

PROJETO ARCA

Murcha Bacteriana por *Ralstonia solanacearum*

Protocolo de Investigação Epigenética, Metagenômica do Solo
e Estratégia de Manejo Baseada em Microbioma Supressor

Welson Perli Pereira

Projeto ARCA | Bahia, Brasil | Junho de 2026

1. RALSTONIA SOLANACEARUM — O PATÓGENO

1.1 Por Que a Ralstonia é Diferente de Tudo

A *Ralstonia solanacearum* não é um fungo — é uma bactéria do solo considerada o patógeno vegetal mais devastador em regiões tropicais e subtropicais. Ela causa a Murcha Bacteriana, e sua combinação de características a torna excepcionalmente difícil de combater:

Característica	Detalhe	Implicação para Manejo
Tipo de patógeno	Bactéria gram-negativa do solo	Fungicidas são ineficazes — exige abordagem diferente
Via de entrada	Raízes (ferimentos, zonas de emergência de raízes laterais)	Manejo do solo é mais crítico que tratamento foliar
Modo de ação	Coloniza e bloqueia o xilema (vasos de água)	Planta murcha por colapso vascular — não por necrose foliar
Sobrevivência no solo	Décadas sem hospedeiro ativo	Rotação de culturas convencional é insuficiente
Temperatura ótima	24–35°C com alta umidade	Nordeste e Bahia = zona de risco máximo permanente
Raças e biótipos	Mais de 50 estirpes genéticas distintas	Resistência a uma raça não garante resistência a outras
Controle químico	Nenhum antibiótico agrícola eficaz registrado no Brasil	Controle biológico e genético são as únicas saídas reais

1.2 Como a Ralstonia Ataca — Passo a Passo

CICLO DE INFECÇÃO DA RALSTONIA
<p>FASE 1 — ENTRADA (Dia 1–3)</p> <p>Bactéria no solo detecta exsudatos radiculares (açúcares, aminoácidos)</p> <p>Nada quimiotropicamente em direção às raízes</p> <p>Penetra por ferimentos, junções de raízes laterais ou estômatos radiculares</p>
<p>FASE 2 — COLONIZAÇÃO DO CÓRTEX (Dia 3–7)</p> <p>Multiplica-se no espaço apoplástico do córtex radicular</p> <p>Ainda sem sintomas visíveis na parte aérea</p> <p>Produce enzimas que degradam parede celular (pectinases, celulasas)</p>
<p>FASE 3 — INVASÃO DO XILEMA (Dia 7–14)</p> <p>Penetra nos vasos do xilema — circulação sistêmica</p>

Produce exopolissacarídeos (EPS) que bloqueiam fisicamente os vasos
Primeiros sintomas: murcha nas horas mais quentes do dia

FASE 4 – COLAPSO VASCULAR (Dia 14-21)

Vasos do xilema completamente obstruídos
Murcha irreversível mesmo com irrigação
Tecido vascular marrom ao corte transversal do caule
Exsudato bacteriano leitoso visível na água – diagnóstico definitivo

FASE 5 – RETORNO AO SOLO

Planta morta libera bilhões de bactérias de volta ao solo
Bactéria sobrevive em restos culturais e solo por décadas

1.3 Diagnóstico em Campo — Teste Rápido

Antes de qualquer análise molecular, o teste de campo confirma a *Ralstonia* em minutos:

TESTE DO COPO D'ÁGUA (DIAGNÓSTICO IMEDIATO)

Material: copo com água limpa, faca limpa

1. Cortar o caule da planta suspeita transversalmente
2. Observar o tecido vascular – se marrom/escuro: suspeita alta
3. Mergulhar o corte em copo com água limpa
4. Aguardar 30-60 segundos

Resultado positivo para *Ralstonia*:

- Fio leitoso/esbranquiçado saindo do tecido vascular
- Esse 'fio' são milhões de bactérias se dispersando na água

Resultado negativo:

- Água permanece clara – murcha pode ser por outro agente (estresse hídrico, *Fusarium*, nematoide)

Confirmação molecular: MinION sequencia o exsudato diretamente

- Identifica raça e biótipo específico em 24-48 horas

2. MECANISMO MOLECULAR DA SUSCETIBILIDADE

2.1 Sistema de Secreção Tipo III — A Arma Principal da Ralstonia

A Ralstonia possui um sistema de secreção tipo III (T3SS) — uma 'seringa molecular' que injeta diretamente dentro das células da planta aproximadamente 70 proteínas efetoras. Cada efector tem uma função específica de supressão da imunidade vegetal:

Efector Principal	Alvo na Planta	Efeito na Defesa
RipE1 (PopA)	Guardas imunes do xilema	Suprime resposta hipersensível — célula não se sacrifica
RipG1-G7	Via ubiquitina-proteassoma	Degrada proteínas de defesa da planta
RipAA / RipAB	Via do ácido jasmônico	Bloqueia produção de fitoalexinas antibacterianas
RipAY	Glutathione (antioxidante celular)	Aumenta estresse oxidativo — danifica defesas celulares
RipB	Receptores de reconhecimento	Impede que a planta detecte o patógeno
RipTPS1/2	Metabolismo de trealose	Reprograma metabolismo da planta para favorecer a bactéria

2.2 Genes de Defesa da Planta contra Bactérias

A resposta ideal da planta ao detectar a Ralstonia envolve múltiplas camadas. Em plantas suscetíveis, essas camadas estão comprometidas epigeneticamente:

Gene / Via	Função Normal	Estado em Planta Suscetível	Resultado
FLS2 / BAK1	Receptor de flagelina bacteriana — primeiro alarme	Hipermetilado ou subexpresso	Planta não detecta a bactéria ao entrar
NPR1 (via SA)	Central da imunidade sistêmica adquirida (SAR)	Silenciado por metilação	Resistência sistêmica ausente
PR-1 / PR-2 / PR-7	Proteínas antibacterianas diretas	Hipermetilados — inativos	Arsenal químico de defesa ausente
WRKY33 / WRKY70	Fatores de transcrição ativadores de defesa	Silenciados	Genes de defesa não são transcritos
RBOHs (NADPH oxidases)	Produção de ROS — burst oxidativo antibacteriano	Subexpresso	Bactéria não é atacada quimicamente
Genes de lignificação	Reforço da parede do	Hipermetilados	Xilema permanece

	xilema contra invasão		vulnerável à colonização
Calose sintase (CalS)	Deposição de calose — barreira física vascular	Subexpresso	Vasos do xilema sem barreira física

2.3 Mapa Epigenético — O Que o MinION Revelaria

PERFIL EPIGENÉTICO ESPERADO: SUSCETÍVEL vs RESISTENTE		
GENE/VIA	SUSCETÍVEL	RESISTENTE
FLS2 (detector) ✓	Hipermetilado ✗	Ativo – detecta flagelina
NPR1 (SA central)	Silenciado ✗	Ativo – SAR funcional ✓
PR-1, PR-2, PR-7 ✓	Hipermetilados ✗	Hipometilados – expressos
WRKY33/70 ✓	Silenciados ✗	Ativos – transcrevem defesa
RBOHs (ROS) ✓	Subexpresso ✗	Burst oxidativo funcional
Lignificação	Hipermetilado ✗	Xilema reforçado ✓
CalS (calose)	Subexpresso ✗	Barreira física formada ✓
Padrão geral: suscetibilidade = silenciamento de múltiplas camadas de defesa simultaneamente		

2.4 O Papel do Solo na Suscetibilidade

Diferente do *Cladosporium* (foliar), a *Ralstonia* é primariamente um patógeno do solo. Isso significa que o microbioma do solo é o fator mais crítico para o manejo — e é exatamente onde o MinION tem maior impacto estratégico:

Condição do Solo	Efeito sobre a <i>Ralstonia</i>	Diagnóstico MinION
Solo com alta diversidade microbiana	Supressão natural por competição e antibióticos	Shannon > 6.0 + <i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i> abundantes
Solo com baixo ratio F:B (< 0.3)	Favorece proliferação bacteriana patogênica	Ratio F:B abaixo de 0.3 = alerta vermelho
Solo ácido (pH < 5.5)	<i>Ralstonia</i> prospera — competidores inibidos	Recomendação: calagem imediata
Solo encharcado / compactado	Anaerobiose favorece multiplicação da bactéria	Nematoides detectados frequentemente associados

Solo com nematoides (Meloidogyne)	Ferimentos radiculares = portas de entrada para Ralstonia	Coinfecção nematoide + Ralstonia muito comum
Restos culturais de solanáceas	Inóculo primário de Ralstonia persistente	MinION detecta Ralstonia em solo sem planta hospedeira

3. PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO COM MinION

3.1 Delineamento Experimental

Grupo	Material	N	Objetivo
A — Solo supressor	Solo de parcela nunca afetada por murcha bacteriana	5 amostras	Perfil microbioma que suprime naturalmente a Ralstonia
B — Solo condutor	Solo de parcela com histórico de murcha bacteriana recorrente	5 amostras	Perfil microbioma favorável à Ralstonia
C — Planta suscetível	Tecido vascular de planta murchando + solo da raiz	10 amostras	Epigenoma em colapso + carga bacteriana no xilema
D — Planta tolerante	Planta saudável em solo com Ralstonia detectada	10 amostras	Epigenoma de resistência ativa — referência
E — RFS progressivo	Grupo C sob pressão controlada F1 → F4	10/ geração	Evolução epigenética da resistência por seleção

3.2 Protocolo de Coleta Específico para Ralstonia

Solo — Coleta Estratégica

- Coletar na rizosfera imediata (0–5cm ao redor das raízes) — zona de maior concentração
- Coletar também em solo de caminho entre plantas — rastrear dispersão hídrica
- Coletar amostras de água de irrigação — Ralstonia se dispersa pela água
- Congelar imediatamente a -20°C — bactéria viva pode contaminar amostras adjacentes
- Usar luvas e desinfetar equipamentos entre amostras com álcool 70% + flambagem

Tecido Vegetal — Coleta Vascular

- Cortar caule a 10cm do solo — zona de maior concentração bacteriana
- Coletar tecido vascular marrom (xilema colonizado) com bisturi estéril
- Mergulhar imediatamente em tampão de preservação RNA Later
- Armazenar a -80°C para preservar DNA bacteriano e epigenoma vegetal
- Fotografar e documentar: grau de escurecimento vascular, presença de exsudato

3.3 Sequenciamento e Análise

Alvo	Kit MinION	Software de Análise	Output
------	------------	---------------------	--------

Ralstonia no solo	Rapid Kit SQK-RAD114	Kraken2 + Bracken	Raça/biótipo específico presente
Microbioma supressor	Rapid Kit SQK-RAD114	QIIME2 + MaAsLin2	Abundância de Bacillus/Pseudomonas/St reptomyces
Carga no xilema	Rapid Kit (DNA do exsudato)	Kraken2 — mapeamento direto	Quantificação da colonização vascular
Epigenoma da planta	Ligation Kit SQK-LSK114	Dorado + DeepPlant + DSS	DMRs nos genes FLS2, NPR1, PR, WRKY, CalS
Integração planta-solo	Ambos	MixOmics / MOFA+	Correlação microbioma × estado epigenético

3.4 Identificação da Raça e Biótipo

A *Ralstonia* possui mais de 50 estirpes genéticas com diferentes hospedeiros, virulências e sensibilidades. O MinION identifica a raça e biótipo presente em 24 horas — informação crítica para escolha do manejo:

Raça / Biótipo	Hospedeiros Principais	Temperatura Ótima	Relevância para Bahia
Raça 1 / Biótipo 1	Tomate, pimentão, fumo, berinjela	28–35°C	★★★ Alta — clima tropical favorável
Raça 1 / Biótipo 3	Tomate, bananeira	24–30°C	★★★ Alta — presente no Nordeste
Raça 3 / Biótipo 2	Batata (altitude)	< 24°C	★ Baixa — zonas serranas apenas
Phylotype I	Solanáceas em geral — Asia/África/BR	Tropical	★★★ Mais comum no Brasil tropical
Phylotype II	Solanáceas + bananeira	Tropical/subtropical	★★ Presente no Nordeste

4. MANEJO BASEADO EM MICROBIOMA SUPRESSOR

4.1 O Conceito de Solo Supressor

Solos supressivos são aqueles onde a *Ralstonia* não consegue causar doença mesmo quando presente em altas concentrações. A supressividade é biológica — depende da comunidade microbiana ativa — e pode ser construída e transferida. Esta é a estratégia mais poderosa e durável disponível:

COMO FUNCIONA UM SOLO SUPRESSOR PARA RALSTONIA

MECANISMO 1 – COMPETIÇÃO POR NICHOS

Bacillus subtilis, *B. amyloliquefaciens* ocupam os mesmos sítios de colonização radicular que a *Ralstonia*
→ Bactéria patogênica não encontra espaço para se fixar

MECANISMO 2 – ANTIBIÓTICOS NATURAIS

Bacillus spp. produzem iturina, fengicina, surfactina
Pseudomonas fluorescens produz 2,4-DAPG e fenazinas
Streptomyces spp. produzem mais de 60% dos antibióticos conhecidos
→ Concentração de *Ralstonia* no solo mantida abaixo do limiar infeccioso

MECANISMO 3 – INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA (ISR)

Pseudomonas e *Bacillus* benéficos nas raízes ativam a via do ácido jasmônico na planta inteira
→ Planta entra em estado de alerta imunológico permanente
→ Genes FLS2, WRKY, PR ficam hipometilados e prontos para atuar

MECANISMO 4 – PREDÇÃO E PARASITISMO

Bacteriófagos específicos de *Ralstonia* presentes em solos supressores
Bdellovibrio (bactéria predadora de bactérias) reduz população
→ MinION detecta esses organismos protetores pelo solo

4.2 Organismos Supressores — O Que Buscar no Solo

Organismo	Mecanismo de Supressão	Abundância Ideal	Ação se Ausente
<i>Bacillus subtilis</i> / <i>amyloliquefaciens</i>	Antibióticos (iturina, fengicina) + ISR	> 10 ⁶ UFC/g solo	Inocular com cepa nativa isolada da região
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,4-DAPG + fenazinas + ISR via JA	> 10 ⁵ UFC/g solo	Inocular + aplicar matéria orgânica (substrato)

Streptomyces spp.	Antibióticos de amplo espectro	$> 10^4$ UFC/g solo	Aumentar ratio F:B com cobertura morta
Lysobacter enzymogenes	Enzimas líticas + antibióticos contra gram-negativas	Qualquer presença positiva	Difícil de inocular — construir ambiente propício
Bacteriófagos de Ralstonia	Parasitismo direto — elimina células da Ralstonia	Detectável no metagenoma	Protocolos de fago-terapia em desenvolvimento
Trichoderma spp.	Indução de resistência sistêmica + competição	$> 10^4$ UFC/g solo	Inocular com T. harzianum ou T. asperellum

4.3 Protocolo de Construção do Solo Supressor

Fase 1 — Diagnóstico (Mês 1)

1. Coletar amostras de solo e sequenciar com MinION — mapa completo do microbioma
2. Identificar quais supressores estão ausentes ou abaixo do limiar
3. Identificar raça e carga de Ralstonia presente no solo
4. Medir pH, umidade, matéria orgânica — fatores que afetam supressores

Fase 2 — Restauração do Microbioma (Mês 2–4)

5. Calagem se $\text{pH} < 6.0$ — criar ambiente favorável para Bacillus e Pseudomonas
6. Incorporar composto maduro rico em Bacillus (30t/ha) — aporte imediato de supressores
7. Inocular com bioinoculante combinado: Bacillus + Pseudomonas + Trichoderma
8. Plantar adubos verdes supressores: Crotalaria spectabilis (suprime nematoides + Ralstonia), mucuna
9. Cobertura morta espessa (10cm) — mantém umidade, temperatura e ativa fungos benéficos

Fase 3 — Monitoramento e Ajuste (Mês 4–12)

10. Re-sequenciar solo a cada 3 meses — confirmar estabelecimento dos supressores
11. Correlacionar abundância de Bacillus/Pseudomonas com incidência de murcha
12. Ajustar inoculações com base nos dados do MinION
13. Documentar evolução do ratio F:B e índice de Shannon ao longo do tempo

4.4 Manejo Integrado — Tabela de Decisão

Diagnóstico MinION	Nível de	Ação Imediata	Ação de Médio Prazo
--------------------	----------	---------------	---------------------

	Risco		
Ralstonia detectada + Bacillus ausente + pH < 5.5	● CRÍTICO	Remover plantas doentes + calagem emergencial	Inoculação massiva + rotação com Crotalaria
Ralstonia detectada + supressores presentes em baixa abundância	● ALTO	Inoculação de reforço de Bacillus/Pseudomonas	Incorporar composto + cobertura morta
Ralstonia detectada + microbioma supressor equilibrado	● MODERADO	Monitorar — não intervir com químicos	Manter práticas agroecológicas e re-analisar em 90 dias
Ralstonia ausente + microbioma supressor forte	● BAIXO	Manter manejo atual	Documentar e replicar esse perfil em outras parcelas
Nematoides + Ralstonia codetectados	● CRÍTICO	Crotalaria spectabilis imediata + nematicida biológico	Rotação longa (> 2 anos) com não-solanáceas

5. ESTRATÉGIA RFS PARA RESISTÊNCIA À RALSTONIA

5.1 A Lógica da Seleção Epigenética para Murcha Bacteriana

A suscetibilidade epigenética à *Ralstonia* segue o mesmo princípio do *Cladosporium*: genes de defesa silenciados por metilação. Porém, há uma diferença importante — a *Ralstonia* suprime ativamente a imunidade via efetores T3SS. Isso significa que a resistência epigenética precisa ser mais robusta e multifatorial.

ESTRATÉGIA RFS PARA RALSTONIA — F1 A F4

F1 (original – suscetível)

FLS2, NPR1, PR-7, CalS hipermetilados

Ralstonia coloniza xilema → murcha em 14-21 dias

Selecionar 10-15% das plantas com murcha mais tardia → F2

MinION: mapear epigenoma das sobreviventes

F2 (1º ciclo de pressão RFS)

Leve desmetilação de FLS2 e NPR1 → detecção precoce melhorada

Murcha ocorre mas mais tardiamente (25-35 dias)

MinION confirma: genes de alarme mais hipometilados

Selecionar as 10-15% mais tardias → F3

F3 (2º ciclo)

Desmetilação progressiva: FLS2 + NPR1 + genes de lignificação

Murcha em > 40 dias (50% da população sem sintomas)

Perfil de supressores no solo das plantas sobreviventes analisado

Correlação: epigenoma × microbioma associado à raiz

F4 (3º ciclo – resistência consolidada)

Genes FLS2, NPR1, CalS hipometilados – resposta rápida ao T3SS

> 70% da população sem murcha após inoculação controlada

PUBLICAÇÃO: primeira variedade crioula brasileira com resistência epigenética documentada à *Ralstonia solanacearum*

5.2 Integração Solo-Planta na Seleção RFS

O diferencial do protocolo ARCA é selecionar simultaneamente a planta E o microbioma do solo associado. Plantas que sobrevivem em solo com *Ralstonia* podem estar sendo protegidas pelo microbioma da rizosfera — não apenas pela sua própria resistência epigenética. O MinION diferencia esses dois mecanismos:

Cenário	O MinION Revela	Interpretação	Ação
---------	-----------------	---------------	------

Planta resistente em solo com Ralstonia	Epigenoma ativo + Bacillus abundante	Resistência mista: epigenética + microbioma supressor	Propagar planta E inocular seu microbioma associado
Planta resistente em solo pobre em supressores	Epigenoma muito ativo (FLS2, NPR1 hipometilados)	Resistência puramente epigenética — mais valiosa	Propagar como linhagem de resistência intrínseca
Planta suscetível em solo supressor	Epigenoma silenciado apesar do microbioma bom	Planta não responde aos sinais do microbioma benéfico	Usar para protocolo RFS com pressão de inoculante
Planta suscetível em solo condutor	Epigenoma silenciado + Ralstonia dominante	Situação crítica — alta suscetibilidade sistêmica	Rotação imediata + reconstrução do microbioma

5.3 Cronograma de Implementação

Fase	Período	Atividade Principal	Resultado Esperado
Diagnóstico	Mês 1–2	Sequenciar solo e plantas — mapear raça de Ralstonia presente e perfil epigenético baseline	Mapa de risco por parcela + identificação de linhagens tolerantes
Construção do Solo	Mês 2–6	Calagem + inoculação de supressores + Crotalaria + cobertura morta	Aumento mensurável de Bacillus/Pseudomonas no solo
Pressão RFS F1 → F2	Mês 3–9	Inoculação controlada + seleção dos sobreviventes + coleta F2	F2 com murcha mais tardia — confirmada pelo MinION
Validação F2 → F3	Mês 9–18	Repetir pressão, sequenciar F2, comparar epigenoma com F1	Desmetilação documentada dos genes FLS2 e NPR1
Consolidação F3 → F4	Mês 18–28	F3 com pressão + solo supressor estabelecido + publicação	Resistência epigenética estável + microbioma supressor documentado
Escala ARCA	Ano 3+	Distribuição de sementes F4 + inoculante nativo para rede de agricultores	Manejo integrado replicável sem fungicida/bactericida

6. CUSTOS, PUBLICAÇÕES E IMPACTO

6.1 Custo do Protocolo Completo

Item	Custo (USD)	Observação
MinION Mk1D (se não adquirido)	\$3.150	Equipamento único
Flowcells R10.4.1 — solo (5 amostras × 4 análises)	\$10.000–14.000	Principal custo operacional
Flowcells R10.4.1 — planta (4 gerações × 10 plantas)	\$20.000–28.000	Sequenciamento longitudinal F1 → F4
Kits Ligation + Rapid (estimativa)	\$4.000–6.000	Proporcional ao número de amostras
Cepa certificada Ralstonia (ESALQ/EMBRAPA)	\$500–1.000	Inoculação controlada — biossegurança
Insumos biológicos (Bacillus, Pseudomonas, Trichoderma)	\$800–1.500	Inoculantes para construção do solo
Crotalaria spectabilis (sementes)	\$200–400	Adubação verde supressora
Bioinformática (se terceirizada)	\$1.000–3.000	Ou colaboração com UFRB/UFBA
TOTAL ESTIMADO	\$39.650–57.050	Para protocolo completo F1 → F4

6.2 Publicações Científicas Potenciais

Título Potencial	Periódico Alvo	Fator de Impacto
Epigenetic Susceptibility to Ralstonia solanacearum in Brazilian Heirloom Tomatoes: A MinION-Based Study	Molecular Plant-Microbe Interactions	IF 4.1
Soil Microbiome Suppression of Ralstonia solanacearum in Semi-Arid Northeastern Brazil	ISME Journal	IF 10.8
Progressive Epigenetic Resistance to Bacterial Wilt Through Participatory Seed Selection (RFS)	Plant & Soil	IF 4.9
Integrated Epigenomic and Metagenomic Analysis for Sustainable Management of Soilborne Pathogens in Tropical Agroecosystems	Nature Sustainability	IF 27.6

6.3 Impacto Direto para Agricultores da Rede ARCA

- Diagnóstico de solo antes do plantio — identificar risco de *Ralstonia* por parcela específica
- Protocolo de construção de solo supressor adaptado ao semiárido baiano
- Banco de sementes F4 com resistência documentada — rastreável por geração
- Inoculante nativo de *Bacillus*/*Pseudomonas* isolado de solos supressores da Bahia
- Redução de 80–90% no uso de bactericidas (cobre, antibióticos agrícolas)
- Protocolo de rotação de culturas baseado em sequenciamento do solo — não em calendário genérico