

***Ralstonia spp.:* TÉCNICAS DE ISOLAMENTO, CULTIVO E INOCULAÇÃO**

TAUANE SANTOS BRITO¹
LETÍCIA DELAVALENTINA ZANACHI¹
RENAN PAN¹
ODAIR JOSÉ KUHN¹

¹ Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus Marechal Candido Rondon, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Marechal Candido Rondon, Paraná.

Autor para correspondência: tauane.brito@unioeste.br

Resumo: Presente naturalmente no solo algumas bactérias do gênero *Ralstonia* são causadoras da doença murcha-bacteriana em culturas de importância econômica, em especial as participantes da família das Solanaceae e Musaceae. Esta revisão objetivou abordar de modo preliminar, os métodos de isolamento, cultivo, inoculação e de avaliação, que são mais utilizados para a identificação da murcha-bacteriana em plantas infectadas. O método de isolamento indicado para *Ralstonia spp.*, inicia com a obtenção de uma suspensão bacteriana, a partir da exsudação leitosa de caules contaminados, em água destilada e esterilizada, para posterior semeadura em meio de Kelman, com adição de cloreto de tetrazólio a 28°C. As técnicas de inoculação devem considerar às relações patógeno-hospedeiro, adaptadas de acordo com o objetivo da pesquisa a ser realizada. Essas técnicas podem variar, destacando-se à via pulverização, via injeção da suspensão bacteriana no organismo vegetal, ou via cortes prévios em mudas e raízes para posterior imersão em suspensão bacteriana. Para avaliar a presença da bactéria em plantas contaminadas, a principal metodologia se baseia no teste de exsudação em gota d'água, onde fragmentos do material contaminado são colocados em gotas de água para observação em microscópio, buscando verificar se há ou não exsudação de pus bacteriano. Contudo, a identificação de plantas infectadas por *Ralstonia spp.*, não pode ser fundamentada em um parâmetro específico, como, por exemplo, a exsudação bacteriana, pois alguns outros patógenos podem fazê-lo. Assim, deve-se analisar outros fatores, antes de ser emitido o diagnóstico definitivo.

Palavras-chave: Exsudação radicular, meio de cultivo Kelman, murcha-bacteriana, *Ralstonia*

***Ralstonia spp.:* METHODS ON ISOLATION, CULTIVATION AND INOCULATION**

Abstract: Naturally present in the soil or in tissues of host plants, some bacteria from the genus *Ralstonia* are responsible for causing the bacterial wilt disease in economic crops, in special the ones from the *Solanaceae* and *Musaceae* family. This review aimed to approach preliminarily the methods of isolation, cultivation, inoculation and evaluation, that are most commonly used for the

identification of the bacterial wilt in infected plants. The isolation method indicated for *Ralstonia* spp., starts with the obtainment of a bacterial suspension, from the milky exudation of contaminated stems, in distilled water and sterilized, for posterior replication in Kelman medium, with addition of tetrazole chloride at 28°C. The inoculation techniques must consider the host-pathogen relations, adapted according to the aim of the research to be carried. These techniques may vary, highlighting the spraying, the injection of the suspension in the plant organism, or via previous cuts in saplings or roots for posterior immersion in a bacterial suspension. To evaluate the presence of the bacteria in contaminated plants, the main methodology is based in the water drop exudation test, where fragments of the contaminated material are placed into water drops for observation in microscope, searching to verify if there is or not exudation of bacterial pus. However, the identification of plants infected by *Ralstonia* spp., cannot be based in only one specific parameter as, for example, the bacterial exudation, because other pathogens are also capable of doing it. Thus, other factors must be evaluated before the emission of the final diagnose.

Key words: Root exudation, Kelman culture medium, bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*.

INTRODUÇÃO

Ralstonia spp., é uma bactéria pertencente ao grupo das gram-negativas, naturalmente presente no solo e em plantas voluntárias, causadora da murcha-bacteriana em mais de 50 espécies de plantas (COSTA; FERREIRA; LOPES, 2007). As culturas de importância econômica mais afetadas são as pertencentes à família das Solanaceae (tomate, batata, pimentão, berinjela e jiló), que são suscetíveis principalmente a *Ralstonia solanacearum* Smith (YABUUCI et al., 1995). Entretanto, esta mesma bactéria pode causar danos significativos em plantas pertencentes a família Musaceae (principalmente em bananeiras) (BRINGEL; TAKATSU; UESUGI, 2001).

A infecção bacteriana na planta hospedeira ocorre principalmente via raízes lesionadas, aberturas naturais e locais de emergência de radículas. A *Ralstonia* spp., é disseminada a longas distâncias por vias diversas, principalmente por meio de material vegetal contaminado para plantio, como mudas e caules diversos. Por outro lado, a curtas distâncias, ou seja, entre e dentro de propriedades agrícolas, dentre os meios de disseminação destacam-se a água de irrigação, uso de ferramentas e/ou

equipamentos contaminados durante práticas agrícolas, insetos polinizadores e outros, além de ações antrópicas (ALFENAS ET AL., 2006; MAFIA et al., 2012).

A incidência da doença pode inviabilizar o cultivo de várias espécies de plantas em regiões de clima temperado, tropical ou subtropical e, por ser favorecida por condições de alta temperatura e umidade, em especial em cultivos em estufa, quando manejados de maneira inadequada (alta densidade de plantas, ciclo irrigação inadequado, solos mal drenados, etc), o que pode resultar em altos níveis de infecção e conseqüentes perdas (NETTO et al., 2004).

O principal sintoma da murcha-bacteriana, a murcha drástica das plantas, é do tipo secundário, ou seja, ocorre afastado do local onde o patógeno está atuando. Também típico, é a exsudação de pus bacteriano que flui densamente dos vasos condutores de seiva, ao se seccionar a haste pouco acima do colo (± 10 cm). O pus é o sinal da doença e indica a presença do agente causal, a bactéria. Associado ao pus bacteriano se observa o escurecimento dos vasos, visto mais claramente por meio de

uma secção longitudinal da haste, sendo este o sintoma primário da doença, pois ocorre associado à presença do patógeno. Pode-se ainda observar necroses nas folhas basais ascendentes e nas lenhosas, consequências da infecção vascular de *Ralstonia spp* (ALFENAS et al., 2006). O teste da exsudação de pus bacteriano nas marchas bacterianas foi relatado no Brasil por

Drummond-Gonçalves (1948), fitopatologista do Instituto Biológico de São Paulo.

Diante do exposto, esta revisão teve por objetivo abordar, de modo preliminar, os métodos de isolamento, cultivo, inoculação e de avaliação que são mais utilizados para a identificação da marchas bacterianas em plantas infectadas.

MÉTODO DE ISOLAMENTO E CULTIVO DE *Ralstonia spp.*,

O método mais indicado para realização do isolamento de *Ralstonia spp.*, é a partir de uma suspensão bacteriana, obtida do pus exsudado de plantas doentes, que tem consistência leitosa e que é exsudado de porções de tecidos, principalmente do interior do caule (haste) da planta infectada, quando colocadas em contato com água. Para o isolamento, a água deve ser destilada e esterilizada.

Porém, antes de se retirar as porções de tecidos para o isolamento, os segmentos do caule da planta infectada devem ser desinfestados por meio da lavagem com água e sabão (ALFENAS et al., 2006) para eliminação de partículas aderentes do solo e de outras possíveis fontes de contaminação.

Após esse procedimento, com o auxílio de um bisturi esterilizado, devem ser retirados da região do caule infectado pequenas porções do material vegetal, em torno de 1-2 cm, e depositados em gotas de água destilada esterilizada, em placa de Petri estéril, e deixados em repouso durante aproximadamente 5 minutos (ALFENAS et al., 2006).

Depois desse período, como o auxílio de alça de platina estéril, deverá ser realizada a transferência de alíquotas da suspensão bacteriana resultante para placas de Petri contendo o meio de Kelman com cloreto de tetrazólio (MAFIA; ALFENAS;

FERREIRA, 2014), utilizando-se o método de semeadura em estrias paralelas (BARRETI et al., 2008).

O meio Kelman é o meio mais comum para o isolamento de *R. solanacearum* (KELMAN, 1983; BARRETTI; DE SOUZA; POZZA, 2008). Não se trata de um meio seletivo, entretanto, este auxilia no momento de identificação das colônias virulentas das avirulentas. Colônias avirulentas são totalmente vermelhas enquanto que as virulentas possuem centro avermelhado e bordas brancas (KELMAN, 1983).

Após realização da semeadura, as placas deverão ser incubadas por 48 horas em temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, na ausência de luz. Posteriormente, colônias isoladas com características típicas de *Ralstonia spp* devem ser repicadas para tubos de ensaio, contendo o mesmo meio de cultura (ALFENAS et al., 2006).

As culturas bacterianas isoladas em meio Kelman devem ser preservadas em glicerina a -80°C . Para o uso experimental, as bactérias deverão ser transferidas para placas de Petri, contendo o mesmo meio de cultura do isolamento, e incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em câmara de crescimento, durante 48 horas, para posterior preparo de suspensões bacterianas (BARRETTI; DE SOUZA; POZZA, 2008).

TÉCNICAS DE INOCULAÇÃO

As técnicas de inoculação com o patógeno nas culturas susceptíveis devem levar em consideração outros fatores que possam interferir na relação bactéria-hospedeiro, indo além do que se deseja analisar, evitando mascarar os resultados. Esses fatores são variados e devem ser considerados de acordo com o objetivo da pesquisa a ser realizada. Entre esses fatores, encontram-se, primeiramente, temperatura ambiente, seguido da umidade, genoma da planta, isolado bacteriano etc. Uma correta inoculação artificial em culturas suscetíveis permite avaliar de maneira segura a atuação da bactéria patogênica sobre o organismo vegetal, assim como auxilia na escolha das melhores técnicas de controle e manejo da doença.

O meio de cultura Kelman, com ou sem tetracéol, é frequentemente utilizado para a preparação do inóculo de *Ralstonia* spp. (COSTA et al., 2007; GURJAR et al., 2013; LOPES; BOITEUX; ESCHENBACK, 2015; MAFIA et al., 2014). Entretanto, a bactéria pode se desenvolver satisfatoriamente em outros meios como em BDA (Batata-Dextrose-Ágar) (AMORIM et al., 2011), Nutriente-Ágar (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2008), 523 sólido (BRINGEL et al., 2001; ROCHA; MOURA, 2013), entre outros.

O crescimento da cultura-inóculo em meio de cultura ocorre entre 24 à 48 horas, à 28°C (AMORIM et al., 2011; LOPES et al., 2015; SILVA et al., 2008). Posteriormente, colônias típicas do patógeno são diluídas em água estéril, ou água salina (0,85%), formando uma suspensão bacteriana. Em seguida, ajusta-se, por meio de densidade óptica até 10^8 UFC mL⁻¹, com auxílio de espectrofotômetro (AMORIM et al., 2011; MAFIA et al., 2014; ROCHA; MOURA, 2013).

Os métodos de aplicação do inóculo na planta (inoculação) são variados. A

suspensão bacteriana pode ser pulverizada ou nebulizada com um *spray*, sobre raízes de mudas (com idade variável em função da espécie), previamente retiradas de bandejas, gastando-se, aproximadamente, 5 ml por planta. Em seguida é realizado, de imediato, o transplante das mesmas para vasos com substrato, estes previamente esterilizados (LOPES et al., 2015). Outra forma de inoculação das plantas ocorre por meio da injeção, onde a suspensão é injetada em rizomas saudáveis de mudas e de folhas carnosas, a exemplo de bananeira e fumo, respectivamente, com auxílio de agulha de injeção, avaliando-se, posteriormente, o aparecimento de sintomas (AMORIM et al., 2011).

Outra técnica de inoculação consiste em realizar o corte das extremidades das raízes de mudas e realizar a inoculação das mesmas por imersão em suspensão de 10^8 UFC mL⁻¹ de *Ralstonia* spp., durante 30 minutos (AMORIM et al., 2011). A inoculação pode ser realizada também por meio de um alfinete entomológico, onde 10 µL de suspensão bacteriana é introduzido em um ferimento causado pelo alfinete no caule das plantas em estudo (SILVA et al., 2008). Este mesmo procedimento pode ocorrer com o auxílio de uma faca, estilete ou tesoura de poda (MAFIA et al., 2014; ROCHA; MOURA, 2013). É importante salientar que estes equipamentos são responsáveis por disseminar a bactéria no campo em culturas já instaladas.

Por fim, existe uma técnica efetiva de inoculação fundamentada em observações obtidas em viveiros de produtores de clones de eucalipto. Conforme Mafia et al. (2014) a técnica consiste em mudas com sessenta dias de idade, terem sido transplantadas, após terem um terço da porção basal do sistema radicular removido, para uma estrutura pré-fabricada de calhas dispostas lateralmente, com inclinação negativa de 1% e

preenchidas com substrato, que recebendo a cada quinze dias, uma suspensão do inoculo, ajustada também para 10^8 UFC mL⁻¹.

As técnicas de inoculação de *Ralstonia* spp., são variadas e devem ser definidas de acordo com o objetivo da pesquisa. Destaca-se, entretanto, que o patógeno apresenta maior eficiência quando inoculado via injeção do inoculo no caule ou imersão do sistema radicular ferido na suspensão bacteriana. Ainda, a aferição correta do inoculo é essencial para que a precisão experimental seja adequada.

Para diagnóstico da murcha-bacteriana, deve-se realizar o teste de exsudação de pus em gota d'água. Para isto, fragmentos em torno de 25 mm² de superfície e um (01) mm de espessura são retirados de tecidos internos da parte inferior do caule da planta doente, conforme já mencionado. Estes fragmentos são depositados sobre gotas de água por cerca de 1 a 2 minutos. Em seguida, devem ser observados ao microscópio de luz, para ser verificado se há ou não exsudação de pus bacteriano (MAFIA et al., 2012). Caso ocorra, trata-se de uma murcha-bacteriana, porém não se pode garantir se é causada por *Ralstonia* spp.,

Contudo, existem ainda outras características que identificam a presença ou não de *Ralstonia* em uma cultura. Em

viveiro, a contagem do número de mini cepas (tendência á murcha e lesões nas folhas), propágulos vegetativos e mudas infectadas e destruídas, é utilizada para determinar o nível de dano econômico causado pela infecção da doença (ALFENAS et al., 2006; MAFIA et al., 2012).

As plantas podem ser avaliadas pela presença ou ausência de sintomas externos, como murchas foliares e morte de mudas. No caso de mudas, é ainda realizada a confirmação, por meio de identificação microscópica de exsudação de pus bacteriano (MAFIA et al., 2014, 2012).

Mensurar lesões com o auxílio de régua graduada e identificar a forma dessas lesões, além do cultivo de fragmentos coletados de plantas infectadas em meio de cultura para posterior análise em teste sorológico de Elisa, são alternativas de avaliações rápidas para a detecção da bacteriose causada por *Ralstonia* spp., (MAFIA et al., 2012).

A identificação da bacteriose em raízes pode ser realizada por plaqueamento de plantas infectadas, pelo método de maceração de fragmentos contaminados com água salina, com posterior avaliação das colônias bacterianas formadas após determinado período em meio de cultura adequado (BRINGEL et al., 2001).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o isolamento da bactéria *Ralstonia* spp o método mais indicado é a partir da suspensão leitosa que exsuda de pequenas porções da planta infectada, quando colocadas em contato com água destilada esterilizada;

O meio de cultura mais recomendado para o isolamento *R. solanacearum* é o meio Kelman com cloreto de tetrazólio, um meio não seletivo, mas que

auxilia no momento da identificação das colônias da bactéria;

Para o processo de inoculação, tempos e temperaturas são semelhantes nos trabalhos analisados (48 horas e 28°C). O meio de cultura pode variar de acordo com o experimento, mas não interferem na população do inoculo a ser utilizado nem no método de quantificação. Populações 10^8 UFC mL⁻¹ mostram-se eficientes para inoculação realizada por diferentes técnicas

e o uso de espectrofotometria para a adequação da solução e uma técnica prática e rápida;

A identificação de plantas infectadas (diagnóstico da murcha-bacteriana) por *Ralstonia* spp., não pode ser focada em um

parâmetro específico, como, por exemplo, exsudação bacteriana, pois outros patógenos liberam esse sinal. Assim, deve-se reunir outros fatores decisivos antes de ser emitido um diagnóstico, reduzindo-se, conseqüentemente, erros na pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) pelo suporte acadêmico. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; SARTÓRIO, R. C.; BINOTI, D. H. B.; SILVA, R. R.; LAU, D.; VANETTI, C. A. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 31: 357–366. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000400005>. Acesso em: 13 maio 2020.

AMORIM, E. P. DA R.; ANDRADE, F. W. R. DE; MORAES, E. M. DA S.; SILVA, J. C. DA; LIMA, R. DA S.; LEMOS, E. E. P. DE. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Ralstonia solanacearum* em mudas de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 33: 392–398. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000500050>. Acesso em: 13 maio 2020.

BARRETTI, P. B.; DE SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição in vitro de *Ralstonia solanacearum*. **Ciencia e Agrotecnologia**, 32: 731–739. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000300005>. Acesso em: 13 maio 2020.

BRINGEL, J. M. M.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H. Colonização radicular de plantas cultivadas por *Ralstonia solanacearum* biovars 1, 2 e 3. **Scientia Agricola**, 58: 497–500. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162001000300010>. Acesso em: 13 maio 2020.

COSTA, S. B.; FERREIRA, M. A. S. V.; LOPES, C. A. Diversidade patogênica e molecular de *Ralstonia solanacearum* da região amazônica brasileira. **Fitopatologia Brasileira**, 32: 285–294. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000400002>. Acesso em: 13 maio 2020.

DRUMMOND-GONÇALVES, R. Bacteriose da mandioca. **O Biológico**, 14: 145-146. 1948.

GURJAR, M. S.; SAGAR, V.; BAG, T. K.; SINGH, K. S.; SHARMA, S.; SINGH, B. P.

Biovar distribution of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt/brown rot of potato in Meghalaya hills. **Journal of Mycopathological Research**, 51: 267–272. 2013. Disponível em: <https://bityli.com/Jdt9L>. Acesso em: 13 maio 2020.

KELMAN, A. The relationship or pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, 44: 693-695. 1983.

LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S.; ESCHEMBACK, V. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira**, 33:1 125–130. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-053620150000100020>. Acesso em: 13 maio 2020.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, M. A. Avaliação da resistência do eucalipto à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. **Revista Árvore**, 38: 649–656. 2014. Disponível em: <https://bityli.com/PIBMz>. Acesso em: 13 maio 2020.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; PENCHEL FILHO, R. M.; FERREIRA, M. A.; ALFENAS, R. F. Murcha-bacteriana: disseminação do patógeno e efeitos da doença sobre a clonagem do eucalipto. **Revista Árvore**, 36: 593–602. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622012000400002>. Acesso em: 13 maio 2020.

NETTO, R.; PEREIRA, B.; NODA, H.; BOHER, B. Murcha bacteriana no estado do Amazonas, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 29: 20–23. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000100004>. Acesso em: 13 maio 2020.

ROCHA, D. J. A.; MOURA, A. B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, 38: 423–430. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013005000025>. Acesso em: 13 maio 2020.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*: aspectos bioquímicos e biomassa vegetal. **Summa Phytopathologica**, 34: 137–144. 2008.

YABUUCHI, E.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y.; KOSAKO, Y. Transfer of Two *Burkholderia* and an Alcaligenes Species to *Ralstonia* Gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) Comb. No. **Microbiology And Immunology**, 39: 897–904. 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x>. Acesso em: 13 maio 2020.