaturas mais elevadas são predominantes (Santiago *et al.*, 2020).

A bactéria *Ralstonia* é Gram negativa, aeróbica, em forma de bastonete, que normalmente apresenta um ou mais flagelos em uma das extremidades (Schaad *et al.*, 2001). Possui uma ampla gama de hospedeiros, na qual estão centenas de espécies de plantas pertencentes a mais de 44 famílias botânicas (Hayward, 1991). Caracteriza-se como uma bactéria cosmopolita e a dificuldade em se desenvolver estratégias para o seu controle tem sido atribuída, majoritariamente, a sua ampla gama de hospedeiros, alta variabilidade genética e habilidade de sobreviver no solo por longos períodos (Lopes; Rossato, 2018). Felix *et al.* (2012) estudaram a sobrevivência de um mutante de *R. solanacearum* A1-9^{Rif} em dez tipos de solo, sendo verificado que o tempo de sobrevivência da bactéria variou de 42 a 77 dias. Entre as características químicas e físicas do solo, teor de argila, umidade residual e água disponível foram positivamente correlacionados, e o pH foi negativamente correlacionado, com tempo de sobrevivência, tamanho da população aos 42 dias e área abaixo da curva do progresso da doença. Não existem estudos sobre a sobrevivência de *R. pseudosolanacearum* no solo.

O controle da murcha bacteriana em plantas da família das solanáceas tem representado um desafio constante para os produtores. Vários métodos de detecção e quantificação da população bacteriana de *Ralstonia* spp. no solo são discutidos em estudos sobre sua sobrevivência. Dado que é uma bactéria que reside no solo, pesquisas relacionadas ao controle, epidemiologia e a flutuação populacional da doença dependem de técnicas capazes de detectar e quantificar a presença dessa bactéria nesse ambiente. De acordo com Granada e Sequeira (1983), é possível detectar a presença da bactéria no solo de maneira direta ou indireta. O método indireto envolve o plantio ou exposição de tecido vegetal suscetível, observando-se o surgimento da doença. Por outro lado, os métodos diretos incluem a utilização de meios seletivos, análises sorológicas, microscopia e técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Dentre os diversos métodos utilizados para avaliar a quantidade de bactérias no solo, um dos mais utilizados é a contagem de colônias em placas de Petri, onde se verifica a variação das condições utilizadas, principalmente relacionadas ao meio de cultura, a diluição do inóculo, a temperatura e o tempo de incubação.

5- OBJETIVOS

5.1. Geral:

Análise comparativa da sobrevivência no solo de isolados de *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*.

5.2. Específicos:

- Obter e recuperar os isolados de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* da Coleção de Culturas Rosa Mariano (CCRM);
- Testar a eficácia de meios de cultura para recuperação dos isolados do solo.
- Coletar solos de áreas de cultivo de tomateiro;
- Determinar o tempo de sobrevivência de diferentes isolados das duas espécies de *Ralstonia* no solo;
- Avaliar a sobrevivência no solo a diferentes temperaturas.

6- METODOLOGIA

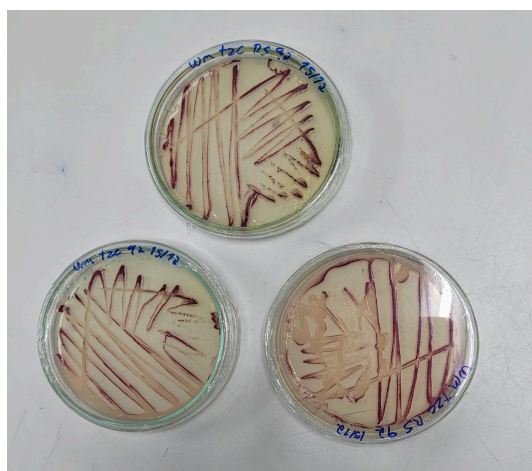
6.1. Obtenção de isolados de *Ralstonia* spp.

Os isolados de *R. solanacearum* (Filotipo II) e *R. pseudosolanacearum* (Filotipo I) provindos de solanáceas foram obtidos da Coleção de Culturas Rosa Mariano (CCRM) do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE SEDE. Os isolados da CCRM, que estavam preservados pelo método de Castellani (Figura 1) foram reativados em meio de cultura levedura-dextrose-ágar (NYDA) (23 g ágar nutritivo, 10 g glicose, 5 g extrato de levedura, 3 g extrato de carne, 5 g peptona, 1 L água) e purificados em meio de cultura Kelman (18 g ágar; 1 g caseína hidrolisada; 10 g peptona; 5 g glicose; 1000 mL água destilada) adicionado de 0,05 g de cloreto de 2, 3, 5-trifenil tetrazólio (TTC), sendo denominado de meio TZC. Entre os dois isolados trabalhados inicialmente, o isolado CCRMRs95 (*R. pseudosolanacearum*) e o CCRMRs92 (*R. solanacearum*), observou-se que o isolado CRMRs92 (Figura 2) apresentou maior dificuldade tanto na recuperação quanto na purificação quando comparado ao CRMRs95, exigindo, conseqüentemente, repetição do processo várias vezes, o que atrasou o andamento dos experimentos.

Figura 1. Isolados de *Ralstonia* spp. preservados na Coleção de Culturas Rosa Mariano (CCRM).



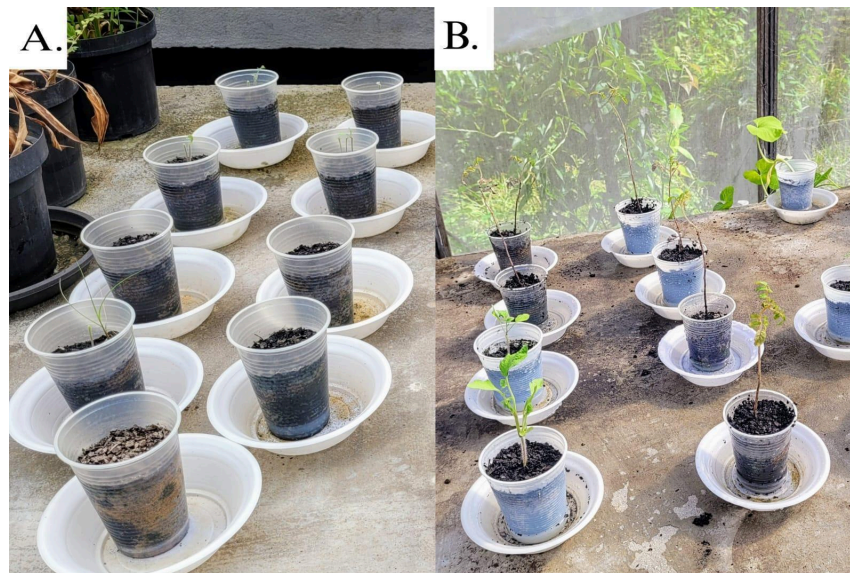
Figura 2. Isolado CCRM92 (*Ralstonia solanacearum*) cultivado em meio TZC.



6.2- Teste de patogenicidade dos isolados

As sementes de tomateiro da variedade Santa Cruz Kada foram inicialmente semeadas em copos plásticos com capacidade de 500 g, três sementes por célula, preenchidos com o substrato Basaplant[®]. Após enfrentar obstáculos na germinação, devido à interferência de insetos na casa de vegetação (Figura 3A), optou-se por empregar mudas de plantas de tomateiro provenientes da horta didática do Departamento de Agronomia da UFRPE/SEDE (Figura 3B). As plantas foram inoculadas quando atingiram aproximadamente 25 dias do transplântio ou quando apresentavam três a quatro folhas verdadeiras.

Figura 3. A) Primeira sementeira das sementes de tomateiro; B) Mudas de tomateiro transplantadas.



A inoculação foi efetuada por meio de uma incisão radicular em formato de meia lua, como auxílio de um bisturi, onde foram depositados 15 mL de suspensão bacteriana ajustada no espectrofotômetro ($A_{570} = 0,54$) o que equivale a uma concentração de 5×10^8 UFC/mL (Figura 4). Enquanto isso, as plantas testemunhas foram tratadas apenas com água destilada esterilizada (ADE). Em ambas as condições, as plantas foram mantidas em casa de vegetação (Figura 5) com irrigação diária por aproximadamente 15 dias, ou até a manifestação visível de sintomas.

Figura 4. Preparo da suspensão bacteriana para inoculação.



Figura 5. Plantas de tomateiro inoculadas com *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*, e tratadas apenas com água (testemunha), em casa de vegetação.



Ademais, após o período de 15 dias, o isolado CRMRS92 não induziu sintomas de murcha bacteriana visíveis nas plantas de tomateiro. Então, foi recuperado o isolado CCRMRS91 (*R. solanacearum*) e realizado o teste de patogenicidade.

6.3- Preservação dos isolados pelo método de Castellani (água destilada esterilizada)

O isolado recuperado CRMRS 95, que apresentou sintomas, passou pelo processo de reisolamento em tubos criogênicos com capacidade de 2 mL, contendo 1,5 mL de água destilada esterilizada (ADE) (Figura 6). Após a autoclavagem de 20 minutos a 120°C, o isolado cultivado por 48 h em NYDA e TZC teve sua massa bacteriana depositada nos tubos e preservados em temperatura ambiente.

Figura 6. Preservação do isolado CRMRS95 de *Ralstonia pseudosolanacearum* pelo método de Castellani.



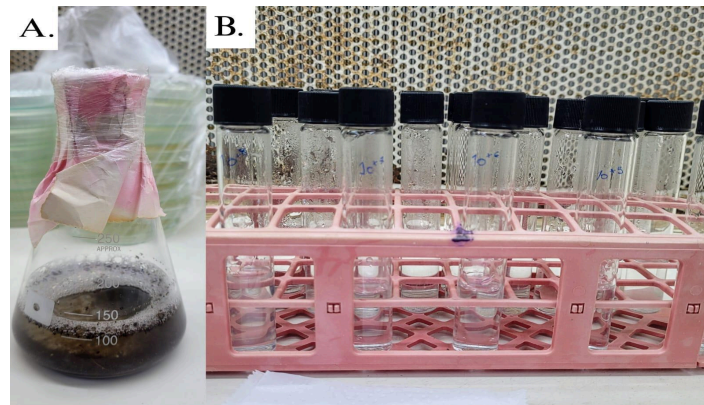
6.4- Eficácia de meios de cultura para recuperação de *Ralstonia* spp. do solo

Os meios de cultura TZC e NYDA foram avaliados quanto à sua eficácia na recuperação dos isolados do solo. O meio NYDA foi utilizado em substituição ao meio seletivo África do Sul – SMSA (10 g peptona; 5 g glicose; 1 g caseína hidrolizada; 12 g ágar bacteriológico; 1000 mL água destilada; 25 mg bacitracina; 100 mg sulfato de polimixina B (600.000 U); 5 mg of cloranfenicol; 0,5 mg penicilina G; 5 mg cristal violeta; 50 mg cloreto de 2, 3, 5-trifenil tetrazólio) (ELPHINSTONE *et al.*, 1996), uma vez que não foi possível adquirir todos os antibióticos.

Foram adicionados 9 gramas de solo peneirado (malha de 2mm) em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 1 mL de uma suspensão de *Ralstonia* spp., ajustada para concentrações de 1×10^8 e 1×10^4 UFC/mL (Figura 7), resultando em misturas finais correspondentes a aproximadamente 1×10^7 e 1×10^3 UFC/g solo. Após um período de repouso de 30 minutos, uma solução salina estéril (NaCl 0,85%) contendo Tween 80 foi adicionada para alcançar o volume total de 100 mL. A suspensão foi agitada a 150 rotações por minuto (rpm) durante 30 minutos, e diluições seriadas foram preparadas em tubos inicialmente contendo 9 mL também contendo solução salina estéril e Tween 80, variando de 10^{-1} a 10^{-5} . Uma alíquota de 100 μ L de cada concentração foi depositada em duplicatas em placas de Petri contendo o meio de cultura TZC ou NYDA, distribuídas uniformemente com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram então incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, e a contagem do número de colônias bacterianas nos meios seletivos foi determinada após 48 h de incubação, determinando o número de colônias presentes na placa de Petri. Foram consideradas apenas as contagens que variaram de 30 a 300 colônias.

Figura 7. A) Solo com suspensão de *Ralstonia* spp., solução salina estéril (NaCl

0,85%) e Tween 80; B) Diluições seriadas.



6.5- Sobrevivência de diferentes isolados de *Ralstonia* spp. no solo

6.5.1-Solo

O solo utilizado foi coletado na área de plantio situada na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizada em Brejão, município do estado de Pernambuco, Brasil. A área em questão já apresentou relatos de *R. solanacearum*, o agente causador da murcha bacteriana, o que a torna relevante para estudos sobre o manejo e controle de patógenos. Foram coletadas, de forma aleatória, subamostras de 3 kg de solo a uma profundidade de 0-20 cm. Após a coleta, as amostras foram secas ao ar em um ambiente coberto de casa de vegetação, durante um período aproximado de 15 dias (Figura 8). Após a secagem, o solo foi peneirado para a remoção de resíduos e armazenado para ser utilizado posteriormente.

Figura 8. Solo coletado e seco em ambiente controlado de casa de vegetação.

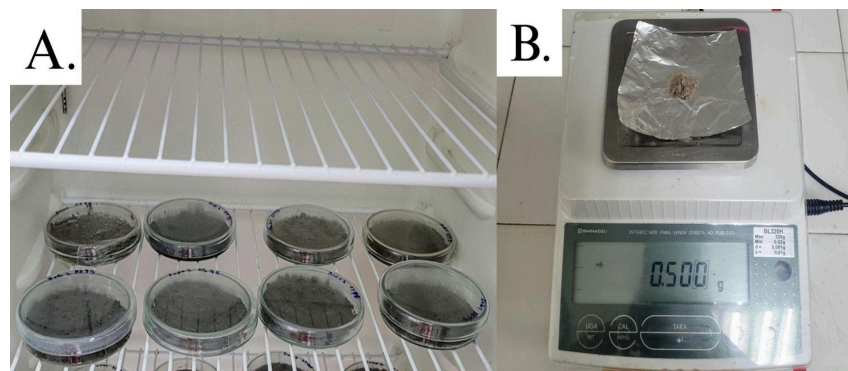


6.5.2- Teste de sobrevivência

Foram analisadas a sobrevivência de dois isolados (CCRMRS95 – *R. pseudosolanacearum* e CCRMRS206 - *R. solanacearum*) como células livres no solo, mediante a colocação de 50 g de solo em placas de Petri, seguida da adição de 12,5 mL de suspensão bacteriana com concentração de 5×10^8 UFC ml^{-1} , homogeneizados com o auxílio de um bastão de vidro. . As placas foram incubadas em B.O.D. em temperatura constante de 25°C (Figura 9). Para manter o mesmo teor de umidade ao longo das avaliações, as placas foram pesadas regularmente, e a água evaporada foi repostada com água destilada esterilizada (ADE). O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial (solos x isolados), com quatro repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri.

As avaliações foram realizadas em intervalos de cinco dias, até que, em duas avaliações consecutivas, não se detectasse a presença de colônias bacterianas. Em cada avaliação, 0,5 g de solo de cada uma das quatro placas foi adicionado a 4,5 mL de ADE em tubos. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas, inicialmente até 10^{-6} e, posteriormente, até 10^{-3} , e 100 μL das diluições foram plaqueados no meio de cultura TZC, com três repetições. As placas foram incubadas por 48 h a 30°C em B.O.D. Após a contagem do número de colônias, a população bacteriana foi determinada em UFC g^{-1} de solo. As variáveis analisadas para a sobrevivência bacteriana nos solos incluíram a duração da sobrevivência em dias e a área abaixo da curva da população (AACPOP), calculada conforme Shaner e Finney (1977). Em cada tratamento, quatro colônias típicas de *Ralstonia* spp. foram selecionadas e submetidas à coloração diferencial de Gram e ao crescimento em meio de cultura.

Figura 9. Placas com solo infestado com *Ralstonia solanacearum* ou *R. pseudosolanacearum*, incubadas na B.O.D. (A); amostra de solo pesada para análise (B).

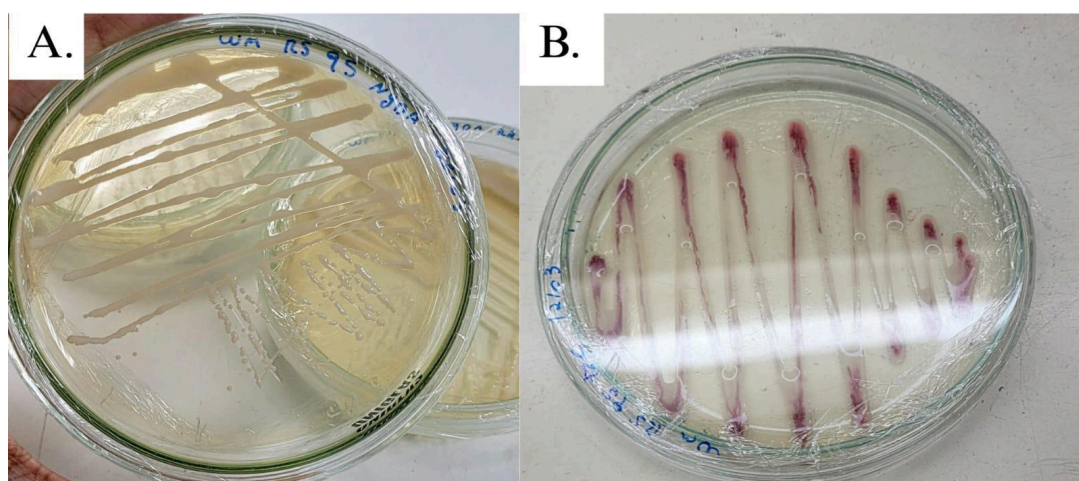


7- RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Obtenção e reativação dos isolados de *Ralstonia* spp.

Nos três isolados de *Ralstonia* spp. da CCRM reativados e utilizados na pesquisa, (CCRMRs95 – *R. pseudosolanacearum*, CCRMRs92 e CCRMRs 91- *R. solanacearum*), colônias brancas, fluidas e confluentes foram observadas no meio de cultura NYDA, enquanto no meio TZC foram observadas colônias brancas, fluidas, com o centro róseo (Figura 10). Destaca-se a dificuldade de reisolamento dos isolados CCRMRs92 e CCRMRs 91, devido a problemas de contaminação microbiana.

Figura 10. Crescimento de *Ralstonia pseudosolanacearum* CCRMrs95 nos meios de cultura NYDA (A) e TZC (B).



7.2. Teste de patogenicidade dos isolados

Nos testes de patogenicidade conduzidos em casa de vegetação, apenas as plantas de tomateiro inoculadas com o isolado CCRMRs95 (*R. pseudosolanacearum*) apresentaram sintomas de murcha (Figura 11A). Os isolados CCRMRs92 e CCRMRs91 não induziram sintomas de murcha bacteriana (*R. solanacearum*) (Figura 12), indicando que apesar de terem apresentado crescimento *in vitro* característicos de *Ralstonia*, perderam a patogenicidade. A perda da patogenicidade é um fenômeno que pode ocorrer durante o processo de estocagem dos isolados bacterianos.

Posteriormente foi recuperado o isolado CCRMRs206 de *R. solanacearum* para o teste de sobrevivência no solo, sendo este também submetido a teste de patogenicidade em tomateiro.

Figura 11. A) Planta de tomateiro inoculada com o isolado CCRMRs95 de *Ralstonia pseudosolanacearum*, apresentando sintoma de murcha bacteriana; B) Teste de copo evidenciando fluxo bacteriano.

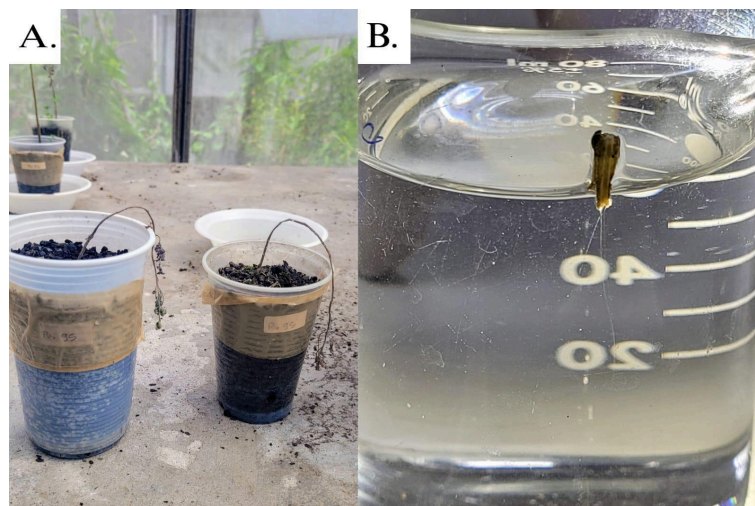


Figura 12. Plantas de tomateiro inoculadas com o isolado CRMRs91 de *Ralstonia solanacearum* e com água destilada esterilizada (testemunha), em casa de vegetação, mostrando a ausência de murcha bacteriana.



Os sintomas de murcha são observados porque *Ralstonia* spp. invade os espaços intercelulares do córtex da raiz, colonizando-os inteiramente, e também coloniza o parênquima vascular, onde se multiplica e é transportada pelos vasos do xilema para todas as partes da planta, juntamente com a água e os nutrientes (Alvarez; Biosca; López, 2010; Liu *et al.*, 2005; Saile *et al.*, 1997). Em decorrência da colonização sistêmica dos vasos do xilema, o fluxo de seiva pode ser parcial ou totalmente bloqueado, impedindo que água e nutrientes absorvidos pelo sistema radicular supram a parte aérea da planta. A murcha observada é resultante do desequilíbrio hídrico causado pela obstrução dos vasos e a formação de tiloses pela planta em resposta à colonização pela bactéria (Hikichi *et al.*, 2007).

Para confirmar se a murcha observada nos tomateiros era causada por *Ralstonia* spp., foi realizado o teste do copo. Esse teste consistiu em cortar uma porção da parte inferior do caule de uma planta doente e colocá-la submersa em um frasco transparente contendo água limpa. Observou-se a exsudação de um líquido esbranquiçado com aspecto mais espesso que a água saindo do tecido em direção ao fundo do copo, sinal da presença da bactéria (Figura 11B). Seguindo os postulados de Koch, a bactéria foi reisolada em meio NYDA e purificada no meio TZC (Lopes; Rossato, 2013).

7.3 - Eficácia de meios de cultura para recuperação de *Ralstonia* spp. do solo

Verificou-se a recuperação de *R. pseudosolanacearum* (CCRMrs95) nos dois meios de cultura TZC e NYDA, porém a concentração da bactéria no solo teve influência na recuperação da bactéria, obtendo-se o maior número de colônias quando o

solo foi infestado com a maior concentração da bactéria (1×10^7 UFC/g) (Tabela 1). O maior número de colônias bacterianas foi observado nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} , não sendo detectado crescimento nas diluições de 10^{-4} e 10^{-5} , em ambos os meios de cultura. O melhor meio de cultura para recuperação de *R. pseudosolanacearum* do solo foi o meio TZC. Neste meio as colônias apresentaram maior tamanho, forma mais nítida e menos contaminações. Além disso, o meio NYDA demonstrou dificuldades na identificação da bactéria *Ralstonia*, dificultando o processo de contagem de colônias, e também apresentou maior crescimento de outros patógenos. *Ralstonia* é uma bactéria que sobrevive no solo por longos períodos em grandes profundidades (Lopes *et al.*, 1994) e, portanto, a escolha de um meio de cultura adequado para recuperação da bactéria no solo é importante para que estudos de sobrevivência sejam realizados.

Tabela 1. Número de unidades formadoras de colônias recuperadas em meio de cultura a partir de solos infestados com suspensão de *Ralstonia pseudosolanacearum* (CCRMRs95) em duas concentrações, após 48 horas.

Diluição plaqueada	Concentração da suspensão bacteriana/ Meio de cultura			
	10 x 10 ⁷ UFC/g solo		10 x 10 ³ UFC/ g solo	
	TZC	NYDA	TZC	NYDA
10 ⁻¹	262	38	91	14
10 ⁻²	146	73	15	8
10 ⁻³	16	17	0	1
10 ⁻⁴	1	0	0	0
10 ⁻⁵	0	0	0	0

7.4- Sobrevivência de diferentes isolados de *Ralstonia* spp. no solo

Devido às circunstâncias de acesso ao material, foi utilizado apenas um tipo de solo para a realização do experimento. A duração da sobrevivência dos isolados CCRMRs95 (*R. pseudosolanacearum*) e CCRMRs206 (*R. solanacearum*, até o momento, foi de 29 e 22 dias, respectivamente (Tabela 2), demonstrando uma maior capacidade adaptativa do isolado de *R. pseudosolanacearum*. Não existem estudos de

Obtenção de isolados de <i>Ralstonia</i> spp.	X	X										
Eficácia de meios de cultura para recuperação de <i>Ralstonia</i> spp. do solo		X	X	X								
Sobrevivência de diferentes isolados de <i>Ralstonia</i> spp. no solo				X	X	X	X					
Sobrevivência de <i>Ralstonia</i> spp. no solo a diferentes temperaturas								X	X	X	X	
Elaboração de relatório							X					X

X - Atividades executadas

OBSERVAÇÃO: a bolsista substituiu a discente Stefany Mendes da Silva, iniciando as atividades em novembro de 2023, tendo que reiniciar o projeto, o que justifica a não ter sido possível realizar todas as atividades do plano de trabalho.

9- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A concentração de *Ralstonia pseudosolanacearum* no solo afetou a taxa de recuperação, com pouco crescimento nas diluições mais baixas. A concentração mais alta, 1×10^7 UFC/g, resultou na recuperação de maior número de colônias, com o meio de cultura seletivo TZC mostrando resultados superiores em relação ao meio NYDA. No meio NYDA foi difícil a identificação de *R. pseudosolanacearum* e promoveu o crescimento de outros microrganismos. Na análise comparativa da sobrevivência de *R. solanacearum* (CCRMRs206) e *R. pseudosolanacearum* (CCRMRs95) no solo utilizando o meio TZC, verificou-se uma maior capacidade adaptativa do isolado de CCRMRs95 que sobreviveu até o momento por 29 dias, com Área Abaixo da Curva da População (AACPOP) de $3,10 \times 10^3$ UFC/ g solo), em detrimento do isolado

CCRMRS206 (22 dias; $4,34 \times 10^3$ UFC/ g solo). Área Abaixo da Curva da População (AACPOP)

10- ATIVIDADES RELEVANTES DESENVOLVIDAS PELO BOLSISTA

-

11- DIFICULDADES ENCONTRADAS

- Iniciar as atividades do projeto só em meados de novembro de 2023, por estar substituindo outra bolsista, o que impossibilitou cumprir o cronograma;

- A recuperação dos isolados de *Ralstonia solanacearum* (CRMRS 92 e CRMRS91) devido a problemas de contaminação e posterior perda de patogenicidade dos isolados;

- A falta de antibióticos para o meio de cultura seletivo África do Sul – SMSA e consequentemente a sua troca pelo meio NYDA;

- A interação dos fatores abióticos da casa de vegetação, que influenciou na obtenção das mudas e patogenicidade dos isolados, o que levou a repetição dos experimentos.

12- PARECER DO ORIENTADOR

A bolsista Winny Vitória Alves Barbosa apresentou boa capacidade de condução dos experimentos, sempre atenta aos detalhes e procurando tirar dúvidas. Iniciou as atividades em meados de novembro de 2023, uma vez que substituiu a discente Stefany Mendes da Silva, motivo pelo qual não desenvolveu todas as atividades previstas no cronograma do plano de trabalho. Além disso, teve dificuldades no cultivo da bactéria fitopatogênica e nos experimentos em casa de vegetação devido a fatores abióticos. Ressaltasse a disponibilidade da bolsista em colaborar nas atividades desenvolvidas no laboratório por alunos de graduação e pós-graduação.

13- REFERÊNCIAS

ALVAREZ, B.; BIOSCA, E. G.; LOPEZ, M. M. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. In: MENDEZ-VILAS, A. (ed.). **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. 2. ed. Badajoz: Formatex, 2010. v. 1, p. 267-279.

BRITO JUNIOR, F. P. Produção de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) reutilizando substratos sob cultivo protegido no município de Iranduba-AM. 2012. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/80343/1/BritoJr-prod-tomate.pdf>>. Acesso em Abril de 2024.

ELPHINSTONE, J. G. Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in cool climates. **Potato Research**, v. p. 39:403-410, 1996.

EPAGRI - EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. **Números da agropecuária Catarinense**. Florianópolis: Epagri/Cepa, 2018. 75p. (DOCUMENTOS, 277).

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the "Ralstonia solanacearum species complex"? In: ALLEN, C.; PRIOR P.; HAYWARD A. C. (Ed). **Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex**. St. Paul: APS Press, 2005, p. 449-461.

FELIX, K. C. S.; SOUZA, E. B.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Survival of *Ralstonia solanacearum* in infected tissues of *Capsicum annuum* and in soils of the state of Pernambuco, Brazil. **Phytoparasitica**, v. 40, p. 53-62. 2012.

GRANADA, G. A.; SEQUEIRA, L. A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease**, v. 67, p. 1084-1088, 1983.

HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 65-87, 1991.

HIKICHI, Y.; YOSHIMUCHI, T.; TSUJIMOTO, S.; SHINOHARA, R.; NAKAHO, K.; KANDA, A.; KIBA, A.; OHNISHI, K. Global regulation of pathogenicity mechanism of *Ralstonia solanacearum*. **Plant Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 149-154, 2007.

IBGE. **Produção Agropecuária**. 2022. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/tomate/br>>. Acesso em: 14 abr 2024.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M.; MELO, P. E. Differential resistance of tomato cultigens to biovars I e III of *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease**, v. 78, p. 1091-1094, 1994.

LOPES, C. A.; ROSSATO, M. History and Status of Selected Hosts of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex Causing Bacterial Wilt in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1228, 2018.

LIU, H. L.; ZHANG, S. P.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. Pyramiding, unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall degrading enzymes contribute to virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, n. 12, p. 1296-1305, 2005.;

MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P. *et al.* Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, p. 614–629. 2012. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x

SAILE, E.; MCGARVEY, J.; SCHELL, M.; DENNY, T. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, v. 87, n. 12, 1264–71, 1997.

SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P. *et al.* Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as

Ralstonia syzygii subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3087-3103, 2014.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3.0 ed. Minnesota: American Phytopathological Society, 2001. 373p.

SANTIAGO, THAÍS RIBEIRO; LOPES, CARLOS ALBERTO; CAETANO-ANOLLÉS, GUSTAVO; MIZUBUTI, EDUARDO S. G. Genetic Structure of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia pseudosolanacearum* in Brazil. **Plant disease**, [S. l.], v. 104, n. 4, p. 1019–1025, 2020. DOI: 10.1094/PDIS-09-19-1929-RE

Assinatura do Orientador

Assinatura do Aluno