

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA SUSTENTABILIDADE - CCTS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PLANEJAMENTO E USO DE
RECURSOS RENOVÁVEIS - PPGPUR

Ana Paula Rossi

**MURCHA BACTERIANA DO EUCALIPTO: DINÂMICA ESPAÇO-
TEMPORAL E RESISTÊNCIA DE CLONES EM CAMPO**

Sorocaba

2021

Ana Paula Rossi

**MURCHA BACTERIANA DO EUCALIPTO: DINÂMICA ESPAÇO-
TEMPORAL E RESISTÊNCIA DE CLONES EM CAMPO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis para obtenção do título de Doutora em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis.

Orientação: Prof. Dr. Waldir Cintra de Jesus Junior

Coorientador: Dr. Edival Ângelo Valverde Zauza

Sorocaba

2021

Rossi, Ana Paula

**Murcha bacteriana do eucalipto: dinâmica espaço-temporal e resistência de clones em campo / Ana Paula Rossi -- 2021.
102f.**

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Waldir Cintra de Jesus Junior

Banca Examinadora: Prof. Dr. Willian Bucker Moraes, Prof. Dr. Rodolfo Ferreira de Mendonça, Prof. Dr. Rodrigo Neves Marques, Prof. Dr. Leônidas Leoni Belan
Bibliografia

1. Fitopatologia. 2. Epidemiologia. 3. Resistência genética . I. Rossi, Ana Paula. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano - CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Ana Paula Rossi, realizada em 25/06/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Waldir Cintra de Jesus Junior (UFSCar)

Prof. Dr. Willian Bucker Moraes (UFES)

Prof. Dr. Rodolfo Ferreira de Mendonça (Incapar)

Prof. Dr. Rodrigo Neves Marques (UFSCar)

Prof. Dr. Leônidas Leoni Belan (UEMASUL)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Elza Defendi Rossi e João Rossi

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço imensamente a Deus que me deu forças, coragem e perseverança para iniciar e concluir este trabalho.

Agradeço a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

A Suzano Papel e Celulose, na pessoa do Dr. Edival Ângelo Valverde Zauza pela cessão dos dados que foram utilizados na tese.

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Waldir Cintra de Jesus Junior, pelos ensinamentos, paciência, compreensão e incentivo.

Agradeço ao meu Coorientador Dr. Edival Ângelo Valverde Zauza por sua contribuição neste trabalho.

Aos meus pais Elza Defendi Rossi e João Rossi pelo incentivo para a realização de meus sonhos.

A meu irmão, Anderson Paulo Rossi pelo incentivo.

A minha cunhada Viviane Fraga Gouveia Rossi pela força nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus colegas do Programa de Pós-graduação em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis (PPGPUR), que me auxiliaram em algum momento do doutorado, Erick Phelipe Amorim, Juliana Martins Corrêa, Liliane Lopes Lobo e Marcos P. Coutinho.

Agradeço aos meus amigos Cássia Cristina dos Santos e Marcelo Fernando de Souza por suas contribuições neste trabalho.

Agradeço ao Breno Benvindo dos Anjos por suas contribuições.

Agradeço a Luciana, secretária do PPGPUR por ter sido tão prestativa e atenciosa.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO GERAL

ROSSI, Ana Paula. **Murcha bacteriana do eucalipto: dinâmica espaço-temporal e resistência de clones em campo**. 2021. Tese (Doutorado em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis) – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, Sorocaba, 2021.

A expansão da eucaliptocultura tem favorecido a ocorrência de doenças, e consequentemente a redução da produtividade causando prejuízos econômicos. Dentre as doenças, se destaca a murcha bacteriana causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum*, um dos patógenos mais destrutivos do mundo devido à sua distribuição em escala global e variação genética. Perante a importância desse patógeno, e da escassez de estudos sobre a epidemiologia da murcha bacteriana em plantações de eucalipto, objetivou-se com esse trabalho compreender a dinâmica espaço-temporal da murcha bacteriana e avaliar a resistência de clones em campo. O experimento foi realizado em um plantio comercial no estado do Maranhão, utilizando-se o clone de eucalipto FGCA0385, espécie *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla*. A dinâmica espacial da doença foi realizada determinando-se o Índice de Dispersão (ID), a Lei de Taylor Modificada (LTM) e a Análise da Dinâmica e Estrutura de Focos (ADEF). Para dinâmica temporal plotou-se a curva de progresso da incidência da doença, e os dados foram analisados por análise de regressão linear simples, ajustados para três modelos empíricos, Logístico, Monomolecular e Gompertz. O experimento de resistência de clones à murcha bacteriana do eucalipto foi realizado em condições de plantio comercial no estado do Pará, utilizando-se 308 clones, compostos por 05 espécies e 22 híbridos, com mudas oriundas dos estados de SP, BA e MA. Para análises de resistência de clones de eucalipto à murcha bacteriana do eucalipto foi utilizado o procedimento de estimação de variância e predição de valores genéticos (REML/BLUP) aos dados da variável área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) calculadas pelo método de integração trapezoidal, com auxílio do programa de Seleção Genética Computadorizada – SELEGEN – REML/BLUP. Houve padrão de agregação para plantas sintomáticas de murcha bacteriana do eucalipto constatado pela Lei de Taylor Modificada. Quanto à análise da dinâmica e estrutura dos focos (ADEF), constatou-se a ocorrência de 69 focos da doença, sendo 44 unitários, e número médio de plantas por foco de 1,63. Os focos possuem maior comprimento na direção da linha de plantio e foram caracterizados como não compactados. As epidemias foram melhor descritas pelo modelo Monomolecular, a partir do qual estimou-se incidência de 48,98% no sétimo ano de estudo. Em relação à resistência dos clones a murcha bacteriana do eucalipto em campo, verificou-se que todas as 05 espécies e 22 híbridos de eucalipto avaliados no experimento são suscetíveis a murcha bacteriana e que dos 308 clones, somente 25 apresentam resistência vertical.

Palavras-chave: Eucaliptocultura. Epidemiologia. Análise temporal. Análise espacial. *Ralstonia* spp.

ABSTRACT

The expansion of eucalyptus cultivation has favored the occurrence of diseases, and consequently the reduction of productivity causing economic losses. Among the diseases, the bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*, one of the most destructive pathogens in the world due to its global distribution and genetic variation, stands out. Given the importance of this pathogen, and the scarcity of studies on the epidemiology of bacterial wilt in eucalyptus plantations, this study aimed to understand the spatio-temporal dynamics of bacterial wilt and evaluate the resistance of clones in the field. The experiment was conducted in a commercial plantation in state of Maranhão, using the eucalypt clone FGCA0385, species *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla*. The spatial dynamics of the disease was performed by determining the Index of Dispersion (ID), the Modified Taylor's Law (MTL) and the Dynamics and Structure Analysis of the Foci (DSAF). For temporal dynamics the disease incidence progress curve was plotted, and the data were analyzed by simple linear regression analysis, fitted to three empirical models, Logistic, Monomolecular and Gompertz. The experiment on clone resistance to eucalyptus bacterial wilt was conducted under commercial planting conditions in state of Pará, using 308 clones, composed of 05 species and 22 hybrids, with seedlings from the states of SP, BA, and MA. To analyze the resistance of eucalyptus clones to eucalyptus bacterial wilt, we used the procedure of variance estimation and prediction of genetic values (REML/BLUP) to the data of the variable area under the disease progress curve (AUDPC) calculated by the trapezoidal integration method, with the aid of the Computerized Genetic Selection program - SELEGEN - REML/BLUP. There was an aggregation pattern for plants symptomatic of eucalyptus bacterial wilt verified by Modified Taylor's Law. As for the analysis of the Dynamics and Structure Analysis of the Foci (DSAF), 69 foci of the disease occurred, 44 of which were unitary, and the average number of plants per foci was 1.63. The foci are longer in the direction of the planting line and were characterized as not compacted. The epidemics were best described by the Monomolecular model, from which an incidence of 48.98% was estimated in the seventh year of the study. Regarding the resistance of clones to eucalyptus bacterial wilt in the field, it was found that all 05 species and 22 eucalyptus hybrids evaluated in the experiment are susceptible to bacterial wilt and that of the 308 clones, only 25 show vertical resistance.

Keywords: Eucalyptus plantations. Epidemiology. Temporal analysis. Spatial analysis. *Ralstonia* spp.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1: Linha do tempo destacando os principais eventos com base em estudos taxonômicos e filogenéticos do patógeno da murcha bacteriana, agora no complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* (RSSC). Os eventos em caixas na cor vermelha com fontes na cor vermelha indicam mudanças importante na taxonomia e nomenclatura. Caixas na cor azul com fontes azuis indicam marcos nas análises baseadas em DNA do RSSC. Caixas roxas com fontes roxas representam avanços genômicos na compreensão da diversidade de várias cepas de RSSC. 21

Figura 2: Classificação taxonômica do complexo de espécies de *Ralstonia* em espécie, filotipo e sequevar..... 26

CAPÍTULO 1

Figura1: Localização do município de Itinga-MA.....55

Figura 2: Exemplificação das parcelas experimentais mostrando a disposição das plantas e o caminhamento realizado para avaliação das plantas, indicado pelas setas. Itinga-MA.....56

Figura 3: Sintomatologia da murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia* spp.), (a) murcha do ápice da muda, (b) desfolha parcial ascendente, (c) necrose cambial, (d) exsudação de pus bacteriano de coloração creme. Itinga-MA.....56

Figura 4: Gráfico da Regressão linear entre os valores de Log variância observada (V_{obs}) e variância binária (V_{bin})64

Figura 5: Incidência da murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia* spp) no clone FGCA0385, espécie *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla*) em função do número médio de plantas por foco (NMPF) (A) e porcentagem de número de focos unitários (NFU%) (B). Itinga-MA.....65

Figura 6: Incidência da murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia* spp) no clone FGCA0385, espécie *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla*) em função do índice médio de forma de focos (IFF) (A), índice médio de compactação de focos (ICF) (B), índice médio de forma de focos não unitários (IFFNU) (C) e índice médio de compactação de focos não unitários (ICFNU) (D). Itinga-MA.....67

Figura 7: Incidência (%) da murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia* spp) do clone FGCA0385, espécie *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* ao longo do tempo avaliado. Média das quatro parcelas/repetições. Itinga-MA.....68

Figura 8: Curva dy/dt da murcha bacteriana do eucalipto (<i>Ralstonia</i> spp) do clone FGCA0385, espécie <i>Eucalyptus urophylla</i> var. <i>platyphylla</i> ao longo do tempo avaliado. Média das quatro repetições. Itinga-MA.....	68
Figura 9: Gráficos dos resíduos transformados (Monito, Logito e Gombito) em função do tempo dos modelos Monomolecular, Logístico e Gompertz da murcha bacteriana do eucalipto (<i>Ralstonia</i> spp) do clone FGCA0385, espécie <i>Eucalyptus urophylla</i> var. <i>platyphylla</i> e previstos pelos.....	70
Figura 10: Estimativa da incidência da murcha bacteriana do eucalipto (<i>Ralstonia</i> spp) para o clone FGCA0385, espécie <i>Eucalyptus urophylla</i> var. <i>platyphylla</i> utilizando-se o modelo Monomolecular do 2° ao 7° ano.....	71

CAPÍTULO 2

Figura 1: Localização do município de Dom Eliseu-PA.....	79
--	----

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1: Esquema de classificação de <i>Ralstonia solanacearum</i>	23
Tabela 2: Fatores predisponentes à ocorrência de <i>Ralstonia solanacearum</i> e práticas de controle.....	30

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Valores de incidência da murcha bacteriana do eucalipto (<i>Ralstonia</i> spp.) para o clone UFGCA385, valores do índice de dispersão (ID) e valores do teste X ² observado dos dados provenientes das quatro parcelas experimentais, em quadrantes de 10x3 plantas. Itinga-MA.....	63
---	----

Tabela 2: Número de plantas doentes (NPD), incidência, número total de focos (NTF), número de focos unitários (NFU), número médio de plantas por foco (NMPF), índice de forma de foco (IFF), índice de compactação de foco (ICF), índice de forma de foco não unitário (IFFNU) e índice de compactação de focos não unitários (ICFNU) de plantas com sintomas de murcha bacteriana (<i>Ralstonia</i> spp) em quatro parcelas (repetições) do clone de eucalipto FGCA0385, espécie <i>Eucalyptus urophylla</i> var. <i>platyphylla</i> . Itinga-MA.....	65
---	----

Tabela 3: Tabela de correlação de Pearson, incidência da murcha bacteriana do eucalipto (<i>Ralstonia</i> spp) no clone de eucalipto FGCA0385, espécie <i>Eucalyptus urophylla</i> var. <i>platyphylla</i> . Itinga-MA.....	66
--	----

Tabela 4: Inóculo inicial (y_0), taxa de progresso (r), coeficiente de determinação entre os valores preditos e os observados (R^2), quadrado médio dos resíduos (QMR) e Coeficiente de correlação entre os valores observados e preditos dos modelos Monomolecular, Logístico e Gompertz ajustados aos dados do progresso temporal da incidência da murcha bacteriana do eucalipto (<i>Ralstonia</i> spp) do clone FGCA0385, espécie <i>Eucalyptus urophylla</i> var. <i>platyphylla</i> . Itinga MA.....	69
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Espécies, híbridos e número de clones utilizados no experimento. Dom Eliseu, PA.....	84
Tabela 2: Clones de eucalipto resistentes à murcha bacteriana do eucalipto. Dom Eliseu, PA.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RNAr Ácido Ribonucleico ribossômico

DNA Ácido desoxirribonucleico

ID Índice de dispersão

LTM Lei de Taylor modificada

ADEF Análise da dinâmica e estrutura de focos

NF Número de focos

NPF Números de plantas em cada foco

ICF Índice de compactação do foco

IFF Índice de forma de foco

ICFUN Índice de compactação de focos não unitário

IFFNU Índice de forma de foco não unitário

AACPD Áreas abaixo da curva de progresso

SELEGEN - Seleção Genética Computadorizada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1. Importância da cultura do eucalipto.....	17
2.2. Murcha bacteriana (<i>Ralstonia</i> spp.).....	18
2.2.1. Etiologia e taxonomia.....	19
2.2.2. Ciclo da doença e sintomatologia.....	26
2.2.3. Epidemiologia e manejo da murcha bacteriana do eucalipto.....	27
2.3. Análise espacial de doenças de plantas.....	31
2.3.1 Índice de dispersão e Lei de Taylor modificada.....	32
2.3.2. Análise da dinâmica e estrutura de focos (ADEF).....	33
2.4. Análise temporal de doenças de plantas.....	35
2.5. Melhoramento genético do eucalipto.....	36
2.5.1. Seleção de genótipos em testes clonais.....	39
2.5.2. Estimativas dos parâmetros genéticos.....	39
3. REFERÊNCIAS.....	41
4 CAPÍTULO 1 - Dinâmica espaço-temporal da murcha bacteriana do eucalipto.....	51
4.1. INTRODUÇÃO.....	53
4.2. METODOLOGIA.....	54
4.2.1. Caracterização da área de estudo.....	54
4.2.2. Análise espacial.....	57
4.2.2.1 Índice de Dispersão e aplicação da Lei de Taylor modificada.....	57
4.2.2.2 Análise de dinâmica e estrutura de focos (ADEF).....	59
4.2.2.3. Análise temporal da murcha bacteriana do eucalipto.....	60
4.3. RESULTADOS.....	62
4.3.1 Índice de Dispersão (ID).....	62
4.3.2 Aplicação da lei de Taylor modificada (LTM).....	64
4.3.3 Análise da dinâmica e estrutura de focos (ADEF).....	64
4.3.3.2 Formato e compacidade dos focos.....	66
4.3.4 Análise temporal da murcha bacteriana do eucalipto.....	67
4.5. DISCUSSÃO.....	71
4.5.1. Análise espacial.....	71
4.5.2. Análise temporal da murcha bacteriana do eucalipto.....	74

4.6 CONCLUSÕES	75
4.7 REFERÊNCIAS.....	76
5. CAPÍTULO 2 - Resistência de clones de eucalipto à murcha bacteriana em campo.	80
5.1. INTRODUÇÃO	82
5.2. METODOLOGIA.....	83
5.2.1. Caracterização da área experimental e material genético	83
5.2.2. Quantificação da murcha bacteriana do eucalipto	86
5.2.3. Estimativas de parâmetros genéticos e estatística.....	87
5.3. RESULTADOS	88
5.4. DISCUSSÃO	91
5.5. CONCLUSÕES	93
5.6. REFERÊNCIAS.....	93
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
8. APÊNDICE A.....	97

1 INTRODUÇÃO GERAL

A crescente demanda mundial por produtos florestais tem contribuído para a progressiva expansão de plantações florestais no Brasil. Florestas plantadas é um destacado setor da economia brasileira, muito competitivo, fundamentado em bases sustentáveis e com grande potencial de extensão (MAPA, 2018). O Setor florestal brasileiro de árvores plantadas representa 1,2% do PIB Nacional e receita bruta total de R\$ 97,4 bilhões (IBÁ, 2020). Entre as variedades florestais cultivadas, se destaca o cultivo do eucalipto representando 77 % das florestas plantadas do Brasil (IBÁ, 2020).

Com a necessidade de expansão do cultivo de eucalipto tem-se utilizado o emprego de clones cada vez mais produtivos e aparentados, sem o prévio conhecimento de sua sustentabilidade e resistência a doenças, favorecendo a ocorrência de epidemias e a consequente redução da produtividade florestal e até sérios prejuízos econômicos (ALFENAS et al., 2006; ALFENAS, 2018).

A ocorrência de doenças impacta a produtividade dos plantios de eucalipto e consequentemente gera danos e perdas. No Brasil a murcha vascular causada por *Ralstonia solanacearum*, *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted e *Erwinia psidii* surgiram como as doenças mais importantes (ALFENAS et al., 2006; ARRIEL et al., 2013; FERREIRA et al., 2013; FONSECA et al., 2014; FERREIRA et al., 2017). Recentemente também foi registrado *Ralstonia pseudosolanacearum* causando murcha vascular (FREITAS et al., 2020).

Desde o primeiro relato de murcha bacteriana em eucalipto no Brasil no início dos anos 80 (SUDO et al., 1983), esta doença vem causando sérios prejuízos em plantações de eucaliptos no Brasil (ALFENAS et al., 2006; FERREIRA; MAFFIA; ALFENAS, 2018). Em 2005 esta doença chegou a causar um prejuízo econômico da ordem de 27 milhões de dólares no Brasil (ALFENAS et al., 2009). A murcha bacteriana do eucalipto causou a diminuição no crescimento volumétrico de até 81,7 % e diminuição no rendimento de celulose de até 6,4% em plantas de eucalipto (FERREIRA; MAFFIA; ALFENAS (2018).

Apesar da importância e potencial risco desta doença para as plantações de eucalipto no Brasil, nenhum estudo foi realizado para avaliar a dinâmica-espaco-temporal e poucos estudos foram realizados para avaliar a resistência dos clones em campo. O padrão espaco-temporal da doença no povoamento florestal nos possibilita

visualizar como determinada doença se dispersa no campo (GILLIGAN, 1983) e determinar a interação entre o patógeno, hospedeiro e ambiente, estabelecida por dados cumulativos de intensidade da doença (VANDERPLANK, 1963). Compreender a dinâmica-espaço temporal e a resistência de clones a murcha bacteriana do eucalipto é necessário para o desenvolvimento de medidas de manejo eficientes que possam ser reproduzidas com sucesso por toda cadeia florestal.

Perante a importância sanitária que o patógeno *Ralstonia* spp. apresenta para as plantações de eucalipto o objetivo com esse estudo foi descrever a dinâmica espaço-temporal da murcha bacteriana do eucalipto e avaliar a resistência de clones de eucalipto em campo.

Esta tese foi organizada em Introdução Geral, Fundamentação Teórica e Referências Bibliográficas; Capítulo 1: Dinâmica espaço-temporal da murcha bacteriana do eucalipto e Capítulo 2: Resistência de clones a murcha bacteriana do eucalipto em campo.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Importância da cultura do eucalipto

O eucalipto pertence à divisão Angiospermae, classe Dicotyledonea, ordem Myrtales, família Myrtaceae tem sua origem na Austrália, Tasmânia e outras ilhas da Oceania. Existem cerca de 730 espécies reconhecidas botanicamente, porém aproximadamente 20 delas são atualmente utilizadas para fins comerciais em todo o mundo (SANTORA; PENTEADO JÚNIOR; GOULART, 2014).

No Brasil, o cultivo do eucalipto em escala econômica deu-se a partir de 1904, mediante trabalho do agrônomo silvicultor Edmundo Navarro de Andrade, para atender a demanda da Companhia Paulista de Estradas de Ferro (MORA; GARCIA, 2000). A partir de 1965, com a instalação do Programa de incentivos fiscais ao reflorestamento, a área plantada com eucalipto no Brasil teve um aumento expressivo passando de 5,967 mil para 3,3 milhões de hectares (BACHA, 2008).

O gênero *Eucalyptus* é o mais plantado no Brasil, ocupando 6,97 milhões de hectares, representa 77% do total de área plantada no Brasil, concentrada principalmente em Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo (IBA, 2020). Essa representatividade da eucaliptocultura se deve a característica de rápido crescimento e diversos usos, entre eles se destacam, papel e celulose, chapas de fibras, móveis, postes, dormentes e mourões, energia, estruturas para construção civil e óleos essenciais (WILCKEN et al., 2008).

As espécies de Eucalipto mais utilizadas no momento, em função das características de suas madeiras, são: *Eucalyptus grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. viminalis*, *E. dunnii* (Região Sul do Brasil) e híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*. Na Região Sul, também se destaca o *Eucalyptus benthamii*, devido a tolerância a geadas (SANTORA; PENTEADO JÚNIOR; GOULART, 2014).

A cadeia de produção do eucalipto vem ao longo da história realizando investimentos constantes em ciência e tecnologia para trazer cada vez mais soluções e produtos alinhados com a bioeconomia, baixa redução de carbono, e como resultado a árvore de eucalipto pode servir como matéria prima renovável para fabricação de aproximadamente cinco mil produtos (IBÁ, 2020).

O eucalipto também está presente no desenvolvimento de novas tecnologias como a extração de celulose nanocristalina (CNC) produzida 100% a partir de fontes

renováveis para criar soluções de embalagens de papel mais sustentáveis e com barreiras biodegradáveis e na produção da nanocelulose que é a divisão da fibra de celulose de cerca de 1mm de comprimento em partes por bilhão, formando uma espécie de gel que pode ser aplicado nos papéis, no cimento, nos plásticos, nas tintas, nos tecidos, em substituição aos materiais oriundos do petróleo (IBÁ, 2020).

2.2. Murcha bacteriana (*Ralstonia* spp.)

Ralstonia spp. está presente em todos os continentes e em muitas ilhas entre os trópicos de Câncer e Capricórnio (ELPHINSTONE, 2005; DENNY, 2006).

A origem dessa bactéria ainda não é muito clara, mas Hayward (1991) sugere que antecede a separação geológica dos continentes, uma vez que, a bactéria foi encontrada na selva virgem na América do Sul e na Indonésia. No entanto, acredita-se que as cepas de biovar 2 de raça 3 se originem nas terras altas andinas e este subgrupo quase-clonal é amplamente distribuído em regiões tropicais em todo o mundo e algumas regiões temperadas como a Europa e o norte da Ásia (TAHAT; SIJAM, 2010). Todavia, o primeiro registro publicado foi em plantas de tabaco no Japão, no final do século XVII (KELMAN, 1953). No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez por Von Parseval em 1922, em cultivos de tabaco no Estado do Rio Grande do Sul.

Em plantações de eucalipto a murcha bacteriana foi relatada pela primeira vez na China por Cao (1982). Desde o primeiro relato já foi notificado murcha bacteriana em eucaliptos de países da América do Sul, África e Sudeste da Ásia (FONSECA et al., 2016).

A primeira ocorrência da murcha bacteriana do eucalipto no Brasil ocorreu no início dos anos 80 no município de Prata em Minas Gerais, (SUDO; OLIVEIRA; PEREIRA, 1983). Posteriormente, foi relatada no Pará e na Bahia (DIANESE; TAKATSU, 1985; ROBBS; CRUZ; RODRIGUES NETO, 1988), no Espírito Santo, Maranhão (ALFENAS et al., 2006), Santa Catarina (AUER; DOS SANTOS; RODRIGUES NETO, 2008) e Goiás (MARQUES; REZENDE; UESUGI, 2009).

Desde então, a murcha bacteriana do eucalipto vem causando sérios prejuízos em plantações no Brasil (ALFENAS et al., 2006; FERREIRA; MAFFIA; ALFENAS, 2018).

Alfenas et al. (2006) constataram que a murcha bacteriana, afetou 28 clones de eucalipto o que resultou no descarte e destruição de 553.991 minicepas, 6.837.691 propágulos vegetativos e de 11.266.819 mudas prontas para expedição, causando prejuízos da ordem de R\$ 6.000.000,00 (US\$ 2.764.977,00), considerando somente o descarte de material vegetal nos estados da Bahia, do Espírito Santo, do Maranhão, de Minas Gerais e do Pará.

Além de perdas, definida como a redução em retorno financeiro, a murcha bacteriana também causa danos, definido como a redução em quantidade e/ou qualidade da produção. Ferreira; Maffia e Alfenas (2018) verificaram, diferenças significativas entre árvores sadias e doentes de modo que o crescimento volumétrico diminuiu 78,6 % e 81,7 % aos 18 e 30 meses respectivamente.

Apesar dos enormes prejuízos que a doença tem ocasionado à eucaliptocultura, a doença é considerada relativamente nova para esta cultura quando comparada as espécies agrícolas já afetadas e com estudos escassos na área florestal.

2.2.1. Etiologia e taxonomia

A murcha bacteriana possui como agente etiológico a bactéria *R. solanacearum* complex (SMIT, 1896, YABUUCHI et al., 1995), pertencente a classe β Proteobacteria, família Burkholderiaceae e gênero *Ralstonia*. É uma bactéria Gram-negativa, bastonetiforme (DENNY, 2006), sem a formação de esporos com cerca de 0,5-0,7 μm x 1,5-2,0 μm e com um único flagelo polar com a função de mobilidade (SNEATH et al., 1986). É um microrganismo aeróbico obrigatório, crescendo e desenvolvendo em temperatura mínima, ótima e máxima de 10, 35 e 41 °C, respectivamente (KELMAN, 1953). Suas colônias em meio sólido são pequenas, irregularmente redondas, brancas em luz refletida e bronzeadas em luz transmitida (HAYWARD, 1991).

A classificação taxonômica desta bactéria já passou por algumas alterações: *Ralstonia solanacearum* foi descrita pela primeira vez por Smith em 1896 como *Bacillus solanacearum*, posteriormente o mesmo autor a reclassificou como *Pseudomonas solanacearum* em 1914. Em 1992, a bactéria foi reclassificada como *Burkholderia solanacearum* (Smith) por Yabuuchi et al. (1992). Após 3 anos a espécie foi novamente reclassificada com um novo gênero chamado *Ralstonia* (SMITH, 1896).

Essas mudanças e evolução nas pesquisas relacionadas a esta bactéria foi mostrada em uma linha do tempo (Figura 1) elaborada por Paudel et al. (2020).

Devido à variabilidade fenotípica e genotípica dentro da espécie, *R. solanacearum*, passou a ser conhecida como “complexo de espécies”. Esse termo foi utilizado pela primeira vez por Gillings e Fahy (1993) quando descreveram a variação genética entre os isolados. Um complexo de espécie é definido como um agrupamento de isolados cujos membros individuais podem representar mais do que uma espécie (FEGAN; PRIOR, 2005).

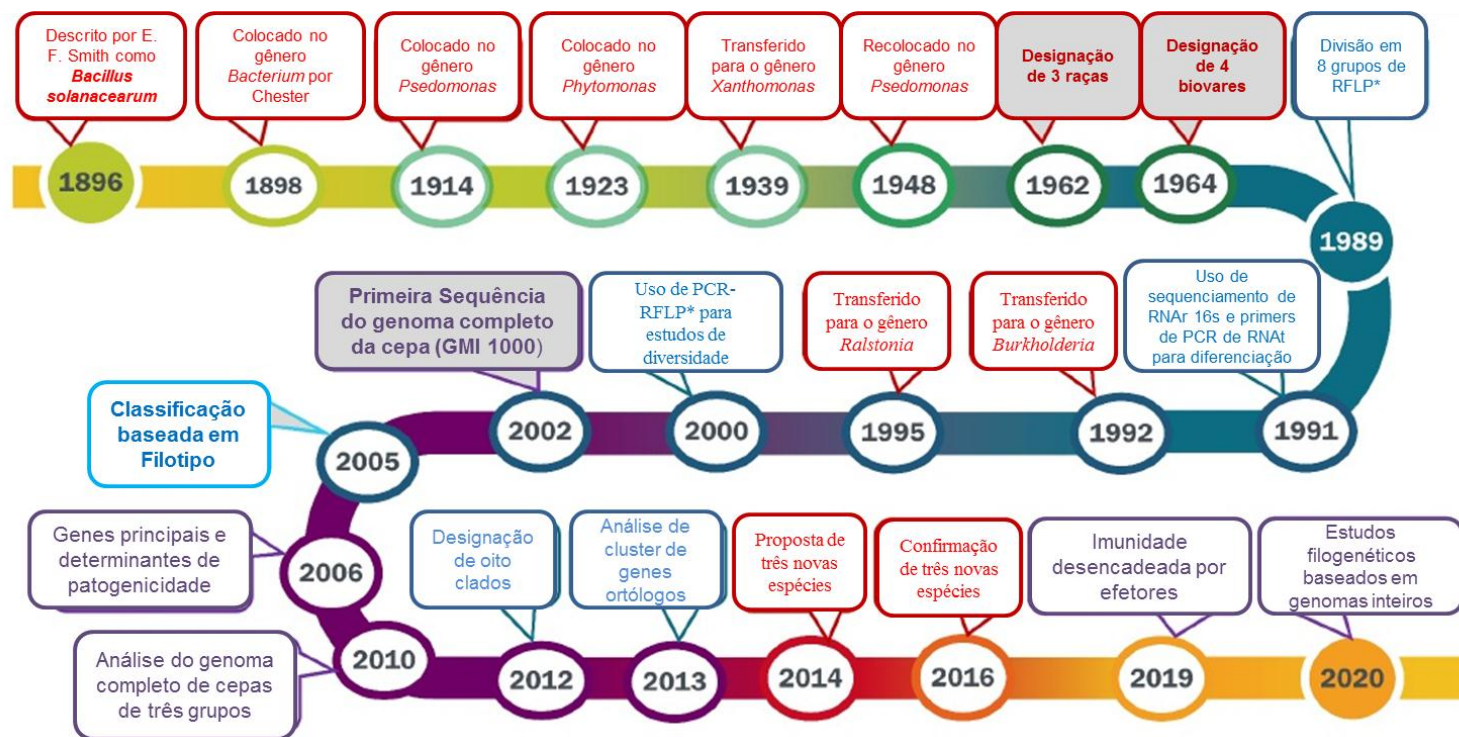


Figura 1: Linha do tempo destacando os principais eventos com base em estudos taxonômicos e filogenéticos do patógeno da murcha bacteriana, agora no complexo de espécies *Ralstonia solanacearum* (RSSC). Os eventos em caixas na cor vermelha com fontes na cor vermelha indicam mudanças importante na taxonomia e nomenclatura. Caixas na cor azul com fontes azuis indicam marcos nas análises baseadas em DNA do RSSC. Caixas roxas com fontes roxas representam avanços genômicos na compreensão da diversidade de várias cepas de RSSC.

Rótulos em negrito com fundos cinza indicam eventos taxonômicos e genômicos marcantes. Publicações de referência associadas a cada data são fornecidas no artigo de Paudel et al. (2020).

*RFLP – Sigla em inglês de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição.

Fonte: Traduzido e adaptado de Paudel et al. (2020).

Inicialmente a espécie foi dividida em raças e biovar. Para a classificação de raças, foi levado em consideração a variedade de hospedeiros e distribuições geográficas e as raças foram, então divididas em cinco (DENNY, 2006). A raça 1 é um grupo mal definido com ampla gama de hospedeiros (TAHAT; SIJAM, 2010), capaz de infectar plantas de tabaco, tomateiro, ervas daninhas da família das solanáceas e outras, bananeira diploide (genótipo AA e BB), amendoineiro, batateira, pimenteira, planta de berinjela, oliveira, planta de gengibre, morangueiro, gerânio e eucalipto (DENNY, 2006), endêmica do sul dos Estados Unidos, África, Ásia e América do Sul (TAHAT; SIJAM, 2010). A raça 2 afeta principalmente bananeira triploides (genótipos AAA, AAB, ABB), e outras culturas como helicônias, planta de berinjela, pimenteira, tomateiro e plantas de tabaco (DENNY, 2006) é encontrado principalmente na América Central e no Sudeste Asiático (TAHAT; SIJAM, 2010). A raça 3 afeta principalmente a batateira, o tomateiro e gerânios (DENNY, 2006), com distribuição mundial (TAHAT; SIJAM, 2010). A raça 4 afeta planta de gengibre, tomateiro, pimenteira, planta de berinjela e algumas ervas daninhas (DENNY, 2006) com ocorrência em grande parte da Ásia e Haváí (TAHAT; SIJAM, 2010) e a raça 5 afeta a amoreira na China (KELMAN, 1998; DENNY, 2006; TAHAT; SIJAM, 2010).

Baseado em suas diferentes habilidades para produzir e oxidar vários dissacarídeos (celobiose, lactose e maltose) e álcoois (ducitol, manitol e sorbitol) as cepas de *R. solanacearum* foram classificadas em seis biovars (biovar 1-6) (BUDDENHAGEN; KELMAN, 1964; HAYWARD, 1964; FEGAN; PRIOR, 2005). As cepas do biovar 1 não metabolizam nenhuma delas; as cepas do biovar 2 metabolizam apenas dissacarídeos; as cepas do biovar 3 metabolizam todas elas; as cepas do biovar 4 metabolizam apenas álcoois hexose; as cepas do biovar 5 metabolizam todas, exceto dulcitol e sorbitol (BUDDENHAGEN et al., 1962; HAYWARD, 1964). Posteriormente, um novo grupo de isolados de *R. solanacearum* da bacia Amazônica foi diferenciado do biovario original 2 usando ribose e trealose (HAYWARD, 1994).

Posteriormente, com a finalidade de representar melhor essa variabilidade Fegan e Prior (2005) baseados em sequências nucleotídicas conservadas nas regiões espaçadoras intergênicas (ITS) 16S–23S e dos genes *egl*, *hrpB* e *mutS* do DNA ribossômico, propuseram uma nova classificação hierárquica, subdividida em quatro níveis taxonômicos: espécie, filotipo, sequevar e clone (Tabela 1).

Tabela 1: Esquema de classificação de *Ralstonia solanacearum*.

Nível Taxonômico	Taxonomia Equivalente	Nomenclatura	Método de Identificação
Espécie	Espécie	<i>Ralstonia solanacearum</i> species complex	PCR Primers (eg 759/760)
Filotipo	Subespécies	Filotipos I, II, III e IV	Filotipo específico, múltiplos PCR baseado na localização do ITS
Sequevar	Grupos infrasubespecífico	Sequevars 12-23	Sequenciamento do gene endoglucanase
Clones	Linhas clonais		Métodos de impressão digital do genoma, por ex. repúblicas PCR, RAPD, AFLP, PFGE, etc.

Fonte: Fegan e Prior, 2005

A identificação da espécie pode ser realizada por meio de oligonucleotídeos iniciadores, como o OLI1/Y2, utilizado com sucesso para identificação de isolados de *R. solanacearum* e espécies relacionadas (*R. syzygii* e Blood Disease Bacterium) (SEAL et al., 1993; ARAHAL et al., 2004). Já os oligonucleotídeos PS96H/I são específicos para *R. solanacearum* (SEAL et al., 1992); entretanto, o desconhecimento da região alvo desse iniciador no genoma tem implicado em sua baixa utilização (ARAHAL et al., 2004).

Os filotipos são analisados de acordo com as variações de tamanho da sequência na região ITS e também podem estar ligados a certas origens geográficas. O filotipo I agrupa isolados tipicamente originários da Ásia, o filotipo II inclui isolados principalmente das Américas, o filotipo III é tipicamente originário da África e das ilhas vizinhas, enquanto o filotipo IV é originário da Indonésia e inclui *Ralstonia syzygii*,

causador da doença de Sumatra e doença sanguínea da bananeira (FEGAN; PRIOR, 2005, REMENANT et al., 2011). O filotipo ao qual uma linhagem pertence pode ser rapidamente identificado usando um PCR multiplex baseado na informação da sequência da região ITS (FEGAN; PRIOR, 2005).

Cada filotipo de *R. solanacearum* pode ser subdividido em subgrupos menores, conhecidos como variantes de sequências (sequevars). O sequevar de um isolado é determinado pelo sequenciamento parcial do gene da endoglucanase (*egl*) (FEGAN; PRIOR, 2005). Cada filotipo é composto de vários sequevars (FEGAN; PRIOR, 2005). Cada sequevar pode ser composto por várias linhas clonais que podem ser identificadas usando métodos de impressão digital genômica, como PFGE, AFLP ou rep-PCR (FEGAN; PRIOR, 2005).

Com base numa análise de poliformismo de sequência quatro filotipos (I, II, III, IV) e oito subtipos distintos com padrões evolutivos foram reconhecidos em *R. solanacearum*. Os filotipos foram encontrados associados à origem geográfica, sendo que o I, veio da Ásia, II da Américas, III da África e IV da Indonésia (WICKER et al., 2012). Os respectivos filotipos foram divididos em subclusters. O filotipo II foi subdividido em dois subclusters: IIA e IIB. Além de subclusters, diferentes clados específicos de filotipos foram identificados: filotipo I, clado 1, filotipo II, Subcluster IIA com clados 2 e 3 e Subcluster IIB com clados 4 e 5. O Filotipo III formou o clado 6 e filotipo IV formou os clados 7 e 8 (WICKER et al., 2012).

Recentemente, com base na combinação de métodos genômicos e proteômicos a taxonomia do complexo de espécies de *R. solanacearum* foi revisada para consistir de três espécies: *R. pseudosolanacearum* (isolados do filotipo I e III), *R. solanacearum* (isolados do filotipo II) e *R. syzygii* (isolados do filotipo IV) (SAFNI et al., 2014; PRIOR et al., 2016). As novas descrições foram baseadas na análise filogenética do gene 16S RNAr, da região 16S-23S RNAr ITS e do gene endoglucanase (*egl*) em combinação com hibridações DNA-DNA (SAFNI et al., 2014).

Santiago et al, (2017), identificaram a distribuição de filotipos do complexo de *R. solanacearum* em diferentes regiões do Brasil, sendo que o filotipo I foi encontrado em diferentes locais, em pelo menos três estados distintos das regiões Norte e Nordeste, bem como no Distrito Federal, região Centro Oeste. Os isolados do filotipo I foram obtidos a partir de tomateiro, planta de berinjela, planta de pimentão e pimenteira longa. O filotipo II foi amplamente distribuído no país e foi associado a uma ampla gama de

hospedeiros, incluindo tomateiro, batateira, planta de berinjela, jiló, pimentão, pimenta longa, gerânio, bananeira e eucalipto. Na região sul, apenas isolados de filotipo II foram encontrados. A maioria (84%) dos isolados brasileiros de *R. solanacearum* foi classificado como pertencente ao filotipo II e os filotipos III e IV não foram encontrados (Santiago et al., 2017).

A Bacia Amazônica brasileira foi sugerida por Wicker et al., 2012, como o suposto centro de origem do filotipo II, o que possivelmente também explica a porcentagem deste filo encontrada por Santiago et al. (2017).

Recentemente, estudos realizados por Freitas et al. (2020) e Albuquerque et al. (2021) relatam a ocorrência de *R. pseudosolanacearum* (filotipo I), respectivamente no Pará e no Pernambuco, predominantemente no Agreste.

Em eucalipto foi verificado por Carstensen et al. (2017) que a murcha bacteriana se dividia em dois grupos de filotipos separados mostrando que eles pertenciam a duas espécies diferentes de *Ralstonia*, uma vez que, isolados da África, China e Indonésia agrupados no filotipo I (*R. pseudosolanacearum*) e isolados do Brasil e Colômbia agrupados no filotipo II (*R. solanacearum*).

Até o ano de 2017 somente a ocorrência de *R. solanacearum* (filotipo II) tinha sido relatada em eucalipto no Brasil, nos estados da Bahia e em Minas Gerais (FERREIRA; MAFIA; ALFENAS, 2018). No entanto, Freitas et al. (2020), relataram a ocorrência tanto de *R. solanacearum* (filotipo II) quanto de *R. pseudosolanacearum* (filotipo I), causando murcha bacteriana no eucalipto, no município de Dom Elizeu no estado do Pará.

No Brasil, a classificação de raça e biovar foram utilizadas em muitos estudos, sendo identificado a ocorrência em eucalipto da Raça 3 Biovar 1, nos estados do Espírito Santo, Santa Catarina e Maranhã e Biovar 2T nos estados de Minas Gerais, Bahia, Pará, Goiás e Amazonas (SUDO; OLIVEIRA; PEREIRA, 1983; DIANESE; TAKATSU, 1985; DRISTIG; DIANESE; TAKATSU, 1988; ROBBS; CRUZ; RODRIGUES NETO, 1988; ALFENAS et al., 2006; AUER; SANTOS; RODRIGUES NETO, 2008; MAFIA et al., 2012; MARQUES et al., 2012; FONSECA et al., 2014).

No entanto, ambas as classificações de raças e biovars, apesar de amplamente utilizadas por sua simplicidade e praticidade, não refletem a heterogeneidade dos isolados de *R. solanacearum* (PINHEIRO et al., 2011) além de não agrupar os isolados de acordo com a história filogenética ou a origem geográfica (FONSECA et al., 2014).

As taxonomias baseadas na sequência de DNA demonstram a trajetória evolutiva de *Ralstonia* (Figura 2).

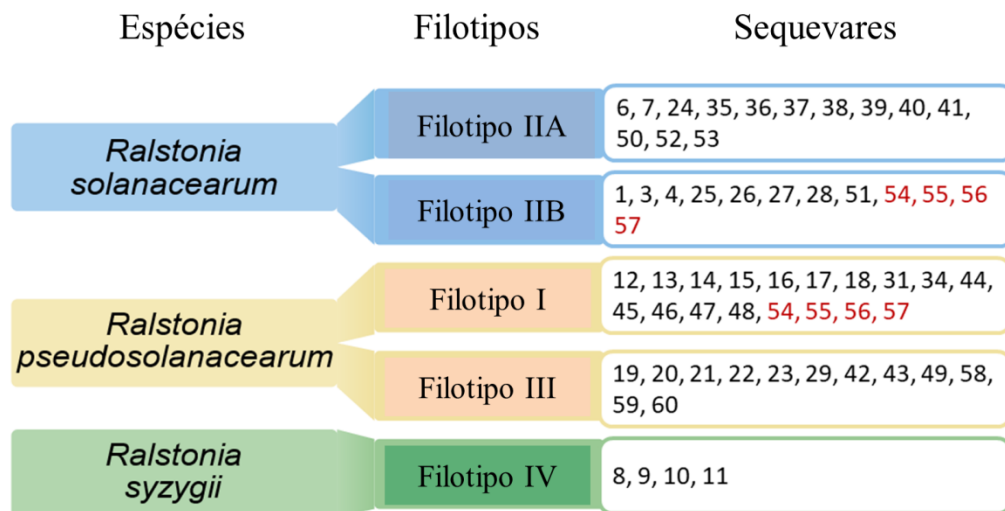


Figura 2: Classificação taxonômica do complexo de espécies de *Ralstonia* em espécie, filotipo e sequevar.

Fonte: Traduzido de Lowe-Power e Chipman (2020).

Para facilitar o acompanhamento e atualização na nomenclatura taxonômica de *Ralstonia* foi criado um banco de dados completo armazenado em um repositório GitHub <https://github.com/lowepowerlab/Ralstonia_Global_Diversity>. Essas atualizações formais no banco de dados são realizadas uma a duas vezes por ano (LOWE-POWER; CHIPMAN, 2020).

2.2.2. Ciclo da doença e sintomatologia

A penetração da bactéria no hospedeiro normalmente ocorre via ferimentos no sistema radicular e nos locais de emergência de raízes secundárias. Segundo Choudhary et al. (2018), depois de invadir o tecido do hospedeiro suscetível *R. solanacearum* multiplica-se rapidamente, invade o córtex da raiz e células do parênquima vascular intercelular, antes de se espalhar para os vasos do xilema (VASSE et al., 1995). Em seguida, presente nos vasos elas degradam os componentes da parede do xilema, células do parênquima e membranas resultando em massas de bactérias e detritos celulares (AGRIOS, 2005). Depois, se espalha para as partes aéreas do hospedeiro, caule e folhas, eventualmente bloqueando o sistema de transporte de água.

Assim, a murcha ocorre em função da alta concentração bacteriana no xilema que impede e/ou dificulta a água de atingir as folhas satisfatoriamente (CHOUDHARY

et al., 2018). Posteriormente a colonização de *R. solanacearum* no xilema, um grande número de células bacterianas é liberado das raízes, fornecendo um caminho para que as bactérias retornem ao solo e iniciem novas infecções (HAYWARD, 1991).

Os sintomas da doença podem se pronunciar de formas diferentes dependendo da fase de crescimento da planta. Segundo Alfenas et al. (2006), as minicepas infectadas apresentam uma tendência à murcha, porém menos evidente se comparado com plantas infectadas pela bactéria em condições de campo. De acordo com esses autores em viveiro as folhas exibem lesões grandes, irregulares escuras que se tornam marrons claras a palha. Incide predominantemente próximas às bordas da folha, mas raramente em formato de “V” invertido. Além das folhas a doença ocorre mais severamente em minicepas com sistema radicular malformado (ALFENAS et al., 2006).

Todavia, sintomas da doença no campo em plantas oriundas de miniestacas infectadas inicialmente caracterizam-se por murcha e necrose na região da nervura central das folhas, bronzeamento foliar e desfolha basal ascendente da planta. Também há escurecimento do lenho a partir da região central e exsudação de pus bacteriano. Pode haver malformação radicular e, ou, afogamento de coleto, o que dependendo da intensidade pode causar subdesenvolvimento ou morte das plantas, resultando em alta desuniformidade do plantio (ALFENAS, et al., 2006).

A bactéria também pode colonizar alguns hospedeiros de forma assintomática em infecções latentes, e esse fenômeno mal compreendido é crucial para a epidemiologia dessa doença.

Segundo Alfenas et al. (2006) sob condições naturais de infecção, os sintomas surgem no campo em plantas com 3-4 meses após o plantio. A enfermidade pode ser aguda quando a doença progride rapidamente entre 2-3 semanas após o surgimento dos primeiros sintomas, podendo levar as árvores jovens a morte. No caso de enfermidade crônica a doença progride lentamente e as árvores infectadas têm crescimento reduzido, as folhas tornam-se de coloração avermelhada e, finalmente, murcham, culminado com a morte da planta após 2 a 6 meses (SUPRIADI et al., 2001).

2.2.3. Epidemiologia e manejo da murcha bacteriana do eucalipto

Doenças em plantas é o resultado da “interação dinâmica entre populações do hospedeiro e do patógeno com o ambiente, produzindo alterações fisiológicas e

frequentemente morfológicas na planta” (ZAMBOLIM et al., 2004). Em condições em que há a combinação desses fatores: plantas hospedeiras suscetíveis, patógenos virulentos e condições favoráveis de ambiente, ocorrendo por um período de tempo suficientemente longo, doenças em plantas podem ocorrer em caráter epidêmico (VALE; JESUS JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2004).

O conhecimento das condições básicas para que ocorra doença em plantas em caráter epidêmico (hospedeiro suscetível e cultivado monocultivo, presença de raças virulentas do patógeno e ambiente favorável e que persista por várias horas ou dias) constitui a base para o estabelecimento de esquema de controle integrado de fitopatógenos (ZAMBOLIM et al., 2004).

Assim, compreender como a doença progride no tempo e no espaço possibilita direcionar prática de manejo. Segundo Bergamin Filho et al. (2002) diversas informações podem ser extraídas dos dados, combinando análises temporais e espaciais, permitindo o progresso acadêmico e a aplicação prática nos tópicos seguintes: I) otimização de planos de amostragem; II) compreensão da dinâmica populacional de um patógeno; III) correlação entre doenças e vetores e, especificamente, entre a doença e o nicho ecológico dos vetores; IV) comparação da resistência da variedade; V) caracterização do padrão ou dos padrões de dispersão da doença; VII) dedução do mecanismo de transmissão da doença; VIII) dedução da natureza biótica ou abiótica de um agente etiológico; IX) delineamento de estratégias de manejo e, ou, de avaliação de sua eficácia; X) correlação entre a população do patógeno e a variação das características físico-químicas do solo; XI) dedução dos centros de origem de patógeno, etc. (BERGAMIN FILHO, et al., 2002).

Aspectos da epidemiologia da murcha bacteriana do eucalipto vem sendo investigados a um longo do tempo. Estes incluem transmissão raiz-raiz (LAPAGE et al., 1975), movimentação do solo, contaminação por implementos agrícolas (MCCARTER, 1968; MCCARTER; JAWORSKI, 1969) e transmissão da doença por insetos, como o caso do Moko da bananeira (KELMAN, 1953; BUDDENHAGEN; KELMAN 1964).

Hayward (1991) relata que algumas plantas daninhas também podem ser hospedeiras de *R. solanacearum*, servindo como fonte de inóculo. Estas plantas podem ou não apresentar sintomas da murcha bacteriana, e podem ser consideradas também hospedeiras alternativas sempre que plantas hospedeira não forem cultivada.

Segundo Morais et al. (2015), *R. solanacearum* pode ser disseminada pelo solo aderido a máquinas e implementos, por água e materiais de propagação como tubérculos de batata, rizomas e mudas. Exceto por algumas bananeiras que podem ser contaminadas por insetos polinizadores, as demais plantas geralmente são infectadas pelo sistema radicular.

Em eucalipto a disseminação do patógeno pode ocorrer no processo de produção de mudas quando as miniestacas estão contaminada de maneira assintomática por *R. solanacearum* ou por propágulos vegetativos contaminados ao longo do processo de produção de mudas (MAFIA, et al., 2012). A contaminação em viveiro também pode ocorrer pelo uso de tesouras de poda ou recipientes contaminados com patógeno (MAFIA, et al., 2012).

O manejo da murcha bacteriana do eucalipto é dificultado, especialmente em função da ampla gama de hospedeiros, alta variabilidade genética do patógeno nas populações e da capacidade de sobrevivência por longos períodos no solo e em profundidades (LOPES; QUEZADO-SOARES; MELO, 1994; LOPES; TAKATSU, 1997). Segundo Zambolin et al. (2004) células de *R. solanacearum* permanecem viáveis no solo por mais de 12 anos. Graham, Jones e Lloyd (1979) relataram a permanência de *R. solanacearum* em detritos de batata por 233 dias.

No campo os principais fatores que favorecem a sobrevivência de *R. solanacearum* são as temperaturas permissivas do solo e o alto teor de umidade (KELMAN, 1953; HAYWARD, 1991). Segundo Hayward (1991), a temperatura é o fator mais importante que afeta a interação patógeno-hospedeiro, bem como a sobrevivência nos solos. Ainda segundo esse autor, de forma geral, o aumento da temperatura ambiente entre 30 e 35 °C aumenta a incidência e a taxa de início da murcha bacteriana em hospedeiros como o tomateiro.

A sobrevivência do patógeno é maior em solos úmidos, mas bem drenados, enquanto a sobrevivência é afetada negativamente pela dessecação do solo e pela inundação (BUDDENHAGEN, 1964; KELMAN, 1953). Em dois campos de batata infestados naturalmente por *R. solanacearum* foi detectado a presença desse patógeno em todas as camadas do solo entre 15 e 75 cm com o uso de plantas indicadoras (GRAHAM; LLOYD, 1978; GRAHAM; LLOYD, 1979). A sobrevivência de até 673 dias em solos naturalmente infestados armazenados em sacos plásticos a 4°C foi relatada por Sequeira e Granada (1983).

Michereff; Peruch e Andrade (2005) relatam fatores predisponentes à ocorrência de doenças causadas pelos principais patógenos radiculares de cultivos tropicais, entre eles *R. solanacearum* bem como as práticas de controle (Tabela 2).

Tabela 2: Fatores predisponentes à ocorrência de *Ralstonia solanacearum* e práticas do controle

Fatores predisponentes à ocorrência de <i>R. solanacearum</i>	Práticas do controle <i>R. solanacearum</i>
Elevada umidade do solo	Seleção de área de plantio livre do patógeno
Temperatura do solo entre 25 e 35 C	Inspeção e certificação de materiais propagativos
Elevada luminosidade diária	Solarização do solo
Solo mal drenado	Evitar plantio adensado
Solo pouco arejado	Uso de materiais propagativos livres do patógeno
Estresse hídrico da planta	Desinfestação de ferramentas e implementos
Estresse nutricional da planta	Tratamento térmico de materiais propagativos
Estresse da planta por salinidade	Tratamento biológico de solo e substratos
Estresse da planta pelo ataque de patógenos	Tratamento biológico de materiais propagativos
Material de propagação infectado pelo patógeno	Rotação de culturas
Plantio adensado	Uso de adubação verde
Ferimentos no colo ou raízes da planta	Evitar plantio sombreado
Plantios sucessivos	Uso de água de qualidade
Monocultura	Evitar ferimentos no colo e raízes das plantas
Irrigação pesada	Eliminação de plantas doentes
Uso de água contaminada pelo patógeno	Remoção e destruição de restos culturais
Solo infestado com nematoides	Alteração do tipo e/ou da frequência de irrigação
Utensílios usados nos tratos culturais infestados	Drenagem adequada do solo
Manutenção de plantas infectadas no campo	
Manutenção de restos culturais no campo	

Fonte: Michereff; Peruch e Andrade (2005)

Na eucaliptocultura, uma das estratégias de manejo a ser adotada, é a utilização de espécies e/ou clones resistentes ao patógeno (MAFFIA; ALFENAS; FERREIRA, 2014). No entanto, encontrar uma espécie e/ou clone de eucalipto resistência a esse

patógeno ainda consiste em um desafio. Segundo Alfenas et al., (2009) para o eucalipto, o plantio de estacas enraizadas livres de doenças e clones resistentes são as principais medidas de manejo da murcha.

O controle biológico é outro método que está sendo estudado. Santiago et al. (2015) demonstraram resultados positivos para o manejo da murcha bacteriana em eucalipto utilizando Rizobactérias, porém esse tipo de controle biológico ainda não foi testado em campo.

Contudo, Coutinho e Wingfield (2017) descreveram que *R. solanacearum* atua como um patógeno oportunista, se aproveitando da ocorrência de situações de estresse abiótico para *Eucalyptus*, geralmente ligadas a sistemas radiculares pobres, práticas inadequadas de plantio e infecções por patógenos como *Ganoderma philippii* favorecem a ocorrência da infecção.

2.3. Análise espacial de doenças de plantas

O padrão espacial de uma doença em um povoamento florestal nos possibilita visualizar como determinada doença se dispersou no campo. Gilligan, (1983) definiu o padrão espacial de doenças de plantas como o arranjo ou posicionamento das plantas doentes, umas em relação às outras.

O padrão espacial da doença guarda estreita relação com os mecanismos de dispersão da doença. O padrão espacial ao acaso de plantas doentes relaciona-se geralmente a patógenos dispersados pelo vento, enquanto patógenos veiculados por respingos de chuva costumam dar origem a padrões agregados de plantas doentes (BERGAMIN FILHO et al., 2004).

O conhecimento do padrão espacial da doença é importante para obtenção de informações quantitativa sobre a dinâmica populacional do patógeno (GOTTWALD et al., 2002), facilitando no delineamento de experimentos epidemiológicos (JEGER, 1989), no desenvolvimento de metodologia de amostragem e monitoramento de patógeno (HUGHES; GOTTWALD, 1999). Também é útil no processo de decisão para um manejo mais racional do patossistema considerado (RISTAINO; GUMPERTZ, 2000). Dessa maneira, conhecer a epidemiologia de um patógeno em um povoamento florestal, permite tomar decisões assertivas com relação ao manejo desse patógeno.

A análise espacial de doenças é frequentemente utilizada para analisar a dinâmica espacial de espécies agrícolas, porém na área florestal esta análise ainda tem sido pouco explorada. A análise espacial foi utilizada para estudar o cancro basal em *E. grandis* (SOUZA, 2007), murcha de *Ceratocystis* do eucalipto (FERREIRA, 2009, TUMURA; PIERI; FURTADO, 2012) e da ferrugem do eucalipto (*Puccinia psidii*) (MASSON, 2009).

A determinação do índice de dispersão, lei de *Taylor*, análise da dinâmica e estrutura de focos são exemplos de análises que podem ser utilizadas para definição de padrões espaciais em parcelas ou campos experimentais.

2.3.1 Índice de dispersão e Lei de Taylor modificada

Segundo Bergamin Filho et al. (2004), o índice de dispersão (ID) é a relação entre a variância observada e a variância binária do processo em estudo (ID = variância observada/variância binária). Para o cálculo do ID inicialmente calcula-se a variância binária e a variância observada.

A variância binária é calculada por:

$$V_{\text{bin}} = p(1 - p)/n$$

Em que:

p = incidência da doença na parcela; e

n= número de plantas por quadrante.

A variância observada é calculada por:

$$V_{\text{obs}} = \frac{\sum (X_i - np)^2}{n^2(N - 1)}$$

Em que:

$\sum X_i$ = somatório do número de plantas sintomáticas em cada quadrante,

N = número total de quadrantes em cada área.

Dessa forma, de acordo com o resultado do índice de dispersão pode-se indicar padrões espaciais regulares ($D < 1$), aleatórios ($D = 1$) ou agregados ($D > 1$).

A partir da sequência de equações já utilizadas para o cálculo do índice de dispersão podemos calcular a Lei de Taylor modificada. A primeira demonstração de que populações de diferentes espécies apresentam graus de agregação característicos foi

feita por Taylor em 1961, ficando esta metodologia intitulada de Lei de Taylor. Segundo esta lei, por meio de dados de distribuição espacial de diversas populações de uma espécie, podem-se relacionar linearmente o logaritmo da variância observada (V_{obs}) e o logaritmo da média:

$$\log(V_{obs}) = \log(A) + \log(\text{média})$$

Posteriormente a aplicação da equação concluía-se sobre padrão espacial da doença, onde $b > 1$, o padrão era considerado agregado (tanto mais agregado quanto maior era o valor de b); quando $b = 1$, ao acaso; quando $b < 1$, regular.

Com a percepção de Madden e Hughes (1995) da inadequação da lei de Taylor para dados de incidência da doença, o que também já tinha sido detectado por Taylor (1961), propuseram um tratamento estatístico especial (HUGHES; MADDEN, 1992). Assim a expressão matemática passou a ser:

$$\log(V_{obs}) = \log(A) + b \log(\text{variância teórica})$$

Porém, para o caso de danos binários (como incidência de doença), a variância teórica é a variância binomial (V_{bin}) expressa abaixo:

$$\log(V_{obs}) = \log(A) + b \log(V_{bin})$$

Assim, uma distribuição espacial ao acaso é indicada por $b = 1$ e $A = 1$ [$\log(A) = 0$], isto é, $\log(V_{obs}) = \log(V_{bin})$, ou variância observada = variância binomial. Isso é o mesmo que dizer que $D = 1$ para todo o conjunto de dados. Se $b = 1$ e $A > 1$, então D é fixo e igual a A para todo o conjunto de dados, isto é, D não varia com p . Se $b > 1$, $\log(V_{obs})$ aumenta com $\log(V_{bin})$ a uma taxa maior que V_{bin} , isto é, D varia com mudança em p . Neste contexto, b é considerado um índice de agregação, embora a interpretação do valor de b nunca deva ser separada da interpretação do valor de A (MADDEN; HUGHES, 1995).

2.3.2. Análise da dinâmica e estrutura de focos (ADEF)

A ADEF foi desenvolvida por Nelson (1996), e utilizada por Laranjeira; Bergamin Filho e Amorim (1998) em estudos com a clorose variegada dos citros (*Xylella fastidiosa*), por Jesus Junior e Bassanezi (2004) na análise da morte súbita dos citros (agente causal ainda não determinado), por Ferreira; Abreu e Pereira (2009) na análise da mancha manteigosa do cafeeiro (*Colletotrichum* spp.). Na área florestal foi utilizada por Tumura, Pieri e Furtado (2012) com a Murcha de *Ceratocystis* do

Eucalipto (*Ceratocystis fimbriata*) e por Souza (2007) com cancro basal em *Eucalipto grandis* (*Cryphonectria cubensis* (Hodges, 1973)) e Masson (2009) com a ferrugem do eucalipto (*Puccinia psidii*).

A análise de dinâmica e estrutura de focos (ADEF) possibilita determinar um número razoável de descritores da epidemia, como o número de focos de plantas doentes, sua forma, o número médio de plantas por foco e sua compactidade em função da incidência da doença (BERGAMIN FILHO et al., 2004). As variáveis obtidas por meio da ADEF podem ser utilizadas para testes de hipóteses ou empregadas em conjunto a outras técnicas, para melhor entender determinado patossistema.

Esta técnica considera que somente pertencem ao mesmo foco as plantas com sintomas imediatamente adjacentes no padrão de proximidade vertical, horizontal ou diagonal. Dentro desse preceito, variáveis relacionadas podem ser definidas e seus valores calculados para dinâmica espacial. Dessa forma, o “número de focos” (N) é definido como o número total de focos de doença na matriz; “tamanho do foco” (TF) é definido como o número de plantas doentes no foco (cada planta reunindo critério de proximidade imediato), “dimensão do foco” é a distância máxima entre “linha” (nl) e “coluna” (nc) estendida pelo foco”.

Os focos unitários são aqueles compostos por apenas uma única planta afetada. Em todas as avaliações é possível determinar o número de focos (NF), seu tamanho, em termos de números de plantas em cada foco (NPF), e o número máximo de linhas (lf) e colunas (lc) ocupadas por cada foco (NELSON, 1996; BERGAMIN FILHO et al., 2004).

De posse desses valores, é possível determinar o índice de compactação do foco (ICF) (NELSON, 1996). Como contribuição no aprimoramento do método foi introduzida a variável índice de forma de foco (IFF) (LARANJEIRA et al., 1998). O ICF é obtido a partir do cálculo:

$$ICF = [\sum NPF / lci * lfi] / NF,$$

em que:

ICF = índice médio de compactação de focos;

lci = número máximo de colunas ocupadas no foco;

lfi = número máximo de linhas ocupadas no foco;

NF = número total de ocorrência de focos.

Valores de ICF próximos a 1,0 indicam focos mais compactos, isto é, maior agregação e proximidade entre todas as plantas pertencentes ao foco.

E o índice de forma de foco (IFF):

$$IFF = [\sum(lfi/ lci)] /NF].$$

em que:

IFF = índice médio de forma dos focos;

lfi = número máximo de linhas ocupadas no foco;

lci = número máximo de colunas ocupadas no foco; e

NF = número total de ocorrência de focos.

Em que, conforme Nelson (1996):

Valores de IFF = 1,0 indicam focos isodiamétricos.

Valores de IFF > 1,0 indicam focos com maior comprimento na direção entre as linhas de plantio.

Valores de IFF < 1,0 indicam focos com maior comprimento na direção da linha de plantio.

2.4. Análise temporal de doenças de plantas

Por meio da análise temporal é possível determinar a interação entre o patógeno, hospedeiro e ambiente, estabelecida por dados cumulativos de intensidade da doença (incidência e/ou severidade) ao longo do tempo configurando a curva de progresso da doença (VANDERPLANK, 1963).

Para expressar a intensidade da doença em função do tempo são utilizados modelos matemáticos. Estes resumem, na forma de expressões matemáticas, a realidade (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

Porém, modelos matemáticos são simplificações da realidade e dificilmente uma expressão matemática será capaz de reproduzir minuciosamente todos os fenômenos da natureza, mas estes são uma das poucas ferramentas disponíveis para se comparar epidemias e distinguir variedades, técnicas de manejo, bem como gerar modelos de previsão e auxiliar na quantificação de danos e perdas (BERGAMIN FILHO et al., 1995).

Vários modelos empíricos são propostos, entre eles destaca-se na área fitopatológica o Logístico, Gompertz e o Monomolecular. A análise temporal de uma

doença é realizada por ajuste de modelos matemáticos aos dados observados de incidência ou severidade da doença em campo (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

Os parâmetros obtidos com auxílio de ajuste de modelos podem servir para comparar a aplicação de produtos químicos, cultivares, bem como técnicas de manejo (JESUS JUNIOR et al., 2004). Dentre esses parâmetros citam-se: inóculo inicial (y_0), taxa de progresso da doença (r) e intensidade máxima de doença ($y_{máx}$) (JESUS JUNIOR et al., 2004).

Porém, antes da aplicação de modelos matemáticos é importante realizar a exploração gráfica de epidemia. Esta etapa evita caracterização errônea da epidemia. Graficamente, uma curva epidemiológica se representa mediante a intensidade de doença em sua forma acumulada e, ou, não acumulada, em relação ao tempo como variável independente (BERGAMIN FILHO et al., 1995). De forma geral, empregam-se a incidência ou severidade de uma doença em sua forma acumulada quando se tem interesse em determinar a “velocidade” de uma epidemia (taxa) por meio do ajuste epidemiológico clássico (BERGAMIN FILHO et al., 1995).

Assim, a análise numérica do progresso da doença deve iniciar com a representação gráfica dos dados de intensidade da doença (incidência ou severidade) em relação ao tempo (BERGAMIN FILHO et al., 1995).

A análise detalhada da curva de progresso, proporciona condições de definir estratégias de manejo sustentável (JESUS JUNIOR et al., 2004).

2.5. Melhoramento genético do eucalipto

O melhoramento genético florestal visa garantir o aumento da produtividade e da qualidade da madeira a cada ciclo de seleção, sem com isso comprometer a base genética da população (ODA; MENCK; VENCOVSKY, 1989), além de reduzir os impactos ambientais (GOLLE et al., 2009).

Entre os principais objetivos do melhoramento genético florestal também estão a redução de danos causados por doenças e pragas e a produção de árvores adaptadas para crescer em ambientes adversos (ZOBEL; TALBERT, 1992).

O melhoramento genético florestal teve maior desenvolvimento mundialmente em 1950. No Brasil esse desenvolvimento teve início partir de 1967, com a implantação da lei de incentivos fiscais ao reflorestamento (RESENDE, 1999). A partir de então, o

melhoramento genético florestal tem prestado grandes contribuições à silvicultura intensiva do país.

O melhoramento genético do eucalipto no Brasil iniciou-se com os estudos do pesquisador Dr. Edmundo Navarro de Andrade, em São Paulo, a partir de 1904 com a introdução de várias espécies de eucalipto pelo pesquisador, em um Horto de Jundiá, visando identificar as melhores espécies adaptadas as condições climáticas brasileira objetivando a produção de madeira (FERREIRA; SANTOS, 1997; SILVA; BARRICHELLO, 2006).

Posteriormente, em 1941, foi elaborado um programa de melhoramento genético do eucalipto pelos pesquisadores Dr. Edmundo Navarro de Andrade e Dr. Carlos Arnaldo Krug, com objetivos de melhorar a uniformidade das plantações, reduzir falhas, melhorar a forma do tronco, aumentar diâmetro e altura, melhorar capacidade de brotação bem como a produção por unidade de área (ASSIS; ABAD; AGUIAR, 2016). Esses pesquisadores indicaram as espécies de *E. grandis* e *E. uruphylla* como sendo as mais promissoras.

No entanto, o grande impulso ao melhoramento do eucalipto no Brasil se deu a partir da década de 1960, com a implementação da Lei de Incentivos Fiscais ao Reflorestamento, iniciou-se um intenso programa de melhoramento genético por meio da seleção de árvores superiores (ASSIS; ABAD; AGUIAR, 1996).

Com o objetivo de produzir sementes melhoradas, estudar espécies/procedências das espécies, implantação e manejo de florestas em novas áreas ecológicas, indicadas para o reflorestamento incentivado, algumas empresas privadas fundaram o Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais (IPEF), localizado na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (EZALQ) em 1968 (FERREIRA, 1993).

O primeiro plantio realizado pelo IPEF foi com sementes. No entanto, observou-se rapidamente que as árvores desse tipo de propagação apresentavam baixa produtividade e problemas com patógenos. Visando diminuir esses problemas, diferentes espécies de *Eucalyptus* foram cruzados para formar híbridos, com o objetivo de utilizar o melhor potencial de cada um (ASSIS, 1987; MARTINS; IKEMORI, 1987). Este procedimento reduziu a suscetibilidade a doenças devido à heterose, tendo como exemplo a resistência ao cancro do eucalipto causado pelo fungo *Cryphonectria cubensis* (HODGES; REIS, 1974).

Na década de 1970 os primeiros plantios de *E. grandis* de origem Australiana foram iniciados e elevaram o rendimento para 30 a 50 m³/ha/ano, e ocorreu a intensificação dos estudos de procedências das sementes das principais espécies (FERREIRA, 1992).

No final dos anos 70, a técnica propagação vegetativa de estacas foi introduzida no Brasil. Esta técnica consiste em enraizar estacas a partir de brotações colhidas no campo em cepas de árvores superiores (CAMPINHOS; IKEMORI, 1983). Atualmente esta técnica é conhecida por macroestaquia (ALFENAS et al., 2009).

Nos anos 80, a técnica de propagação clonal de eucalipto foi dominada e as empresas passaram a utilizá-las no programa de melhoramento, possibilitando a continuidade e a multiplicação de melhores combinações genéticas (CAMPINHOS; IKEMORI, 1983). Esse período proporcionou grande impulso ao setor florestal, permitindo formar plantios homogêneos, resistentes a doenças e de alta produtividade (ALFENAS et al., 2009).

Mesmo com o avanço de utilização de sementes para técnica de macroestaquia, ocorreram vários entraves, como o baixo percentual de enraizamento de alguns clones e as dificuldades inerentes aos tratos culturais, como irrigação, fertilização e controle de fitopatógenos, principalmente em períodos chuvosos (ALFENAS et al., 2009). Além disso há variações na capacidade de enraizamento entre espécies de *Eucalyptus* (PENCHEL et al., 1995) e a redução gradual e potencial de enraizamento com o envelhecimento ontogenético das matrizes (ASSIS, 1997).

Na década de 1990, a propagação clonal de *Eucalyptus* teve amplos avanços. A técnica de macroestaca foi substituída pelas técnicas microestaquia e miniestaquia (ASSIS; ROSA; GONÇALVES, 1992; ASSIS, 1997, 2001). Na microestaquia, os propágulos vegetativos, denominados microestacas, são obtidos mediante o rejuvenescimento a partir de micropropagação *in vitro*, enquanto na miniestaquia, *ex vitro*, estes são coletados dos ápices caulinares da própria estaca pelo método convencional de estaquia ou do estoque de mudas previamente enraizadas (ALFENAS et al., 2009).

A criação das técnicas de micropropagação e a miniestaquia foi um divisor de águas na evolução dos sistemas de clonagem de *Eucalyptus*, resultando em mudanças profundas nos principais segmentos técnicos que compõem essa atividade e marcou o

início de um novo ciclo na propagação de espécies lenhosas (ASSIS; ABAD; AGUIAR, 1996).

Atualmente, os principais desafios dos programas de melhoramento estão associados ao aumento de produtividade como, volume da madeira, celulose e biorredutor por unidade de área e tempo, adaptação a ambientes estressantes (bióticos e abióticos) e melhor qualidade da madeira para diversos produtos florestais (ASSIS; ABAD; AGUIAR, 2016).

2.5.1. Seleção de genótipos em testes clonais

Antes do plantio em escala comercial, os clones devem ser submetidos a testes clonais, o que consiste basicamente em plantá-los em diferentes condições edafoclimáticas, visando confirmar a superioridade do material genético originalmente selecionado (ALFENAS et al., 2009). O ideal é executar os testes clonais de modo a submetê-los a uma ampla diversidade de situações de ambiente possíveis de ocorrer na prática, que também possibilitem a avaliação da resistência as doenças que acometem a cultura (ALFENAS et al., 2009).

A técnica de clonagem de eucalipto contribuiu para o êxito das plantações de eucalipto em regiões mais quentes e úmidas, permitindo a formação de plantios homogêneos, resistentes a doenças e de alta produtividade (ALFENAS et al., 2009).

Diversos estudos têm buscado contribuir para o entendimento da resistência do eucalipto à murcha bacteriana, a maioria desses estudos que foram realizados no Brasil consistem em desenvolver métodos de inoculação e seleção de genótipos de eucalipto resistentes a doença (DIANESE; DRISTIG, CRUZC, 1990; COUTINHO et. al., 2000; MAFIA et al., 2014).

2.5.2. Estimativas dos parâmetros genéticos

As estimativas de componentes de variância e previsão de valores genéticos são procedimentos essenciais em programas de melhoramento. Atualmente, REML/BLUP (Máxima Verossimilhança Residual ou Restrita / Melhor Predição Linear Imparcial) é o procedimento padrão para a estimativa de parâmetros e seleção em várias espécies. (RESENDE, 2016).

Estimativas de parâmetros de seleção podem ser obtidas com uso do programa de Seleção Genética Computadorizada – Selegen – REML/BLUP (RESENDE, 2006), desenvolvido pelo Centro Nacional de Pesquisa de Florestas da Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, que aplica técnicas de avaliação genética envolvendo simultaneamente a predição de valores genéticos e a estimação de componentes de variância. O procedimento adotado pelo aplicativo para predição de valores genéticos é o BLUP (melhor predição linear não viesada), utilizando estimativas de componentes de variância obtidas pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML).

O programa emprega os modelos, estimadores e preditores apresentados por Resende (2006, 2016) e pode ser utilizado para plantas alógamas, autógamas e com sistema reprodutivo misto.

3. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, 5th Ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005, 952 p.
- ALBUQUERQUE, G. M. R.; SILVA, A. M.; SILVA, J. R.; MELO, E. A.; MARIANO, R. L.; LEMOS, M. C.; FERRAZ, E.; SOUZA, E. B. Sequevar distribution of *Ralstonia* spp. in Solanaceae in the semiarid climate of the Pernambuco state, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 159, n. 1, p. 13-25, 2021.
- ALFENAS, A. C. Doenças: fatores limitantes. **Opiniões**, p. 40-41, 2018.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; SARTÓRIO, R. C.; BINOTI, D. H.; SILVA, R. R.; LAU, D.; VANETTI, C. A. *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 357-366, 2006.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2009, 500 p.
- ARAHAL, D.R.; LLOP, P.; ALONSO, M.; LÓPEZ, M. M. In silico evaluation of molecular probes for detection and identification of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 581-591, 2004.
- ARRIEL, D. A. A.; FONSECA, N. R.; GUIMARÃES, L. M. S.; HERMENEGILDO, P. S., MAFIA, R. G.; BORGES JÚNIOR, N.; ALFENAS, A. C. Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. **Forest Pathology**, v. 44, n. 4, p. 255-265, 2013.
- ASSIS, T. F.; ABAD, J. I. M.; AGUIAR, A. M. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte (Brasil)**, v. 18, p. 32-51, 1996.
- ASSIS, T. F.; ABAD, J. I. M.; AGUIAR, A. M. Melhoramento genético do eucalipto. In: SCHUMACHER, M. V.; VIERA, M. **Silvicultura do eucalipto no Brasil**. Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciência: UFSM, 2016.
- ASSIS, T. F. Evolution of technology for cloning Eucalyptus in large scale. **Developing the Eucalypt of the Future**, p. 1-16, 2001.
- ASSIS, T.F. Propagação vegetativa de Eucalyptus por microestaquia. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Colombo: EMBRAPA/CNPQ, 1997. v. 1. p. 300-304.
- ASSIS, F.T. Produção de híbridos interespecíficos em Eucalyptus spp. In: REUNIÃO SOBRE TÉCNICAS PARA PRODUÇÃO DE HÍBRIDOS, 1987, Piracicaba, São Paulo. **Anais...** Piracicaba: IPEF, 1987. p. 2-5.

ASSIS, T.F.; ROSA, O.P.; GONÇALVES, S.I. Propagação clonal de *Eucalyptus* por microestaquia. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7. Nova Prata, 1992. Anais... Santa Maria: UFSM, 1992. p. 824-837.

AUER, C. G.; DOS SANTOS, A. F.; RODRIGUES NETO, J. Ocorrência de murcha bacteriana em plantios de *Eucalyptus grandis* no Estado de Santa Catarina. In: **Embrapa Florestas-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. Tropical Plant Pathology, v. 33, nesp., S 90, BAC-007, ago. 2008, 2008.

BACHA, C. J. C. Análise da evolução do reflorestamento no Brasil. **Revista de Economia Agrícola**, v. 55, n. 2, p. 5-24, 2008.

BERGAMIN FILHO, A. Curvas de Progresso da doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. v. 3, p. 602-626, Ceres, São Paulo, 1995.

BERGAMIM FILHO, A.; HAU, B.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F.F. Análise espacial de epidemias. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: EMBRAPA, v. 10, p. 155-218, 2002.

BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B.; AMORIM, L.; JESUS JUNIOR, W. C. Análise Espacial de Epidemias. In: VALE, F. X. R.; JESUS JUNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil, p. 195-240, 2004.

BUDDENHAGEN, I.; KELMAN, A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual review of phytopathology**, v. 2, n. 1, p. 203-230, 1964.

BUDDENHAGEN, I.; SEQUEIRA, L.; KELMAN. Designations of races in *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v. 52, p. 726, 1962.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. 1. ed. New York: Wiley-Blackwell, 1990, 532 p.

CAMPINHOS, E. J.; IKEMORI, Y. K. Nova técnica para produção de mudas de essências florestais. **IPEF**, v. 23, p. 47-52, 1983.

CAO, J. D. Investigation of bacterial wilt in *Eucalyptus saligna* and *E. grandis* introduced from Brazil. **Guangxi Forestry Science and Technology**, v. 4, p. 30-31, 1982.

CARSTENSEN, G. D.; VENTER, S. N. WINGFIELD, M. J.; COUTINHO, T. A. Two *Ralstonia* species associated with bacterial wilt of Eucalyptus. **Plant Pathology**, v. 66, n. 3, p. 393-403, 2017.

CHOUDHARY, D. K.; NABI, S. U.; DAR, M. S.; KHAN, K. A. *Ralstonia solanacearum*: A wide spread and global bacterial plant wilt pathogen. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 2, p. 85-90, 2018.

COUTINHO, T. A.; ROUX, J.; RIEDEL, K. H.; TERBLANCHE, J.; WINGFIELD, M. J. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. **Forest Pathology**, v. 30, n. 4, p. 205-210, 2000.

COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J. *Ralstonia solanacearum* and *R. pseudosolanacearum* on Eucalyptus: Opportunists or Primary Pathogens?. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 761, 2017.

DENNY, T. P. Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: GNANAMANICKAM, S. S. **Plant Associated Bacteria**, Dordrecht: Springer, p. 573-644, 2006.

DIANESE, J. C.; DRISTIG, M. C. G.; CRUZ, C. A. P. Susceptibility to wilt associated with *Pseudomonas solanacearum* among six species of Eucalyptus growing in equatorial Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v. 19, n. 3, p. 71-76, 1990.

DIANESE, J. C.; TAKATSU, A. *Pseudomonas solanacearum* biovar 1 isolada de eucalipto em Monte Dourado, Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, p. 362, 1985.

DRISTIG, M. C. G.; DIANESE, J. C.; TAKATSU, A. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* isolated from Eucalyptus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, p. 106, 1988.

ELPHINSTONE, J. G. The current bacterial wilt situation: A global overview. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. **Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex**. American Phytopathological Society, Minnesota: St. Paul, 2005, p. 9-28.

FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**, v. 1, p. 449-461, 2005.

FERREIRA, J.; ABREU, M. S.; PEREIRA, I. S. Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 24-30, 2009.

FERREIRA, M. A contribuição do setor de sementes do LCF/IPEF para a silvicultura intensiva brasileira. **IPEF Piracicaba**, v. 46, p. 8-31, 1993.

FERREIRA, M. Melhoria e a silvicultura intensiva clonal. **Série Técnica IPEF**, n. 45, p. 22-30, 1992.

FERREIRA, M. A.; HARRINGTON, T. C.; GONGORA-CANUL, C. C.; MAFIA, R. G.; ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C. Spatial-temporal patterns of *Ceratocystis* wilt in *Eucalyptus* plantations in Brazil. **Forest Pathology**, v. 43, n. 2, p. 153-164, 2013.

FERREIRA, M. A. **Estrutura genética de populações de *Ceratocystis fimbriata* e padrão espaço-temporal da murcha-de-*Ceratocystis***. 2009, 107 f. Tese de doutorado em Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

- FERREIRA, M. A.; MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C. *Ralstonia solanacearum* decreases volumetric growth of trees and yield of kraft cellulose of *Eucalyptus* spp. **Forest Pathology**, v. 48, n. 1, 2018.
- FERREIRA, M.; SANTOS, P.E.T. Melhoramento genético florestal dos *Eucalyptus* no Brasil: breve histórico e perspectivas. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, v.1, 1997, Colombo: Embrapa/CNPF, 1997, p.14-34.
- FONSECA, N. R.; GUIMARÃES, L. M. S.; HERMENEGILDO, P. S.; TEIXEIRA, R. U.; LOPES, C. A.; ALFENAS, A. C. Molecular characterization of *Ralstonia solanacearum* infecting *Eucalyptus* spp. in Brazil. **Forest Pathology**, v. 44, n. 2, p. 107-116, 2014.
- FONSECA, N. R.; OLIVEIRA, L. S.; GUIMARÃES, L. M.; TEIXEIRA, R. U.; LOPES, C. A.; ALFENAS, A. C. An efficient inoculation method of *Ralstonia solanacearum* to test wilt resistance in *Eucalyptus* spp. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 42-47, 2016.
- FREITAS, R. G.; HERMENEGILDO, P. S.; GUIMARÃES, L. M.; ZAUZA, E. A.; BADEL, J. L. ALFENAS, A. C. Detection and characterization of *Ralstonia pseudosolanacearum* infecting *Eucalyptus* sp. in Brazil. **Forest Pathology**, v. 50, n. 3, p. e12593, 2020.
- GILLIGAN, C. A. Modeling of soilborne pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 21, p. 45-65, 1983.
- GILLINGS, M.; FAHY, P. Genomic fingerprinting and PCR analysis: rapid, sensitive and inexpensive means of differentiating strains of *Pseudomonas solanacearum*. In: **ACIAR proceedings**. Australian Centre for International Agricultural Research, 1993. p. 85-85.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; BEVILACQUA, C. B.; Forestry improvement: emphasis on biotechnology application. **Ciência Rural**, v.39, n.5, p.1607-1614, 2009.
- GRAHAM, J.; JONES, D. A.; LLOYD, A. B.; Survival of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in plant debris and in latently infected potato tubers. **Phytopathology**, v. 69, n. 10, p. 1100-1103, 1979.
- GRAHAM, J.; LLOYD, A. B. An improved indicator plant method for the detection of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in soil [Potatoes, bacterial wilt]. **The Plant Disease Bulletin**, v. 62, n. 1-6, p. 35, 1978.
- GRAHAM, J.; LLOYD, A. B. Survival of potato strain (race 3) of *Pseudomonas solanacearum* in the deeper soil layers. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 30, n. 3, p. 489-496, 1979.

- GOTTWALD, T. R.; SUN, X.; RILEY, T.; GRAHAM, J. H.; FERRANDINO, F.; TAYLOR, E. L. Geo-Referenced Spatiotemporal Analysis of the Urban Citrus Canker Epidemic in Florida. **Phytopathology**, v. 92, n. 4, p. 361-377, 2002.
- HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual review of phytopathology**, v. 29, p. 65-87, 1991.
- HAYWARD, A. C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 27, n. 2, p. 265-277, 1964.
- HAYWARD, A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD A. C.; HARTMAN, G. L. **Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford, UK: CAB International, p. 9-24, 1994.
- HODGES, C.S.; REIS, M.S. A influência do cancro basal causada por *Diaporthe cubensis* na brotação de *Eucalyptus saligna* SM. **Brasil Florestal**, v.18, p.25-28, 1974.
- HUGHES, G.; GOTTWALD, T. R. Survey methods for assessment of *Citrus tristeza virus* incidence when *Toxoptera citricida* is the predominant vector. **Phytopathology**, v. 89, p. 487-494, 1999.
- HUGHES, G.; MADDEN, L. V. Aggregation and incidence of disease. **Plant Pathology**, v. 41, p. 657-660, 1992.
- IBÁ. INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório Anual IBÁ 2020. Ano base 2019. Brasília, 2020.
- IBÁ. INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório Anual IBÁ 2017. Ano base 2016. Brasília, 2017.
- JEGER, M. J. **Spatial Components of Plant Disease Epidemics**. New Jersey: Prentice Hall, 1989.
- JESUS JUNIOR, W.C.; BASSANEZI, R.B. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 399-405, 2004.
- JESUS JUNIOR, W. C.; POZZA, E. A.; VALE, F. X. R.; AGUILERA, G. M. Análise temporal de epidemias. In: VALE, F. X. R.; JESUS JUNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil, 2004. p. 127-188.
- LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; Dinâmica e estrutura de focos da clorose variegada dos citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 36-41, 1998.
- LAPAGE, S. P. **International code of nomenclature of bacteria, and Statutes of the International Committee on Systematic Bacteriology, and Statutes of the Bacteriology Section of the International Association of Microbiological Societies: bacteriological code**. 1976 rev. 1975.

- 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.; TAKATSU, A.; Controle da murcha bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 224-225, 1997.
- LOWE-POWER, T.; CHIPMAN, K. A Meta-analysis of the known Global Distribution and Host Range of the *Ralstonia* Species Complex. **bioRxiv**, 2020.
- KELMAN, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Technical Bulletin of North Carolina Agricultural Experiment Station**, n. 99, 1953.
- KELMAN, A. One hundred and one years of research bacterial wilt. **In Bacterial Wilt Disease**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1-5, 1998.
- MADDEN, L. V. HUGHES, G. Plant disease incidence: distributions, heterogeneity and temporal analysis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, n. 1, p. 529-564, 1995.
- MAFIA, R.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, M. A. Avaliação da resistência do eucalipto à murcha-bacteriana *Ralstonia solanacearum*. **Revista Árvore**, v. 38, n. 4, p. 649-656, 2014.
- MAFIA, R.; 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**, v. 36, n. 4, p. 593-602, 2012.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de desenvolvimento de florestas plantadas**, Brasília, 2018.
- MARQUES, E.; UESUGI, C. H.; FERREIRA, M. A.; REZENDE, D. V. D. Characterization of isolates of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, pathogenic to Eucalyptus "urograndis" hybrids. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 6, p. 399-408, 2012.
- MARQUES, E.; REZENDE, D. V.; UESUGI, C. H.; Primeiro relato da biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* em eucalipto no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. sSupl, 2009.
- MARTINS, F.C.G.; IKEMORI, Y.K. Produção de híbridos de eucalipto na Aracruz. In: REUNIÃO SOBRE TÉCNICAS PARA PRODUÇÃO DE HÍBRIDOS, 1987, Piracicaba, SP. **Anais...**Piracicaba, IPEF, 1987. p. 48-62.
- MASSON, M. V. **Ferrugem do eucalipto**: planejamento evasivo, estimativa de dano e análise da viabilidade do controle químico. 2009. 167 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

- MCCARTER, S. M. Greenhouse studies on the spread of *Pseudomonas solanacearum* in tomato plants by clipping. **Plant Dis. Rep.**, v. 52, p. 330-334, 1968.
- MCCARTER, S. M.; JAWORSKI, C. A. Field studies on spread of *Pseudomonas solanacearum* and tobacco mosaic virus in tomato plants by clipping. **Plant disease reporter**, 1969.
- MICHEREFF, S. J.; PERUCH, L. A. M.; ANDRADE, D. E. G. T. Manejo Integrado de Doenças Radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Universidade Federal e Rural de Pernambuco, 2005. p. 378-386.
- MORA, A. L. GARCIA, C. H. **A Cultura do Eucalipto no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000. 111p.
- MORAIS DE, T. P.; LOPES, C. A.; TEBALDI, N. D.; LUZ, J. M. Q. Occurrence and diversity of *Ralstonia solanacearum* populations in Brazil. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 6, 2015.
- NELSON, S.C. A simple analysis of disease foci. **Phytopathology**, v. 86, n. 4, p. 332-339, 1996.
- ODA, S.; MENCK, A. L. M.; VENCOVSKY, R. Problemas no melhoramento genético clássico do eucalipto em função da alta intensidade de seleção. **IPEF, Piracicaba**, v. 41, p. 42, 1989.
- PAUDEL, S.; DOBHAL, S.; ALVAREZ, A. M.; ARIF, M. Taxonomy and Phylogenetic Research on *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Complex Pathogen with Extraordinary Economic Consequences. **Pathogens**, v. 9, n. 11, p. 886, 2020.
- PENCHEL, R.; NEVES, D.; CAMPINHOS, C.; EVANGELISTA, A.; DESCHAMPS, C. Otimização de parâmetros fisiológicos da propagação vegetativa por estaquia de matrizes elite de eucaliptos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL. **Resumos...**, v. 5, 1995, Lavras: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 1995. 83 p.
- PINHEIRO, C. R.; AMORIM, J. A. E.; DINIZ, L. E. C.; DA SILVA, A. M. F.; TALAMINI, V.; JÚNIOR, M. T. S. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* e caracterização molecular quanto a filotipos e sequevares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 6, p. 587-592, 2011.
- PRIOR, P., AILLOUD, F., DALRING, B. L., REMENANT, B., SANCHEZ, B., ALLEN, C. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BMC genomics**, v. 17, n.1, p. 1-11, 2016.
- REMENANT, B.; De CAMBIAIRE, J. C.; CELLIER, G.; JACOBS, J. M.; MANGENOT, S., BARBE, V.; PRIOR, P. *Ralstonia syzygii*, the blood disease

bacterium and some Asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24356, 2011.

RESENDE, M. D. V. de. Melhoria de essências florestais. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, p. 589-647, 1999.

RESENDE, M. D. V. de. O Software Selegen-Reml/Blup. **Documentos-Embrapa Florestas**, p. 305, 2006.

RESENDE, M. D. V. Software Selegen-REML/BLUP: a useful tool for plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 330-339, 2016.

RISTAINO, J. B.; GUMPERTZ, M. L. New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, n.1, p. 541-576, 2000.

ROBBS, C.F.; CRUZ, A.P.; NETO, J.R. **Algumas estratégias de controle à murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em eucaliptos**. EMBRAPA, Jaguariúna, SP. Comunicado Técnico, n. 3. p. 4, 1988.

ROBERTS, D. P.; DENNY, T. P.; SCHELL, M. A. Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 4, p. 1445-1451, 1988.

SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; FEGAN, M.; SLY, L.; KAPPLER, U. 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 ... **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3087-3103, 2014.

SANTIAGO, T. R.; GRABOWSKI, C.; ROSSATO, M.; ROMEIRO, R. S.; MIZUBUTI, E. S. Biological control of eucalyptus bacterial wilt with rhizobacteria. **Biological Control**, v. 80, p. 14-22, 2015.

SANTIAGO, T. R.; LOPES, C. A.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; MIZUBUTI, E. S. G. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. **Plant pathology**, v. 66, n. 3, p. 383-392, 2017.

SANTORA, E.; PENTEADO JÚNIOR, J. F.; GOULART, I. C. G. R. Transferência de Tecnologia Florestal: cultivo de eucalipto em propriedades rurais, diversificação da produção e renda. **Embrapa Florestas-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2014.

SEAL, S.E.; JACKSON, L.A.; YOUNG, J.P.W.; DANIELS, M.J. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of

ligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. **Journal of General Microbiology**, v.139, n. 7, p. 1587-1594, 1993.

SEAL, S.E.; JACKSON, L.A.; DANIELS, M.J. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p. 3759-3761, 1992.

SEQUEIRA, L.; GRANADA, G. A. Survival of *Pseudomonas solanacearum* at low temperature. **Fitopatologia**, 1983.

SILVA, P.H.M.; BARRICHELO L.E.G. Progressos recentes na área florestal. In: PATERNIANI, E. **Ciência, Agricultura e Sociedade**. Brasília: Embrapa, p.439-456. 2006.

SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Bergey's Manual Trust, New York, v. 2, 1986.

SMITH, E. F. A bacterial disease of tomato, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* sp.). **Department of Agriculture Division of Vegetable Physiology and Pathology**, Bulletin, n. 12, p. 05-28, 1896.

SUDO, S.; OLIVEIRA, G.H.N.; PEREIRA, A.C. Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e bracinga (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p. 631. 1983.

SOUZA, S. E. de. **Dinâmica espaço-temporal e danos do cancro basal em *Eucalyptus grandis***. 2007. 173 f. (Tese de doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu, 2007.

SUPRIADI, D.; MULYA, K.; SIPETU, D. Bacterial wilt disease of woody trees caused by *Ralstonia solanacearum*: a review. **Journal Penelitian dan Pengembangan Pertanian**, v. 20, p. 106-112, 2001.

TAHAT, M. M.; SIJAM, K. *Ralstonia solanacearum*: The bacterial wilt causal agent. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 9, n. 7, p. 385, 2010.

TAYLOR, L. R. Aggregation, variance and the mean. **Nature**, v. 189, p. 732-735, 1961.

TUMURA, K. G.; DE PIERI, C.; FURTADO, E. L. Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.1, p. 54-60, 2012.

VALE, F. X. R.; JESUS JUNIOR., W. C.; ZAMBOLIM, L. Natureza das epidemias. In: VALE, F. X. R.; JESUS JUNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil, p. 21-48. 2004.

VANDERPLANK, J. E. **Plant diseases: epidemics and control**. New York: Academic Press, 1963. 349 p.

VASSE, J.; FREY, P.; TRIGALET, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.8, p. 241–251, 1995.

VON PARSEVAL, M. Uma doença do fumo e batata inglesa no município de Santa Cruz, RS, causada pelo *primeiro*. **Boletim do Instituto Borges de Medeiros**. Porto Alegre, 1922, 1: 13.

WICKER, E.; LEFEUVRE, P.; DE CAMBIAIRE, J. C.; LEMAIRE, C.; POUSSIER, S.; PRIOR, P. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. **The ISME journal**, v. 6, n. 5, p. 961-974, 2012.

WILCKEN, C. F.; LIMA, A. C. V.; DIAS, T. K. R.; MASSON, M. V.; FERREIRA FILHO, P. J.; DAL POGETTO, M. H. F. do A. **Guia Prático de Manejo de Plantações de Eucalipto**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 2008. 19 p.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; ARAKAWA, M. Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas homology* group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. v. 36, n. 12, p. 1251-1275, 1992.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology and immunology**, v. 39, n. 11, p. 897-904, 1995.

ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; PEREIRA, O. L. **O Essencial da Fitopatologia: Agentes Causais**. v. 2, Viçosa: UFV. 2012. 418 p.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. JULIATTI, F. C. Manejo Integrado: Medidas de Controle. In: VALE, F. X. R.; JESUS JÚNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil, 21-48, 2004.

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales**. México: Limusa, 1988.

4 CAPÍTULO 1 - Dinâmica espaço-temporal da murcha bacteriana do eucalipto

RESUMO

A murcha bacteriana (*Ralstonia* spp.) é uma das principais doenças da cultura do eucalipto (*Eucalyptus* spp.), responsável por enormes prejuízos aos produtores. As estratégias de manejo baseiam-se principalmente na utilização de materiais com níveis de resistência ao patógeno. Porém, para que o manejo seja realizado de forma eficiente, com base científica, há necessidade de entendimento dos diversos fatores envolvidos no desenvolvimento da doença. Diante do exposto há necessidade de maior compreensão sobre a epidemiologia (estrutura e comportamento) do patossistema *Ralstonia* spp. - *Eucalyptus* spp. Assim, este trabalho teve por objetivo estudar a dinâmica espaço-temporal da murcha bacteriana do eucalipto, em condições naturais de infecção em plantio comercial. Para tal foi instalado um experimento em plantio comercial, no município de Itinga, estado do Maranhão, empregando-se o clone FGCA0385 de eucalipto (*E. urophylla* var. *platyphylla*). O estudo foi conduzido em quatro parcelas/repetições composta por 450 plantas cada, subdivididas em nove linhas com 50 plantas por linha e espaçamento 3x3 metros. A quantificação da incidência da doença foi efetuada por um ano. A dinâmica espacial da doença foi realizada determinando-se o Índice de Dispersão (ID), a Lei de Taylor Modificada e a Análise da Dinâmica e Estrutura de Focos (ADEF). Para dinâmica temporal plotou-se a curva de progresso da incidência da doença, e os dados foram analisados por análise de regressão linear simples, ajustados para três modelos empíricos, Logístico, Monomolecular e Gompertz. Houve padrão de agregação para plantas sintomáticas de murcha bacteriana do eucalipto constatado pela Lei de Taylor Modificada. Quanto à análise da dinâmica e estrutura dos focos (ADEF), constatou-se a ocorrência de 69 focos da doença, sendo 44 unitários, e número médio de plantas por foco de 1,63. Os focos possuem maior comprimento na direção da linha de plantio e foram caracterizados como não compactados. As epidemias foram melhor descritas pelo modelo Monomolecular, sendo estimada a incidência de 48,98% no sétimo ano de estudo, para murcha bacteriana do eucalipto.

Palavras-chave: Análise espacial. Análise temporal. Epidemiologia. *Ralstonia* spp. Manejo de doença.

ABSTRACT

Bacterial wilt (*Ralstonia* spp.) is one of the main diseases in the culture of eucalyptus (*Eucalyptus* spp.), responsible for huge losses to producers. Management strategies are based mainly on the use of materials with levels of resistance to the pathogen. However, for the management to be carried out efficiently, with scientific basis, there is a need to understand the various factors involved in the development of the disease. In view of the above there is a need for more understanding about the epidemiology (structure and behavior) of the *Ralstonia* spp. - *Eucalyptus* spp. Thus, this work aimed to study the spatio-temporal dynamics of eucalyptus bacterial wilt under natural infection conditions in a commercial plantation. To this end, an experiment was set up in a commercial plantation located at Itinga, in the state of Maranhão, using the eucalyptus clone FGCA0385 (*E. urophylla* var. *platyphylla*). The study was conducted in four installments/repetitions composed of 450 plants each, subdivided into nine rows with 50 plants per row and spacing 3x3 meters. The disease incidence was quantified for one year. The spatial dynamics of the disease was performed by determining the Index of Dispersion (ID), the Modified Taylor's Law (MTL) and the Dynamics and Structure Analysis of the Foci (DSAF). For temporal dynamics the disease incidence progress curve was plotted, and the data were analyzed by simple linear regression analysis, fitted to three empirical models, Logistic, Monomolecular and Gompertz. There was an aggregation pattern for plants symptomatic of eucalyptus bacterial wilt verified by Modified Taylor's Law. As for the analysis of the dynamics and structure of the foci (DSAF), 69 foci of the disease occurred, 44 of which were unitary, and the average number of plants per foci was 1.63. The foci have greater length in the direction of the planting line and were characterized as not compacted. The epidemics were best described by the Monomolecular model, with an estimated incidence of 48.98% in the seventh year of the study for eucalyptus bacterial wilt.

Keywords: Spatial analysis. Temporal analysis. Epidemiology. *Ralstonia* spp. Disease management.

4.1. INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana é uma doença de ocorrência mundial, sua etiologia está atribuída ao complexo de espécies *Ralstonia solanacearum*. Além de ser um microrganismo cosmopolita a bactéria afeta plantas de 54 famílias botânicas e mais de 250 espécies de plantas (HE; SEQUEIRA; KELMAN, 1983; HAYWARD, 1994; PRIOR et al., 2016; PAUDEL et al., 2020).

Além de afetar um número elevado de hospedeiros em culturas agrícolas, a bactéria também provoca doença em espécies lenhosas economicamente e ambientalmente importantes, como *Eucalyptus* spp (SUPRIADI et al., 2001) e *Casuarina equisetifolia* (AYIN et al., 2019; SUN et al., 2020).

A murcha bacteriana foi relatada pela primeira vez em plantações de eucalipto na China (CAO, 1982). No Brasil foi registrado o primeiro caso de *R. solanacearum* em plantios de *Eucalyptus grandis* no início da década de 1980 em Minas Gerais (SUDO; OLIVEIRA; PEREIRA, 1983). Em 2005 a murcha bacteriana causou perdas em viveiros de eucalipto nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Maranhão, Minas Gerais e Pará (ALFENAS et al., 2006).

Recentemente constatou-se também a ocorrência do filotipo I (*Ralstonia pseudosolanacearum*) causando murcha de eucalipto no Brasil no município de Dom Eliseu, Maranhão (FREITAS et al., 2020).

Ralstonia solanacearum é um patógeno transmitido pelo solo, que infecta as plantas por meio das raízes (HAYWARD, 1991). Após colonizar o córtex da raiz, invade os vasos do xilema e atinge as partes aéreas da planta, bloqueando o transporte de água (MANSFIELD et al., 2012; COUTINHO; WINGFIELD, 2017). A bactéria pode se multiplicar rapidamente no xilema até provocar restrição do fluxo de fotoassimiladores e sintomas de murcha e morte da planta (MANSFIELD et al., 2012; COUTINHO; WINGFIELD, 2017; CHOUDHARY et al., 2018).

Na cultura do eucalipto dependendo da intensidade da doença causa o subdesenvolvimento ou a morte das plantas, resultando em desuniformidade do plantio em campo (ALFENAS et al., 2006).

Ralstonia solanacearum foi listado como o segundo patógeno mais destrutivo entre as bactérias fitopatogênicas com sérias consequências econômicas (MANSFIELD et al., 2012). Na cultura do eucalipto essas consequências se dão em razão da natureza

sistêmica das infecções, dos danos e perdas causados em viveiro e no campo e das várias características do patossistema que dificultam o manejo (MAFIA et al., 2012).

Diante de um cenário, em que tem sido registrado diversos casos de mortalidade de plantas de *Eucalyptus* ssp. tanto em viveiro quanto em condições de campo, é fundamental entender a dinâmica da doença no tempo e no espaço, visando fornecer informações que auxiliem na tomada de decisão quanto ao manejo efetivo da doença.

Considerando a importância do patossistema murcha bacteriana para as plantações de eucalipto, e dos poucos estudos sobre como o patógeno *R. solanacearum* é disseminado ao longo do tempo e espaço, o objetivo com esse estudo é descrever a dinâmica espaço-temporal dessa doença.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Caracterização da área de estudo

O estudo foi realizado em condições de plantio comercial, monoclonal, na Fazenda São Francisco, localizada no município de Itinga-MA, Brasil (coordenadas geográficas Lat.: -4.609553 e Long.: -47.549055), (Figura 1). O solo da área de plantio é classificado como Argissolo, amarelo, Tb distrófico, Típico, A moderado com textura argilosa/média (SANTOS et al., 2018) e relevo suavemente ondulado. De acordo com a classificação climática de Köppen e Geiger o clima do município Itinga é do tipo Aw (tropical) com temperatura média histórica de 26.5 °C e pluviosidade média anual de 1.462 mm.

O plantio foi implantado em novembro de 2015 em uma área utilizada anteriormente com pastagem do gênero *Brachiaria* sp, adotada para pastejo bovino. Para o plantio empregando-se o clone UFGCA0385 da espécie *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* em espaçamento 3x3m, produzido em jardim clonal.

Para a implantação do plantio foi realizado preparo do solo. Este consistiu em calagem com a aplicação de 1.500 kg/ha de calcário dolomítico por meio de subsolagem a 60 cm e gradagem convencional para maximizar a eficiência da técnica adotada. Posteriormente, realizou-se a adubação química do solo que foi dividida em duas etapas. A primeira, cinco dias antes do plantio, consistiu em adubação básica com 320 kg/ha de NPK (10-30-10). A segunda, dez dias após o plantio, consistiu na adubação de cobertura

com fornecimento de 700 kg/ha de NPK (10-05-20). Além das práticas edáficas, foram realizados tratos culturais para controle de plantas daninhas e de pragas.

A partir da constatação da ocorrência de murcha bacteriana no plantio por infecção natural montou-se um experimento para avaliar o progresso da doença.

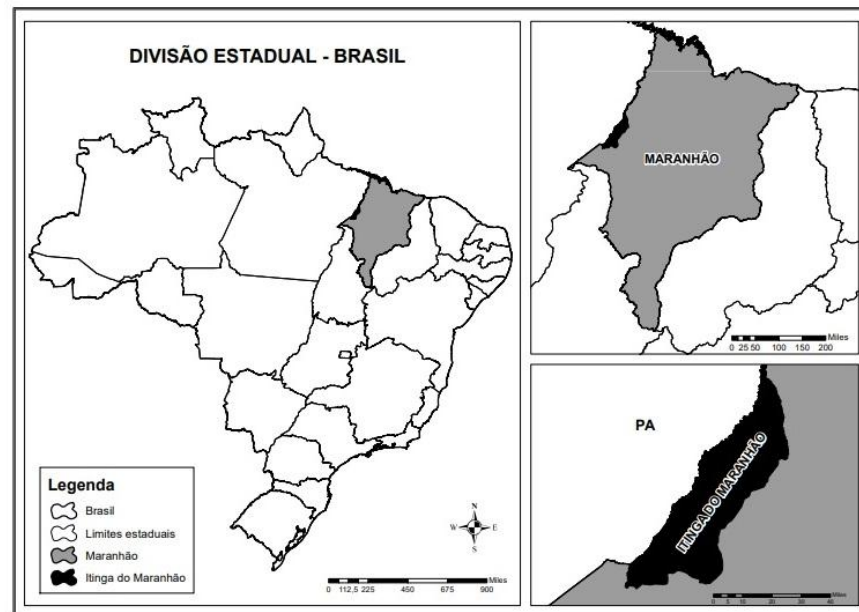


Figura 1: Localização do município de Itinga-MA.

Fonte: a autora

O experimento foi implantado aos 5 meses após o plantio comercial com início em abril de 2016 e término em abril de 2017 quando foi realizado o corte do povoamento florestal.

O estudo foi conduzido em quatro parcelas/repetições (parcelas: P1, P2, P3 e P4), com 450 plantas por parcela. As parcelas foram compostas de nove linhas com 50 plantas cada (Figura 2).

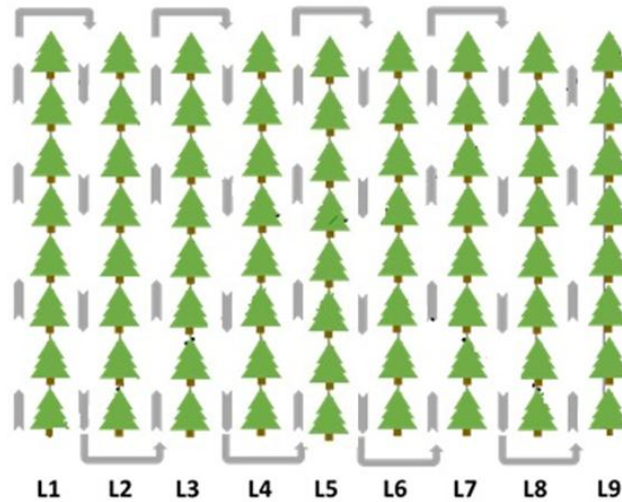


Figura 2: Exemplificação das parcelas experimentais mostrando a disposição das plantas e o caminhamento realizado para avaliação das plantas, indicado pelas setas. Itinga-MA.
Fonte: Suzano

A doença foi diagnosticada à campo com base na sintomatologia (murcha (Figura 3A), seguida de desfolha parcial ascendente (Figura 3B), necrose cambial (Figura 3C) e exsudação de pus bacteriano de coloração creme (Figura 3D)).

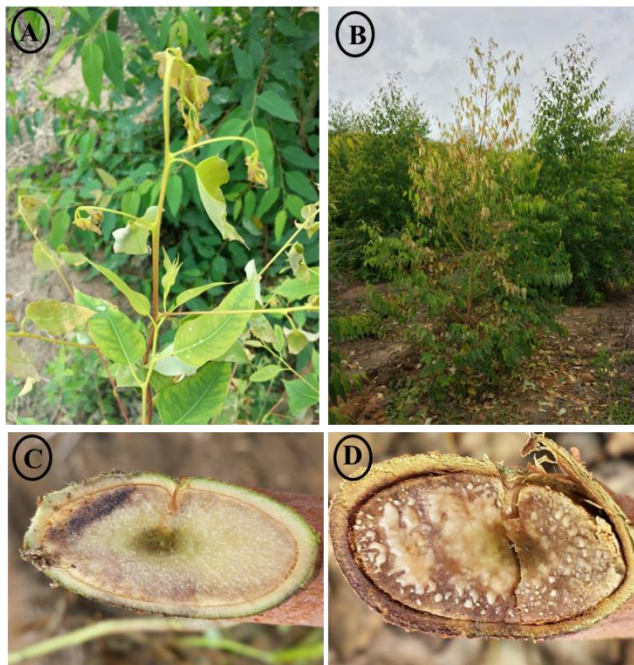


Figura 3: Sintomatologia da murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia* spp.), (a) murcha do ápice da muda, (b) desfolha parcial ascendente, (c) necrose cambial, (d) exsudação de pus bacteriano de coloração creme. Itinga-MA.
Fonte: Suzano

A incidência da doença (presença ou ausência de sintomas) foi avaliada mensalmente por 360 dias. Como forma de avaliação foi realizado o caminhamento em linhas de plantio, com início na linha 1, horizontalmente de baixo para cima e sequencialmente de cima para baixo até a linha 9 (Figura 2).

4.2.2. Análise espacial

O estudo da distribuição espacial da murcha bacteriana do eucalipto deu-se por meio de análise dos padrões espaciais nas parcelas experimentais em campo, com a determinação do Índice de Dispersão, Lei de Taylor Modificada e Análise da Dinâmica e Estrutura de Focos (ADEF).

4.2.2.1 Índice de Dispersão e aplicação da Lei de Taylor modificada

Realizou-se a análise do padrão espacial da murcha bacteriana do eucalipto por meio de mapeamento das parcelas a partir de dados binários (presença e ausência de plantas doentes) de acordo com a metodologia de Gottwald et al., 1995; Madden et al., 1995; Laranjeira et al., 1998. Também foi calculada a incidência da doença por avaliação com a seguinte fórmula:

$$p = D/T$$

Em que:

p = incidência de plantas doentes;

D = número total de plantas doentes na área experimental; e

T = número total de plantas.

Portanto, os dados de incidência foram a base para o cálculo do índice de dispersão (ID).

Para demonstrar como a doença progride no espaço, gerou-se mapas, onde cada mapa representava uma avaliação da doença realizada mensalmente em cada parcela, totalizando 13 mapas por parcela. Posteriormente para o cálculo do índice de dispersão os mapas foram divididos em quadrantes. Com a finalidade de determinar qual dimensão de quadrante melhor representava o padrão biológico da doença, ou seja, o padrão de dispersão da doença testou-se três dimensões de quadrantes, ambos divididos por linhas e colunas, a saber: (2x3) com 06 plantas, (5x3) com 15 plantas e (10x3) com

30 plantas formando mapas com 75, 30 e 15 quadrantes respectivamente. A análise do índice de dispersão foi obtida com auxílio do software Excel do pacote Office da Microsoft, tanto para a confecção do mapa de dispersão quanto para realização dos cálculos.

A análise de distribuição das plantas com murcha bacteriana dentro dos quadrantes, em cada avaliação foi estimada pela análise binomial, por meio do cálculo do índice de dispersão binomial, sendo a variância observada (V_{obs}) entre quadrantes e a variância da distribuição binomial (V_{bin}).

Assim, para avaliação e dimensão de quadrante, a análise binomial foi calculada na forma de variância observada (V_{obs}) em que:

$$V_{bin} = p(1 - p)/n$$

onde:

V_{bin} = variância binomial;

n = número de plantas no quadrante,

p = incidência de plantas doentes e

$$V_{obs} = \sum((x_i - np)^2 / n^2(N-1))$$

onde:

V_{obs} = variância observada;

n = número de plantas no quadrante;

p = incidência de plantas doentes;

x_i = número de plantas doentes no quadrante; e

N = número total de quadrante.

Os resultados obtidos no cálculo da V_{obs} e V_{bin} foram utilizados para o cálculo do Índice de Dispersão (ID):

$$ID = V_{obs}/V_{bin}$$

em que:

ID = índice de dispersão;

V_{obs} = variância observada; e

V_{bin} = variância binomial.

Assim, foi possível demonstrar em cada mapa a distribuição espacial das plantas doentes, onde:

Se ID = 1 ao acaso, se ID > 1 agregado.

Para a confirmação estatística da distribuição das plantas doentes, por meio do ID, foi aplicado o teste do Qui-quadrado (X^2) para verificar se o valor calculado foi maior ou igual a 1, em nível de significância de 5%. Deste modo, valores de ID significativamente < 1 indicou que as plantas de eucalipto sintomáticas estão distribuídas de forma regular na área. Valores de ID significativamente > 1 indicou que as plantas de eucalipto sintomáticas estão agregadas (MADDEN; HUGHES, 1995).

A lei de Taylor modificada foi aplicada em todos os mapas com quadrantes 10x3 gerados a partir da análise de dispersão. Assim, calculou-se a variância observada (V_{obs}) e a variância binomial esperada (V_{bin}) para avaliações do progresso da murcha bacteriana do eucalipto em cada quadrante demarcado a partir das parcelas de campo (HUGHES; MADDEN, 1992; HUGHES et al., 1996). Esta Lei relaciona por meio de polinômio do primeiro grau, a variância observada e a variância esperada para uma distribuição aleatória:

$$\log(V_{obs}) = \log(a) + b \log(V_{bin}),$$

em que: A e b são parâmetros.

Considerou-se como variável independente o $\log(V_{bin})$ estimadas para cada avaliação e como variável dependente, o $\log(V_{obs})$. Da mesma forma, aplicou-se a análise de regressão para todas as parcelas e respectivas avaliações.

A equação de regressão foi avaliada para cada conjunto de dados e para cada quadrante, por meio do Teste t (MADDEN et al., 1995). Dessa maneira, foram testadas a hipóteses de $b = 1$ ($\mathbf{b} = \log V_{bin}$) e a hipótese alternativa de \mathbf{b} diferente de 1. Valores de \mathbf{b} significativamente diferente de 1 a nível de 5% de probabilidade, foram considerados indicativos de agregação e valores estatisticamente iguais a 1 foram considerados indicativos de aleatoriedade.

As regressões foram realizadas por meio do método do quadrado mínimo, utilizando-se o software livre RStudio.

4.2.2.2 Análise de dinâmica e estrutura de focos (ADEF)

Usando a metodologia empregada por Nelson (1996) e Laranjeira et al. (1998), nas quatro parcelas de campo, considerou-se somente as plantas com sintomas da murcha bacteriana imediatamente adjacentes no padrão de proximidade vertical,

horizontal ou diagonal pertencentes ao mesmo foco. Os focos unitários são aqueles compostos por apenas uma planta afetada. Em todas as avaliações determinou-se o número de focos (NF), o número de focos unitário (FU), o número de plantas em cada foco i (NPF i), o número máximo de linhas (lfi) e colunas (lci) ocupadas por cada foco (i).

A partir dessas variáveis, calculou-se também, conforme Nelson (1996) e Laranjeira et al. (1998) o número médio de plantas por foco (NMPF), a porcentagem de focos unitários (%UF), o índice de compactação do foco (ICF), em que:

$$ICF = [\sum NPF / lci * lfi] / NF,$$

e o índice de forma de foco (IFF), em que:

$$IFF = [\sum (lfi / lci)] / NF.$$

Valores de ICF próximos a 1,0 indicam focos mais compactos, isto é, com maior agregação e proximidade entre todas as plantas pertencentes ao foco. Valores de IFF iguais a 1,0 indicam focos isodiamétricos, valores de IFF maiores que 1,0 indicam focos com maior comprimento na direção entre as linhas de plantio e valores de IFF menores que 1,0 indicam focos com maior comprimento na direção da linha de plantio. A fim de reduzir a influência dos focos unitários nos cálculos desses últimos dois índices, calculou-se também o índice de compactação de focos não unitário (ICFUN) e o índice de forma de foco não unitário (IFFNU) (NELSON, 1996; JESUS JUNIOR; BASSANEZI, 2004). Todas essas variáveis foram relacionadas com a incidência das plantas com sintomas da murcha bacteriana do eucalipto.

Para verificar a correlação entre incidência da doença e NMPF, NFU, IFF, ICF, IFFNU e ICFUN foi realizado análise de correlação de Pearson.

4.2.2.3. Análise temporal da murcha bacteriana do eucalipto

Para análise temporal foi utilizado os dados da incidência da doença quantificada ao longo do tempo. A incidência da doença foi determinada por meio de 13 avaliações mensais, realizadas 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360 dias após a instalação do experimento.

Com os dados mensais de incidência, plotou-se a curva de progresso da doença para o valor médio das quatro parcelas estudadas. Além disso, foram utilizados os modelos empíricos Logístico, Monomolecular e Gompertz, sendo os dados analisados

por análise de regressão linear simples, ajustados para três modelos (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

$$\text{Logito: } y = \ln(y/(1-y))$$

$$\text{Monito: } y = \ln(1/(1-y))$$

$$\text{Gompito: } y = -\ln(-\ln(y))$$

em que:

y = Proporção de doença;

A determinação do R^2 e dos coeficientes (Interseção e Variável X1) do logito, monito e gompito foi realizada por meio da regressão entre os valores reais de logito, monito e gompito, e período das avaliações de cada parcela/repetições. Estes foram ajustados de acordo com dados reais e previstos, com obtenção dos coeficientes de determinação (R^2), e coeficiente de determinação ajustado da análise de regressão (R^{2*}). Para o cálculo de R^{2*} foi necessário calcular os dados previstos para logito, monito e gompito. Assim, calculou-se a variável y_o , sendo:

$$\text{Logito: } y_o = (\exp(y))/(1 + \exp(y))$$

$$\text{Monito: } y_o = (\exp(y) - 1)/(\exp(y))$$

$$\text{Gompito: } y_o = (-\exp(-y))$$

Posteriormente à determinação de y_o para cada condição, calculou-se cada modelo previsto:

$$\text{Logito: } Y = 1/(1 + ((1/y_o) - 1) * \exp(-r*t))$$

em que:

y_o = y_o calculado para Logito;

r = Variável X1 obtida para Logito; e

t = Período da avaliação.

$$\text{Monito: } Y = 1 - (1 - y_o) * \exp(-r*t)$$

em que:

y_o = y_o calculado para Monito;

r = Variável X1 obtida para Monito; e

t = Período da avaliação.

$$\text{Gompito: } Y = \exp(-(-\ln(y_o)) * \exp(-r*t))$$

em que:

$y_0 = y_0$ calculado para Gompito;

$r =$ Variável X1 obtida para Gompito; e

$t =$ Período da avaliação.

Para escolha do melhor ajuste do modelo levou-se em consideração o coeficiente de determinação (R^2), o valor do quadrado médio dos desvios e o gráfico dos resíduos e o coeficiente de correlação entre coeficiente de correlação entre valores observados e preditos (CORNELL; BERGER, 1987).

Utilizando o modelo selecionado, a taxa de progresso da doença (r) foi estimada, sendo determinada pelo parâmetro b da equação de regressão e incidência (Y_0). As análises de regressão foram realizadas usando o software R. O progresso da doença foi estimado anualmente por um período de sete anos, que corresponde ao ciclo de corte do eucalipto para uso comercial. Esta estimativa foi realizado com os valores médios de cada parcela experimental.

4.3.RESULTADOS

4.3.1 Índice de Dispersão (ID)

Os quadrantes de dimensão 5x2 e 2x3 não apresentaram um padrão que biologicamente fizesse sentido quanto à dispersão ao acaso ou agregada, ou seja, a dispersão do patógeno apresentava dispersão ora agregada e ora ao acaso, não apresentou um padrão de dispersão que pudesse levar a alguma conclusão sobre o padrão de dispersão do patógeno em campo. Dessa maneira, somente o quadrante de 10x3 que corresponde a 30 plantas foi selecionado (Tabela 1).

Em relação às parcelas avaliadas somente P2 apresentou ID superior a 1 ao nível de 5% de significância, conforme o teste estatístico Qui-quadrado, ou seja, dispersão agregada (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de incidência da murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia* spp.) para o clone UFGCA385, valores do índice de dispersão (ID) e valores do teste X² observado dos dados provenientes das quatro parcelas experimentais, em quadrantes de 10x3 plantas. Itinga-MA.

Avaliações	Parcela 1			Parcela 2			Parcela 3			Parcela 4		
	Incidência %	ID	X ² observado	Incidência %	ID	X ² observado*	Incidência %	ID	X ² observado	Incidência %	ID	X ² observado
abr/16	2,22	1,46	20,45	4,67	2,87	40,16	0,89	1,33	18,67	2,67	1,50	21,06
mai/16	3,11	1,50	20,94	6,89	3,30	46,22	2,44	1,09	15,28	3,56	1,45	20,35
jun/16	4,67	0,94	13,19	8,00	3,55	49,64	3,78	1,29	18,10	4,44	1,64	23,02
jul/16	4,67	0,91	12,71	8,00	3,55	49,64	3,78	1,29	18,10	4,44	1,64	23,02
ago/16	4,89	0,91	12,71	8,00	3,55	49,64	3,78	1,29	18,10	4,44	1,64	23,02
set/16	4,89	0,91	12,71	8,00	3,55	49,64	4,22	1,23	17,25	4,44	1,64	23,02
out/16	5,11	1,07	14,94	8,00	3,55	49,64	4,67	1,05	14,69	4,67	1,48	20,68
nov/16	5,11	1,07	14,94	8,00	3,55	49,64	4,67	1,05	14,69	4,67	1,48	20,68
dez/16	5,11	1,07	14,94	8,00	3,46	48,47	5,33	1,40	19,54	5,33	1,21	16,90
jan/17	5,33	0,92	12,94	8,44	3,26	45,59	5,56	1,42	19,91	5,56	1,42	19,91
fev/17	5,33	0,92	12,94	8,44	3,26	45,59	5,56	1,42	19,91	5,56	1,42	19,91
mar/17	5,56	1,06	14,82	8,44	3,26	45,59	5,56	1,42	19,91	5,56	1,42	19,91
abr/17	5,56	1,06	14,82	8,89	3,27	45,82	5,56	1,42	19,91	5,78	1,35	18,94

Valores de X² observado comparados com valores de X² tabelado (23,401), pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância. * Valores do X² observado significativos para agregação da murcha bacteriana do eucalipto.

Fonte: a autora

4.3.2 Aplicação da lei de Taylor modificada (LTM)

O padrão de distribuição da doença foi agregado. Os valores do coeficiente angular b foi maior que 1 a intersecção A foi maior que 0 e com um coeficiente de determinação de 0,72 (Figura 4).

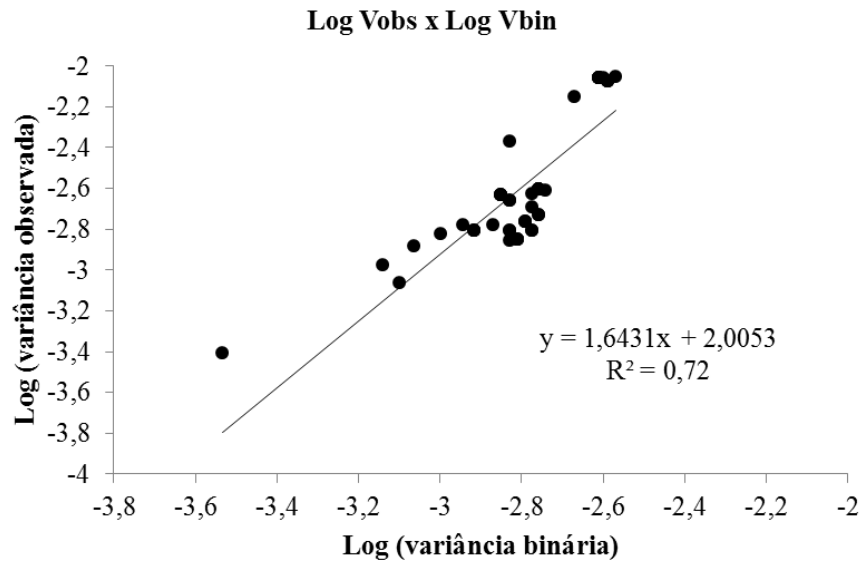


Figura 4: Gráfico da regressão linear entre os valores de Log variância observada (V_{obs}) e variância binária (V_{bin}).

Fonte: a autora

Ao aplicar o teste t o coeficiente angular b e para intersecção A os valores foram respectivamente, 4,4371 e 4,9369, ambos superiores ao valor de t tabelado (2,0086), atestando o padrão de agregação.

4.3.3 Análise da dinâmica e estrutura de focos (ADEF)

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos na análise da ADEF nas quatro parcelas (repetições) experimentais.

Tabela 2: Número de plantas doentes (NPD), incidência, número total de focos (NTF), número de focos unitários (NFU), número médio de plantas por foco (NMPF), índice de forma de foco (IFF), índice de compactação de foco (ICF), índice de forma de foco não unitário (IFFNU) e índice de compactação de focos não unitários (ICFNU) de plantas com sintomas de murcha bacteriana (*Ralstonia* spp) em quatro parcelas (repetições) do clone de eucalipto FGCA0385, espécie *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla*. Itinga-MA.

	NPD	Incidência%	NTF	NFU	NMPF	IFF	ICF	IFFNU	ICFNU
Parcela 1	25	4,7	13	7	1,89	1,25	0,42	4,29	0,83
Parcela 2	40	7,6	18	8	2,04	1,1	0,51	3,41	0,91
Parcela 3	25	4,2	18	14	1,28	0,54	0,18	3,03	0,91
Parcela 4	26	4,6	20	15	1,3	0,45	0,24	2,69	0,94
Total	116	5,28*	69	44	1,63*	0,83*	0,38*	3,35*	0,90*

Valores das quatro parcelas (repetições) estudadas. Valores com (*) representam médias.

Fonte: a autora

De 1.800 plantas avaliadas 116 plantas apresentaram sintomas da murcha bacteriana. A incidência média das quatro parcelas foi de 5,28%, com maior incidência da doença constatada na P2 (7,6%) (Tabela 2). Foram identificados 69 focos, dos quais 44 eram unitários, ou seja, compostos por uma única planta e 25 não unitários, focos compostos por duas ou mais plantas. Também se observou NMPF de 1,63 (Tabela 2).

Ao plotar as médias de NMPF de todas as parcelas e avaliações ao longo do tempo em um gráfico, observou-se que o NMPF foi influenciado pela incidência da doença (Figura 5A) apresentando correlação positiva entre as variáveis Incidência e NMPF (Tabela 3).

Observou-se número elevado de NFU (63,76%) das plantas com sintomas de murcha bacteriana. Todavia, verificou-se grande oscilação no número de focos unitários ao longo das avaliações, independente da incidência da doença (Figura 5B). As variáveis Incidência e NFU tiveram uma correlação negativa moderada (Tabela 3).

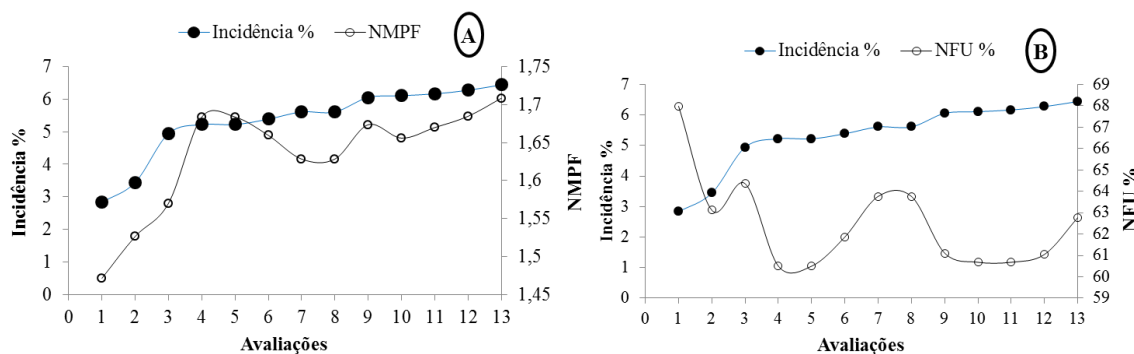


Figura 5: Incidência da murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia* spp) no clone FGCA0385, espécie *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla*) em função do número

médio de plantas por foco (NMPF) (A) e porcentagem de número de focos unitários (NFU%) (B). Itinga-MA.

Fonte: a autora

Tabela 3: Tabela de correlação de Pearson, incidência da murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia* spp) no clone de eucalipto FGCA0385, espécie *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla*. Itinga-MA.

Fator	r	Classificação
NMPF	0,90615	Correlação muito forte
NFU	-0,69236	Correlação moderada negativa
IFF	-0,60812	Correlação moderada negativa
IFNU	0,863535	Correlação forte
ICF	0,000986	Não possui correlação
ICFNU	-0,55021	Correlação moderada negativa

Fonte: a autora

4.3.3.2 Formato e compacidade dos focos

Após plotar as médias das parcelas ao longo das avaliações, observou-se que o IFF foi inversamente proporcional a incidência da doença (Figura 6A), as duas variáveis possuem correlação moderada negativa (Tabela 3). Assim, verificou-se que o IFF aumentou de 0,85 a 0,95 até a terceira avaliação, no entanto, oscilou com tendência de redução a partir da quarta (0,88) até a décima (0,80), estabilizando-se até a última avaliação. O valor médio obtido para IFF (0,83) (Tabela 2) caracteriza que os focos possuem maior comprimento na direção da linha de plantio, segundo a classificação de Nelson (1996).

Ao verificar a interferência do NFU no IFF constatou-se aumento do IFF proporcionada pela retirada do NFU. Essa influência do NFU no IFF é confirmada por meio da obtenção do IFFNU, (Figura 6C). Ao correlacionar as médias de IFFNU das parcelas ao longo das avaliações em relação à incidência da doença, constatou-se uma relação positiva forte (Tabela 3).

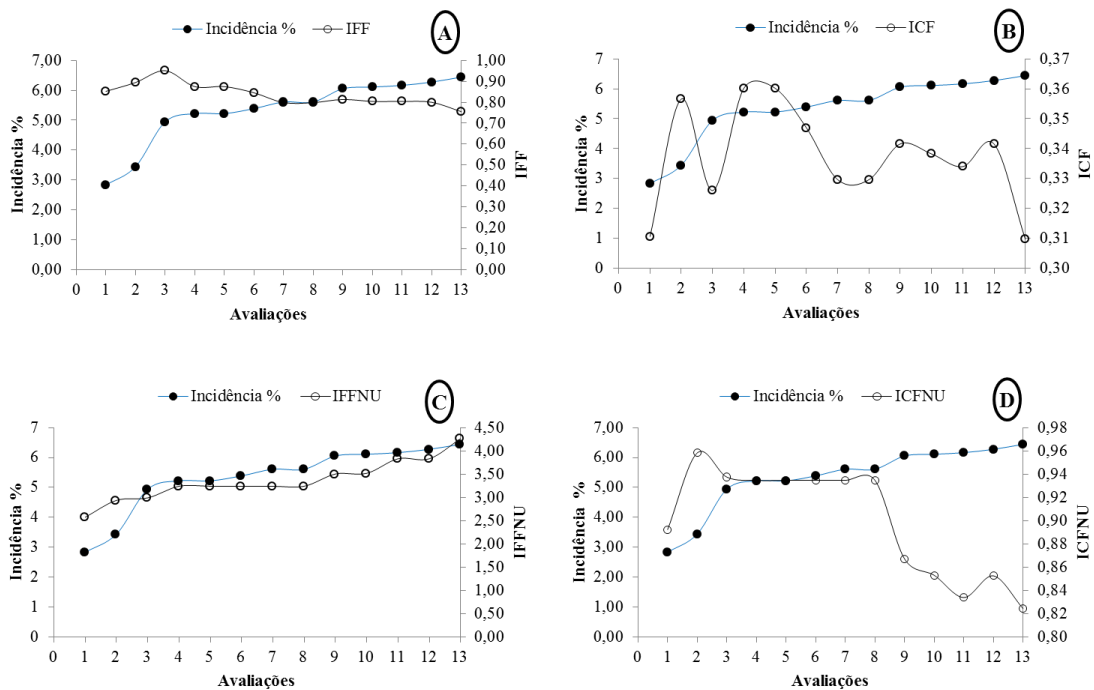


Figura 6: Incidência da murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia* spp) no clone FGCA0385, espécie *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla*) em função do índice médio de forma de focos (IFF) (A), índice médio de compactação de focos (ICF) (B), índice médio de forma de focos não unitários (IFFNU) (C) e índice médio de compactação de focos não unitários (ICFNU) (D). Itinga-MA.

Fonte: a autora

Referente à compacidade dos focos, independente da incidência da doença, o valor do índice de compactação dos focos (ICF), em nenhuma parcela se aproximou de 1, sendo o maior valor (0,51) obtido na parcela 2. O valor do índice aproximou de 1 somente quando se determinou o ICFNU (Tabela 2). Além disso, ao se observar as médias das parcelas em função das avaliações constatou-se que o ICF variou ao longo das avaliações (Figura 6B) e não possui correlação com a incidência da doença (Tabela 3).

Com a retirada dos Focos unitários o valor médio ICFNU se aproximou de 1 (Figura 6D). Ao correlacionar a incidência da doença com o ICFNU, esses tiveram uma correlação negativa moderada (Tabela 3).

4.3.4 Análise temporal da murcha bacteriana do eucalipto

A incidência inicial da doença nas quatro parcelas foi de 2,6% no mês de abril de 2016 e alcançou incidência média (5,4%) entre setembro e outubro atingindo incidência máxima (6,4%) em abril de 2017 (Figura 7).

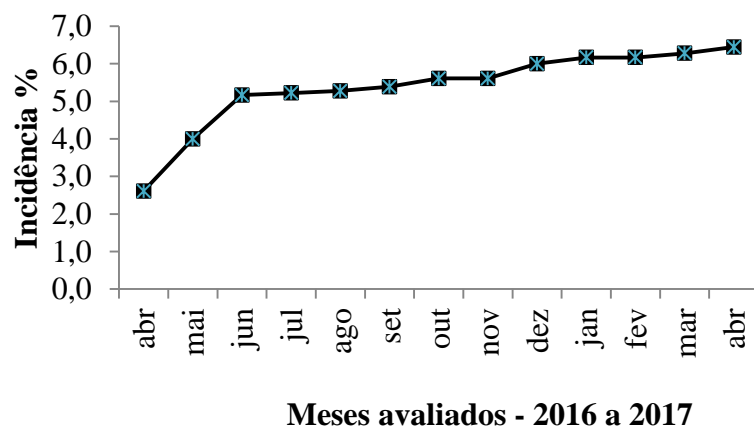


Figura 7: Incidência (%) da murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia* spp) do clone FGCA0385, espécie *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* ao longo do tempo avaliado. Média das quatro parcelas/repetições. Itinga-MA.

Fonte: a autora

A velocidade do progresso da doença foi maior entre os meses de abril e junho diminuindo em julho de 2016. Em 2017 a velocidade de progresso da doença foi maior no mês de março e abril (Figura 8).

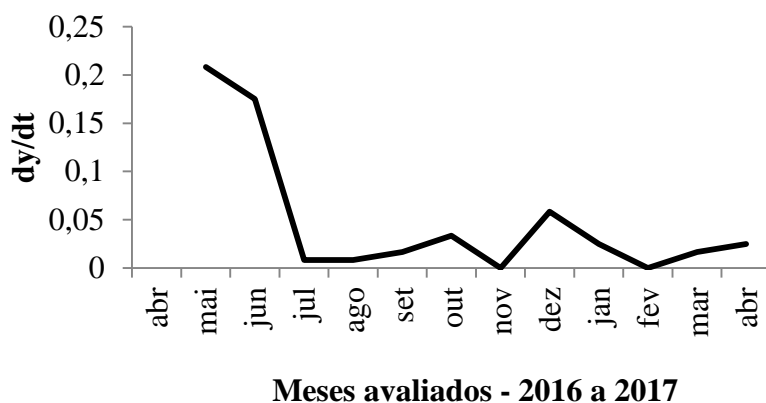


Figura 8: Curva dy/dt da murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia* spp) do clone FGCA0385, espécie *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* ao longo do tempo avaliado. Média das quatro repetições. Itinga-MA.

Fonte: a autora

Dentre os modelos testados o Monomolecular proporcionou melhor ajuste aos dados do patossistema estudado. Para o modelo monomolecular os valores de R^{2*} , foram superiores e menores os valores do quadrado médio dos resíduos, maior valor de coeficiente de correlação entre os valores observados e preditos de cada modelo (Tabela 4) e menores valores de resíduos (Figura 8). Perante esses resultados, esse modelo foi adequado para representar a epidemia.

Tabela 4: Inóculo inicial (y_0), taxa de progresso (r), coeficiente de determinação entre os valores preditos e os observados (R^2), quadrado médio dos resíduos (QMR) e Coeficiente de correlação entre os valores observados e preditos dos modelos Monomolecular, Logístico e Gompertz ajustados aos dados do progresso temporal da incidência da murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia* spp) do clone FGCA0385, espécie *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* . Itinga MA.

Parcela	Modelo	Inóculo Inicial (y_0)	Taxa de progresso (r)	R^2	QMR	Coef. Correlação
01	Monomolecular	0.0350	0.0000705	0.65	0.000433	0.81
	Logístico	0.0340	0.0017785	0.57	0.389126	0.77
	Gompertz	0.0340	0.0005269	0.59	0.031223	0.78
02	Monomolecular	0.0660	0.0000753	0.60	0.000611	0.77
	Logístico	0.0650	0.0010854	0.53	0.172281	0.76
	Gompertz	0.0650	0.0003778	0.55	0.019084	0.76
03	Monomolecular	0.0230	0.0001130	0.83	0.000423	0.91
	Logístico	0.0210	0.0035181	0.62	1.220755	0.85
	Gompertz	0.0220	0.0009758	0.68	0.072174	0.87
04	Monomolecular	0.0340	0.0000707	0.85	0.000141	0.92
	Logístico	0.0350	0.0016385	0.78	0.127334	0.91
	Gompertz	0.0350	0.0004975	0.80	0.010206	0.91

Fonte: a autora

A inóculo inicial (y_0) foi maior para a parcela 02, porém a parcela 03 teve maior taxa de progresso da doença (Tabela 4).

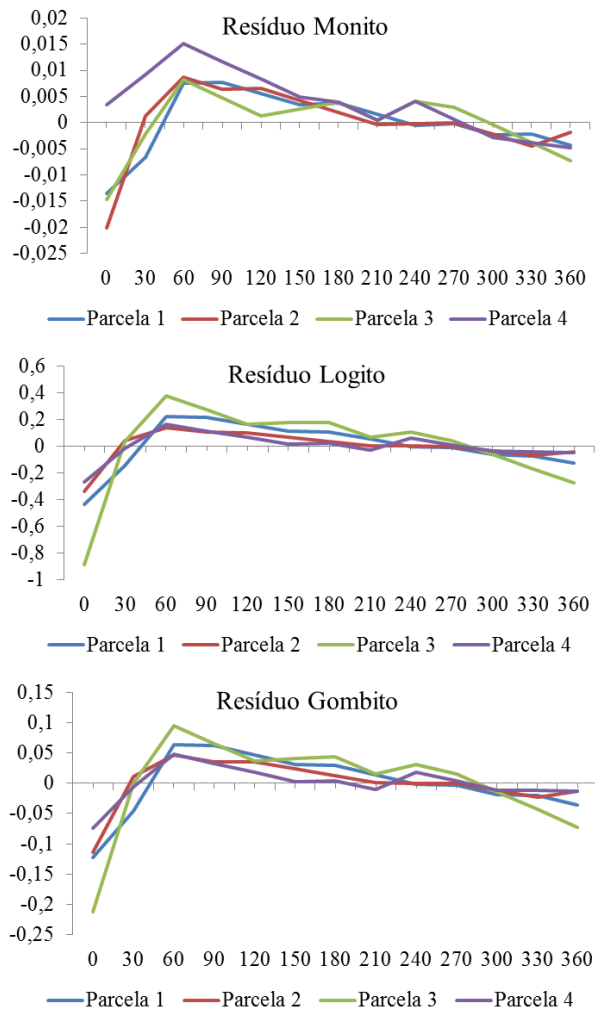


Figura 9: Gráficos dos resíduos transformados (Monito, Logito e Gombito) em função do tempo dos modelos Monomolecular, Logístico e Gompertz da murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia* spp) do clone FGCA0385, espécie *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* e previstos pelos.

Fonte: a autora

A partir do modelo monomolecular foi realizado as previsões futuras por um período de sete anos, avaliando o progresso da doença anualmente (Figura 10).

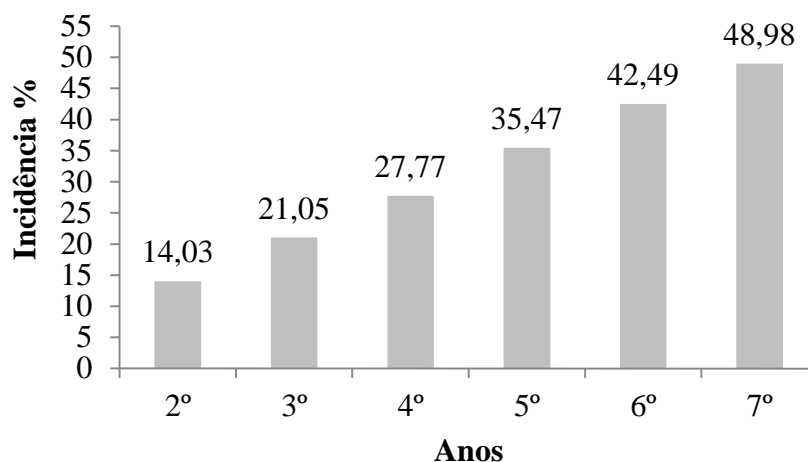


Figura 10: Estimativa da incidência da murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia* spp) para o clone FGCA0385, espécie *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* utilizando-se o modelo Monomolecular do 2º ao 7º ano.

Fonte: a autora

4.5. DISCUSSÃO

4.5.1. Análise espacial

A murcha bacteriana do eucalipto apresentou diferenças no padrão de agregação ao aplicar o ID e a LTM. Porém, vale ressaltar que a análise do ID foi realizada por parcela (repetições) e a LTM foram utilizados o conjunto de dados total da área experimental, o que explica a diferença no padrão de agregação entre as duas metodologias empregadas para analisar a dinâmica espacial da doença. Laranjeira et al., (2004), estudando a clorose variegada dos citros também encontrou padrão de agregação na LTM, porém, ao aplicar o ID o autor encontrou variação no padrão de agregação das plantas doentes dependendo do tamanho do quadrante avaliado. Nesse estudo, também ocorreu variação no padrão de agregação na análise do ID.

O parâmetro b , obtido pela aplicação da LTM é considerado um índice de agregação conforme Taylor (1961) e Madjden e Hughes (1995). Valores de b estatisticamente superiores a 1 indicam agregação, enquanto valores não diferentes de 1 apontam aleatoriedade. Os valores de b obtidos para regressão conjunta das parcelas caracterizaram agregação, o que demonstra que as plantas afetadas por *Ralstonia* spp. tendem a se localizar próximas. Os valores de A , sempre maiores que zero, reforçam essa conclusão (MADDEN; HUGHES, 1995). No entanto, o valor do parâmetro b , não

pode ser considerado alto (1,6431), indicando que a agregação, embora exista, foi baixa (MADDEN; HUGHES, 1995).

Esta interação de aumento de intensidade e mudança no comportamento espacial da doença também foi identificado na análise de dinâmica e estrutura de focos (ADEF). Houve oscilação no NFU, porém foi possível observar que na P2 ocorreu redução no NFU com aumento da incidência da murcha bacteriana. Jesus Junior e Bassanezi (2004) estudando a epidemiologia da morte súbita dos citros também constataram que à medida que aumentou a incidência da doença, reduziu o NFU.

Maiores valores de NFU ao longo da epidemia caracteriza que a doença ocorra de plantas isoladas. Porém, mesmo com aumento da incidência da murcha bacteriana do eucalipto novos focos unitários foram surgindo, o que leva a possibilidade da principal via de contaminação de novas plantas não ter ocorrido somente planta-a-planta. Ferreira et al., (2009), estudando a mancha manteigosa (*Colletotrichum gloeosporioides*) em campo também relato elevado NFU (52%) dos focos, levando os autores a concluir que o início da epidemia se dá por plantas isoladas, sendo a principal via de transmissão da doença a semente contaminada.

Mafia et al. (2012) constataram que mudas aptas para o plantio de diferentes clones, mesmo com colonização de 25% da parte aérea por *R. solanacearum* não apresentavam o sintoma de murcha. Esses autores concluíram que não existe correlação entre presença de infecção sistêmica e a manifestação de sintomas externos da doença. Quando mudas assintomáticas são transplantadas para campo o estresse do transplante pode desencadear a expressão dos sintomas da murcha bacteriana do eucalipto (COUTINHO; WINGFIELD, 2017).

O valor reduzido (1,63) do número médio de plantas por foco (NMPF) pode estar relacionado à grande porcentagem de focos unitários e aos poucos números de plantas em cada foco. O maior foco observado foi composto por 10 plantas doentes. Tumura et al (2012) também encontraram número reduzido (2) de árvores de eucalipto por focos ao estudar murcha de *Ceratocystis*.

No estudo da estrutura dos focos da murcha bacteriana do eucalipto foi quantificado o IFF e o ICF. Os valores do IFF, quando analisados em conjunto para as parcelas apresentou IFF menor que 1, indicando que a murcha bacteriana ocorreu em distribuição vertical, havendo crescimento maior do número de plantas doentes nas

linhas ocupadas pelo foco, corroborando com o estudo de Tumura et al. (2012) ao estudar a murcha de *Ceratocystis*.

Quando avaliado a interferência do NFU no IFF por meio do cálculo do índice médio de forma de focos não unitários (IFFNU), constatou-se que com a retirada dos focos unitários da análise houve mudança na direção de crescimento do foco, o crescimento maior do número de plantas doentes deixa de ser nas linhas ocupadas pelo foco e passa a ser entre as linhas ocupadas pelo foco, porém como se trata de informações reais de campo, os focos unitários devem ser levados em consideração para qualquer tomada de decisão quanto ao manejo da doença.

No que se refere a compactidade dos focos independente da contabilização (ICF) ou não (ICNFU) dos focos unitário o índice não atingiu valor 1, caracterizando os focos como não compactados, sugerindo que a doença se dissemina de forma não homogênea ao redor de uma primeira planta afetada.

A murcha bacteriana do eucalipto ocorreu por meio de plantas isoladas (focos unitários) e tal característica se deve ao fato de que, nesse patossistema, além da principal via de transmissão ser solo/planta/planta/solo a contaminação também pode ter ocorrer em viveiro. Observações anteriores de murcha bacteriana em eucaliptos indicam a existência de potenciais fontes de inóculo primário na formação e manejo de minijardins clonais (MAFIA et al., 2012).

Outra questão que deve ser levada em consideração nesse estudo é o histórico da área de plantio, sendo que a área foi utilizada anteriormente somente com pastagem do gênero *Brachiaria* sp. Logo, diminuindo a possibilidade de haver inóculo no local de plantio.

Coutinho e Wingfield (2017) sugeriram que *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* não são patógenos primários de *Eucalyptus* spp. De acordo com esses autores a doença do eucalipto e a morte associada a essas bactérias estão intimamente ligadas a condições estressantes decorrentes de fatores bióticos e abióticos. Contudo, o fator de maior estresse nesse estudo foi justamente o transplante da muda do viveiro para o campo.

4.5.2. Análise temporal da murcha bacteriana do eucalipto

Os valores de incidência da murcha bacteriana do eucalipto encontrados nesse estudo podem ser considerados baixo quando comparados com os valores obtidos por Ferreira et al. (2018) que registraram incidência da murcha bacteriana de 24 e 23% em duas parcelas avaliadas, nos clones de eucalipto C15 e C16 na Bahia, em um povoamento de 12 meses, e incidência média entre 60,6 e 72,4% com cinco períodos de avaliações para o clone C9 em Minas Gerais, em um povoamento de 6 meses.

Na China os valores de incidência de murcha bacteriana de *Eucalyptus* spp encontrados nas províncias de Guangdong e Hainan variaram de 20% a 40% e em Fujian 90% (ZHI-HUAL et al., 2007), incidências superiores às observadas neste estudo.

A velocidade de progresso da doença foi maior nos primeiros meses de impatuação do experimento, entre abril e junho de 2016. Nos demais meses a velocidade de progresso da doença foi menor com oscilações ao longo do período avaliado. A murcha bacteriana apresenta desenvolvimento lento em eucalipto, cuja colonização do patógeno e expressão dos sintomas depende das condições de ambiente e da predisposição ou debilitação fisiológica do hospedeiro (MAFIA et al., 2012).

Além disso, vale ressaltar que a intensidade da doença pode resultar de diferenças na suscetibilidade de espécies e clones de *Eucalyptus*, mas também pode estar relacionada aos altos níveis de variabilidade genética conhecidos em *Ralstonia* spp. e suas respectivas patogenidades (REMENANT et al., 2011; FONSECA et al., 2016; CARSTEN et al., 2017; FREITAS et al., 2020).

Uma das formas de prever a intensidade da doença a partir de um dado período analisado é utilizando modelos matemáticos (JESUS JUNIOR et al., 2004). Neste estudo o modelo selecionado para realizar as previsões futuras foi o Monomolecular. O ajuste de modelos pode variar de acordo com a patologia, doenças causadas por patógenos transmitidos pelo solo podem se ajustar melhor a modelos monomoleculares (CAMPBELL; MADDEN, 1990) corroborando com o ajuste realizado neste trabalho. Fernandes (2012) ao estudar a murcha de *Ceratocystis* (*Ceratocystis fimbriata*) também obteve melhor ajuste para o modelo Monomolecular.

Conhecer o valor do inóculo inicial (y_0) e a taxa de progresso da doença, nos permite realizar estratégias de manejo que visem a redução do inóculo no campo pela remoção plantas infectadas, bem como a redução da taxa de progresso da doença.

Observando o progresso estimado da doença é possível tomar medidas de intervenção junto ao plantio florestal mesmo antes que a plantação complete seu ciclo de corte, uma vez que árvores contaminadas com *R. solanacearum* podem sofrer redução na quantidade produzida de madeira e/ou celulose conforme Ferreira et al. (2018). Esses autores constataram diferenças significativas ($p < 0,05$) no crescimento volumétrico entre plantas sadias e doentes, para idades de 18 e 30 meses, notando-se que a volumetria diminuiu em 78,6% e 81,7%, respectivamente com diminuição de até 6,4% no rendimento de celulose e aumento 17,4% do número kappa.

Os danos e perdas ocasionados pela murcha bacterina do eucalipto ocorrem tanto em campo como em jardins clonais. Quando avaliado em jardim clonal, o índice de produtividade (IP), definido pelo produto entre o enraizamento médio e o número de miniestacas produzido por minicepa, foi menor nos clones infectados pelo patógeno no minijardim clonal. Em três clones dos sete analisados houve redução de até quatro vezes do IP (MAFIA et al., 2012).

Observando tais danos e perdas passa a ser primordial conhecer a velocidade de propagação da epidemia da murcha bacteriana e as perdas que a doença pode causar, pois terá implicações na tomada de decisão a respeito de manter ou não o povoamento florestal.

4.6 CONCLUSÕES

O padrão de distribuição espacial da murcha bacteriana do eucalipto ocorreu inicialmente ao acaso em três parcelas estudadas, porém com o aumento da incidência da doença houve alteração para o padrão de agregação fraco.

Os focos da doença foram de maior comprimento na direção da linha de plantio e são caracterizados pela forma não compactada.

O modelo Monomolecular foi o que melhor se ajustou aos dados, sendo estimada incidência de 48,98% no sétimo ano de estudo

4.7 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**, v. 31, n. 4, p. 357-366, 2006.
- AYIN, C. M.; ALVAREZ, A. M.; AWANA, C.; SCHLEINZER, F. M.; MARX, B. D.; SCHLUB, R. L. *Ralstonia solanacearum*, *Ganoderma australe*, and bacterial wetwood as predictors of ironwood tree (*Casuarina equisetifolia*) decline in Guam. **Australasian Plant Pathology**, v. 48, n. 6, p. 625-636, 2019.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. John Wiley e Sons. 1990.
- CAO, J. D. Investigation of bacterial wilt in *Eucalyptus saligna* and *E. grandis* introduced from Brazil. **Guangxi Forestry Science and Technology**, v. 4, p. 30-31, 1982.
- CARSTENSEN, G. D.; VENTER, S. N.; WINGFIELD, M. J.; COUTINHO, T. A. Two *Ralstonia* species associated with bacterial wilt of Eucalyptus. **Plant Pathology**, v. 66, n. 3, p. 393-403, 2017.
- CHOUHARY, D. K.; NABI, S. U.; DAR, M. S.; KHAN, K. A. *Ralstonia solanacearum*: A wide spread and global bacterial plant wilt pathogen. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 2, p. 85-90, 2018.
- CORNELL, J. A.; BERGER, R. D. Factors that influence the value of the coefficient of determination in simple linear and nonlinear regression models. **Phytopathology**, v. 77, n.1, p. 63-70, 1987.
- COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J. *Ralstonia solanacearum* and *R. pseudosolanacearum* on *Eucalyptus*: Opportunists or Primary Pathogens?. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 761, 2017.
- FERNANDES, B. V. **Dinâmica espaço-temporal e quantificação dos danos e perdas da murcha de *Ceratocystis* em eucalipto na produção de carvão vegetal**. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP , Botucatu. 2012.
- FERREIRA, M. A.; MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C. *Ralstonia solanacearum* decreases volumetric growth of trees and yield of kraft cellulose of *Eucalyptus* spp. **Forest Pathology**, v. 48, n. 1, p. e12376, 2018.
- FONSECA, N. R.; OLIVEIRA, L. S.; GUIMARÃES, L. M.; TEIXEIRA, R. U.; LOPES, C. A.; ALFENAS, A. C. An efficient inoculation method of *Ralstonia solanacearum* to test wilt resistance in *Eucalyptus* spp. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 42-47, 2016.

- FREITAS, R. G.; HERMENEGILDO, P. S.; GUIMARÃES, L. M.; ZAUZA, E. A.; BADEL, J. L.; ALFENAS, A. C. Detection and characterization of *Ralstonia pseudosolanacearum* infecting *Eucalyptus* sp. in Brazil. **Forest Pathology**, v. 50, n. 3, p. e12593, 2020.
- GOTTWALD, T. R.; AVINENT, L.; LLACER, A.; MENDOSA, A. H.; CAMBRA, M. Analysis in the spatial spread of sarka (plum pox virus) in apricot and peach orchards in eastern Spain. **Plant Disease**, v. 79, p. 266-278, 1995.
- HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual review of phytopathology**, v. 29, p. 65-87, 1991.
- HAYWARD, A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***, p. 9-24, 1994.
- HE, L. Y.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. **Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China**. 1983.
- HUGHES, G.; MADDEN, L. V. Aggregation and incidence of disease. **Plant Pathology**, v. 41, n. 6, p. 657-660, 1992.
- HUGHES, G.; MADDEN, L. V.; MUNKVOLD, G. P. Cluster sampling for disease incidence data. **Phytopathology**, v. 86, n.2, p.132-137, 1996.
- JESUS JUNIOR, W. C.; BASSANEZI, R. B. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 4, 2004
- LARANJEIRA, F. F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Dinâmica e estrutura de focos da clorose variegada dos citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, v.23, v.1, p. 36-41, 1998.
- LARANJEIRA, F. F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GOTTWALD, T. R. Dinâmica espacial da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. **Fitopatologia brasileira**, v. 29, n. 1, p. 56-65, 2004.
- MADDEN, L. V.; HUGHES, G. Plant disease incidence: distributions, heterogeneity, and temporal analysis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, n.1, p. 529-564, 1995.
- MADDEN, L. V.; NAULT, L. R.; MURRAL, D. J.; APELT, M. R. Spatial pattern analysis of the incidence of aster yellows disease in lettuce. **Researches on Population Ecology**, v. 37, n.2, p. 279-289, 1995.
- 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**, v. 36, n. 4, p. 593-602, 2012.

- MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M., RONALD, P.; TOTH, I. A. N. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 6, p. 614-629, 2012.
- NELSON, S. C. A simple analysis of disease foci. **Phytopathology**, v. 86, n.4, p. 332-339, 1996.
- OLIVEIRA, M. E. S., SILVA F, F.; GLÓRIA JUNIOR, M. A.; SOARES DE O. A. MAFIA, R. G. ALVES, F. M. Temporal Analysis of Bacterial Leaf Blight in Clonal Eucalyptus Plantations in Brazil. **Forests**, v. 10, n. 10, p. 839, 2019.
- PAUDEL, S.; DOBHAL, S.; ALVAREZ, A. M.; ARIF, M. Taxonomy and Phylogenetic Research on *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Complex Pathogen with Extraordinary Economic Consequences. **Pathogens**, v. 9, n. 11, p. 886, 2020.
- PEREIRA, R.; FERREIRA, M. A.; SOARES, T. P.; ANDRADE, M. F.; POZZA, E. A.; AVELAR, M. L.; MELO, L. A. Temporal Progress of Candeia Rust Caused by *Puccinia velata* in Clonal Candeia Plantation (*Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeisch). **Forests**, v. 11, n. 7, p. 720, 2020.
- PRIOR, P.; AILLOUD, F.; DALRING, B. L.; REMENANT, B.; SANCHEZ, B.; ALLEN, C. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, 2016.
- REMENANT, B.; DE CAMBIAIRE, J. C.; CELLIER, G.; JACOBS, J. M.; MANGENOT, S.; BARBE, V.; ALLEN, C. *Ralstonia syzygii*, the blood disease bacterium and some Asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24356, 2011.
- SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; DOS ANJOS, L. H. C.; DE OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; CUNHA, T. J. F. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, DF: Embrapa, 2018.
- SUDO, S.; OLIVEIRA, G. H. N.; PEREIRA, A. C. Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e bracatinga (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith. **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 631, 1983
- SUPRIADI, D.; MULYA, K.; SITEPU, D. Bacterial wilt disease of woody trees caused by *Ralstonia solanacearum*: a review. **Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian**, v. 20, n. 3, p. 106-112, 2001.
- SUN, Z. ZHANG, Y, MA, H. Causes and Prevention Strategies on the Outbreak of *Casuarina equisetifolia* Bacterial Wilt in Western Guangdong Province. **Journal of Temperate Forestry Research**, v. 3, n. 3, p. 6-10, 2020.
- Taylor, L. R. Aggregation, variance and the mean. **Nature**, v. 189, n. 4766, p. 732-735, 1961.

TUMURA, K. G., DE PIERI, C.; FURTADO, E. L. Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 1, p. 54-60, 2012.

ZHI-HUAL, W. U.; YAO-JIAN, X. I. E.; LIAN-FENG, L. U. O.; WEI-YAO, Z. H. A. N. G. Advances in Research on Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* in *Eucalyptus* spp. in China. **Forest Research**, p. 04, 2007.

5. CAPÍTULO 2 - Resistência de clones de eucalipto à murcha bacteriana em campo

RESUMO

Ralstonia solanacearum é uma bactéria cosmopolita causadora de danos em culturas agrícolas e florestais. Esta bactéria infecta o sistema vascular, via raízes, podendo estar associada a diferentes hospedeiros e, pode ser transmitida via mudas infectadas de viveiro, com certa recorrência na eucaliptocultura. O plantio de eucalipto resistentes constitui um dos meios mais eficazes e econômicos de se controlar a murcha bacteriana. Porém, um dos desafios do melhoramento genético é encontrar clones resistentes a *R. solanacearum*. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a resistência de clones de eucalipto à murcha bacteriana do eucalipto. O estudo foi realizado em condições de plantio comercial de eucalipto no município de Dom Eliseu, Pará. O experimento implantado em abril de 2018, utilizou 308 clones de eucalipto compostos por 05 espécies e 22 híbridos. As mudas foram originárias de jardim clonal oriundo dos estados de SP, BA e MA e plantadas em espaçamento de 3x1 m. O delineamento experimental adotado foi do tipo *single tree plot*, com 308 tratamentos (clones) e 30 repetições, totalizando 9.240 parcelas (plantas). A doença foi diagnosticada à campo por meio das sintomatologias e a confirmação realizada via teste sorológico. Para quantificar a doença foi utilizada escala descritiva de notas, sendo: N1 (planta sadia); N2 (sintomas iniciais de murcha dos ponteiros); N3 (murcha e amarelecimento seguidos de desfolha parcial ascendente); N4 (planta morta). Para estimativa de componentes de variância e predição de valores genéticos foi utilizado o procedimento REML/BLUP (estimação de variância e predição de valores genéticos) a partir dos valores das áreas abaixo da curva de progresso (AACPD) da doença calculadas pelo método de integração trapezoidal. As espécies e materiais genéticos foram comparadas com auxílio do programa de Seleção Genética Computadorizada – SELEGEN – REML/BLUP. Dos 308 clones avaliados 25 apresentaram resistência a murcha bacteriana do eucalipto. As 05 espécies e 22 híbridos que compõem os 308 clones foram considerados suscetíveis.

Palavras-chave: Seleção clonal. Clones suscetíveis. *Ralstonia solanacearum*. Severidade. Manejo.

ABSTRACT

Ralstonia solanacearum is a cosmopolitan bacterium causing damage to agricultural and forest crops. This bacterium infects the vascular system, via the roots, and can be associated with different hosts. Planting resistant eucalyptus constitutes one of the most effective and economical means of controlling bacterial wilt. However, one of the challenges of genetic improvement is to find clones resistant to *R. solanacearum*. Given the above, this study aimed to evaluate the resistance of eucalyptus clones to eucalyptus bacterial wilt. The study was carried out under conditions of commercial eucalyptus plantation in the municipality of Dom Eliseu, Pará. The experiment implemented in April 2018, used 308 eucalyptus clones composed of 05 species and 22 hybrids. The seedlings originated from clonal gardens from the states of SP, BA and MA and planted in 3x1 m spacing. The experimental design adopted was the single tree plot type, with 308 treatments (clones) and 30 repetitions, totaling 9,240 plots (plants). The disease was diagnosed in the field by symptomatology and confirmed by serological testing. To quantify the disease a descriptive scale of grades was used, being: N1 (healthy plant); N2 (initial symptoms of tip wilt); N3 (wilting and yellowing followed by ascending partial defoliation); N4 (dead plant). For variance components estimation and genetic value prediction, the REML/BLUP procedure (variance estimation and genetic value prediction) was used from the values of the areas under the disease progress curve (AUDPC) calculated by the trapezoidal integration method. The species and genetic materials were compared with the aid of the Computerized Genetic Selection program - SELEGEN - REML/BLUP. Of the 308 clones evaluated 25 showed resistance to eucalyptus bacterial wilt. The 05 species and 22 hybrids that make up the 308 clones were considered susceptible.

Keywords: Clonal selection. Susceptible clones. *Ralstonia solanacearum*. Severity. Management.

5.1. INTRODUÇÃO

Ralstonia solanacearum é uma bactéria com potencial de causar danos a diversas culturas agrícolas (DENNY, 2006) e florestais (SUPRIADI, MULYA, SIPETU, 2001). É um patógeno cosmopolita, coloniza sistema vascular das plantas (HAYWARD, 1994) com ampla gama de hospedeiros e elevada variabilidade genética (HE, SEQUEIRA, KELMAN, 1983; HAYWARD, 1994; XU et al., 2009). Na eucaliptocultura a disseminação do patógeno pode ocorrer via solo e/ou mudas infectadas (MAFIA et al, 2012).

Essa bactéria é um organismo saprófito facultativo, habitante do solo e infecta novas plantas hospedeiras principalmente via raízes (HAYWARD, 1991). Infecta plantas de eucalipto suscetíveis, geralmente através de feridas radiculares e/ou aberturas naturais. Inicialmente coloniza o córtex da raiz e células do parênquima vascular, depois se espalham para os vasos do xilema, multiplicando-se rapidamente (VASSE; FREY; TRIGALET, 1995).

Em área de plantio se espalham para as partes aéreas do eucalipto, podendo causar o bloqueio mecânico de transporte de água (DELL; XU 2006; XU et al., 2009, COUTINHO et al., 2017). Isso se manifesta em sintomas externos e visíveis, começando com murcha e necrose na região da nervura central das folhas, bronzeamento foliar e desfolha basal ascendente da planta, escurecimento do lenho a partir da região central e exsudação bacteriana viscosa nos tecidos cortados. Os sintomas se espalham rapidamente com todas as folhas murchas e a árvore morrendo de 2 a 3 semanas após o surgimento dos sintomas, quando a infecção ocorre de forma aguda ou após 2 a 6 meses no caso de enfermidade crônica (ALFENAS et al., 2006). A mortalidade das plantas resulta em alta desuniformidade no plantio (ALFENAS et al., 2006; SAPPI, 2012).

A murcha bacteriana do eucalipto foi registrada pela primeira vez na China em 1982 nas espécies de *E. saginata* e *E. grandis* (CHAO, 1982). No Brasil foi registrada pela primeira vez em 1983 em *E. grandis* (SUDO; OLIVEIRA; PEREIRA, 1983). Desde o primeiro relato de murcha bacteriana do eucalipto, tem havido constante busca por genótipos resistentes/tolerantes que possam auxiliar na redução de danos e perdas causadas por essa doença (GAN, et al., 2004; LI, et al., 2007; WANG et al., 2011; MARQUES et al., 2013; FONSECA et al., 2016).

O plantio com clones de eucalipto resistentes é uma das estratégias mais eficazes e econômicas para o manejo da murcha bacteriana (CHOUDHARY et al., 2018). Porém, um dos grandes desafios do melhoramento genético é encontrar clones resistentes a bactéria *R. solanacearum*.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a resistência de clones a murcha bacteriana do eucalipto em campo.

5.2. METODOLOGIA

5.2.1. Caracterização da área experimental e material genético

O estudo foi conduzido em condições de plantio comercial de eucalipto, localizado na Fazenda Saudade de Minas no município de Dom Eliseu-PA, Brasil, coordenadas geográficas Lat.: 47°54'35.54"N e Long.: 4°19'48.38"L (Figura 1).

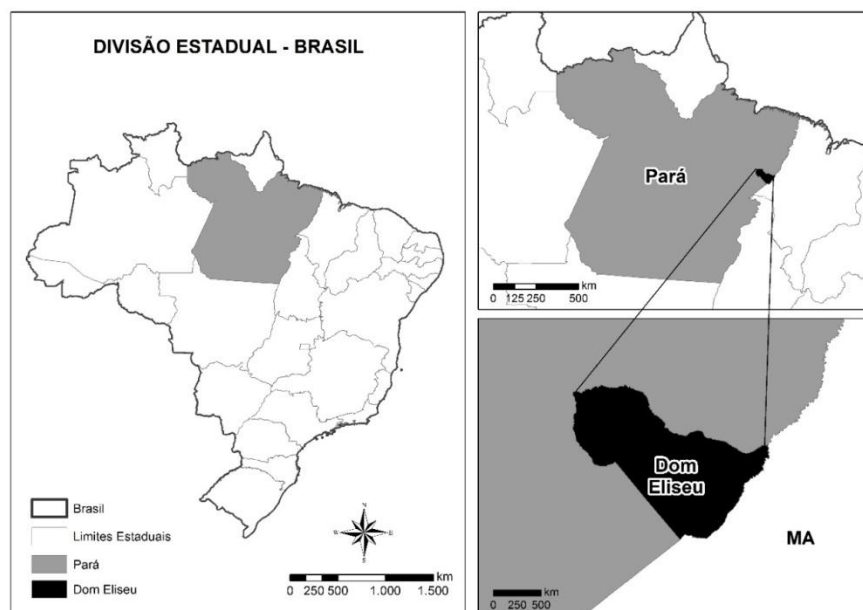


Figura 1: Localização do município de Dom Eliseu-PA.
Fonte: a autora

O solo da área experimental é classificado como Latossolo (amarelo, Tb distrófico, Típico, A moderado com textura muito argilosa (SANTOS et al., 2013). O relevo é plano e situado sobre um platô. O clima da região segundo a classificação de Köppen e Geiger é do tipo climático Aw (clima tropical chuvoso, com expressivo período de estiagem). A temperatura média anual é 26°C, e as médias das máximas e

mínimas, respectivamente, de 33°C e 22°C. A média anual da umidade relativa do ar é de 80%. E o total pluviométrico anual é de aproximadamente 1.740 milímetros (GONÇALVES et al., 2008).

O preparo do solo consistiu em calagem com aplicação de 2.000 kg/ha de calcário dolomítico por meio de subsolagem a 60 cm e gradagem convencional para maximizar a eficiência da técnica adotada. No pré-plantio, realizou-se adubação química de base com 350 kg/ha de NPK (10-27-10), posteriormente, utilizou-se adubação química de cobertura com aplicação de 250 kg/ha de NPK (10-05-20) aos três meses de plantio e 450 kg/ha de NPK (10-05-20) aos seis meses de plantio. Além das práticas edáficas, realizou-se tratos culturais para controle de plantas daninhas e pragas.

O experimento foi implantado em abril de 2018, utilizando-se 308 clones comerciais de eucalipto, compostos por 05 espécies e 22 híbridos, produzidos em jardim clonal nos estados de SP, BA e MA, (Tabela 1) plantados em espaçamento de 3x1 m. O estudo foi conduzido em delineamento experimental do tipo *single tree plot* (cada planta corresponde a uma parcela), com 308 tratamentos (clones) e 30 repetições, totalizando 9.240 parcelas (plantas), com área de 3,84 ha, incluindo a borda de 2,5 x 3,0 m. A área do experimento possui registro de ocorrência de *R. solanacearum* com necessidade de reforma técnica em virtude da alta mortalidade de plantas. A identificação do patógeno *R. solanacearum* (filotipo II) foi realizada por Freitas et al. (2021). A classificação em sequevares foi realizada pelo sequenciamento parcial do gene que codifica para endoglucanase, todos foram do sequevar 41 (FREITAS et al., 2021).

Tabela 1: Espécies, híbridos e número de clones utilizados no experimento. Dom Eliseu, PA.

Nº de Espécie/Híbrido	Espécie/Híbrido	Quantidade de Clones
1	<i>E. grandis</i>	59
2	<i>E. urophylla</i>	58
3	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	86
4	<i>E. grandis</i> x <i>E. pellita</i>	2
5	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp.	19
6	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>	8
7	<i>Eucalyptus</i> sp.	6
8	<i>E. urophylla</i> x <i>Eucalyptus</i> spp.	3
9	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	6
10	<i>Eucalyptus</i> sp.	5
11	<i>E. pellita</i> x <i>E. camaldulensis</i>	1
12	<i>E. urophylla</i> x (<i>E. grandis</i> x <i>E. pellita</i>)	9
13	<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>	7
14	<i>E. urophylla</i> x <i>E. camaldulensis</i>	1
15	<i>E. urophylla</i> x <i>E. pellita</i>	4
16	<i>E. grandis</i> x <i>E. brassiana</i>	3
17	<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	2
18	<i>E. pellita</i> x (<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>)	6
19	<i>E. pellita</i> x <i>Eucalyptus</i> spp.	1
20	<i>E. camaldulensis</i>	1
21	<i>E. urophylla</i> x (<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>)	1
22	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>) x <i>E. tereticornis</i>	7
23	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>) x <i>E. pellita</i>	1
24	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>) x <i>E. pellita</i>	5
25	<i>E. tereticornis</i> x <i>E. grandis</i>	1
26	<i>E. grandis</i> x (<i>E. brassiana</i> x <i>E. pellita</i>)	1
27	<i>E. urophylla</i> x <i>E. brassiana</i>	5
Total		308

Fonte: Suzano

Como controles positivos para suscetibilidade foram utilizados os clones BA1922 e BA2004. Devido ao elevado número de clones e diversidade de procedências, aliados à falta de informações dos progenitores, os clones foram considerados como não aparentados para efeito de análise.

O experimento teve início em abril de 2018 e finalizou em setembro de 2019 quando foi realizado o corte das plantas.

5.2.2. Quantificação da murcha bacteriana do eucalipto

A quantificação da murcha bacteriana do eucalipto foi realizada inicialmente em quinze dias e posteriormente seguida de uma periodicidade de 30 (trinta) dias totalizando 18 (dezoito) avaliações.

A doença foi diagnosticada à campo por meio das sintomatologias e a confirmação obtida via teste sorológico. Ademais, a quantificação da doença foi realizada por meio de escala descritiva (escala de notas), sobre a qual foram avaliados os níveis de severidade da murcha bacteriana do eucalipto, com base na metodologia de Zamprogno et al. (2008), em que:

N1 - planta sadia;

N2 - sintomas iniciais de murcha dos ponteiros;

N3 - murcha e amarelecimento seguidos de desfolha parcial ascendente; e

N4 - planta morta.

As plantas com sintomas aparentes foram classificadas como suscetíveis e, as que não estavam contaminadas (N1) foram consideradas resistentes. Plantas assintomáticas foram submetidas ao teste sorológico para confirmar a sanidade.

Para caracterização do nível de resistência dos genótipos, os dados de intensidade da doença (severidade) ao longo do tempo foram utilizados para calcular a Área Abaixo da Curva de Progresso (AACPD)

A AACPD da doença foi calculada pelo método de integração trapezoidal proposto por (SHANER; FINNEY, 1997) utilizando a severidade da doença.

$$AACPD = \sum_{i=1}^n [(Y_i + Y_{i+1})/2] \times [(t_{i+1} - t_i)]$$

em que:

Y_i = severidade da doença;

$(t_{i+1} - t_i)$ = intervalo entre duas avaliações consecutivas;

n= número total de avaliações; e

Σ = somatório.

De posse da AACPD foram realizadas as estimativas de parâmetros genéticos e estatística.

5.2.3. Estimativas de parâmetros genéticos e estatística

A estimativa de componentes de variância e predição de valores genéticos foi realizada usando o programa de Seleção Genética Computadorizada – SELEGEN, por meio do procedimento de estimação de componentes de variância (REML) e de predição de valores genéticos (BLUP) (RESENDE, 2007).

Na avaliação dos clones de eucalipto, as variáveis foram analisadas usando o modelo linear misto univariado, descrito para o delineamento de blocos ao acaso, para um ambiente, com uma planta por parcela, do software SELEGEN-REM/BLUP, apresentado por Resende (2007), segundo o modelo estatístico:

$$y = Xr = Zg + e,$$

Em que:

y = vetor de dados;

r = vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixo) somados à média geral;

g= vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios);

e = valor de erros ou resíduos (aleatórios).

Z e **X** = representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

Após análise dos dados dos foram obtidos os valores de efeitos genotípicos preditos (**g**), valores genotípicos (**u+g**), ganhos genéticos e a média da população melhorada. Os valores genotípicos (**u+g**) de cada clone é resultado da soma de cada efeito fenotípico (**g**) à média geral do experimento. O ganho genético equivale à média dos efeitos genéticos preditos para os clones selecionados. A nova média é resultado do somatório do ganho genético (**u+g**) dividido pelo número de ganhos genéticos somados.

5.3. RESULTADOS

O plantio de eucalipto apresentou alta incidência da doença (99,73%) dos clones apresentaram sintomas de murcha bacteriana. Os clones resistentes, ou seja, aqueles que não apresentaram incidência da doença apresentaram valor genotípico de 544.6168. Do total de 308 clones, somente 25 se comportaram como resistente à doença (Tabela 2).

Os clones utilizados como controles positivos para suscetibilidade (testemunhas) N°. 103 (BA2004) e N° 104 (BA1922) ocuparam as posições 55 e 213, com valor genotípico igual a 774.7150 e 682.8491, respectivamente. O clone N°. 306 URO22 da espécie *E. urophylla* ocupou a primeira posição no ranqueamento com valor genético (1426.8768), sendo considerado o clone mais suscetível a doença (Apêndice A).

Todas as espécies e híbridos que compoem a genética dos clones de eucalipto foram consideradas suscetíveis a murcha bacteriana do eucalipto, pois apresentou algum sintoma da murcha bacteriana de acordo com a escala de severidade da doença (Apêndice A).

Tabela 2: Clones de eucalipto resistentes à murcha bacteriana do eucalipto. Dom Eliseu, PA.

Nº. do clone	Clone	Espécie/Híbrido	Origem	Efeito Genotípicos (g)	Valor Genotípico (u+g)	Ganho	Nova média
10	URO10	<i>E. urophylla</i>	SP	-127.5018	544.6168	10.7748	682.8933
17	BA2657	<i>E. urophylla</i>	BA	-127.5018	544.6168	10.2896	682.4081
21	BA4052	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>	BA	-127.5018	544.6168	9.8078	681.9263
27	BA9972	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp	BA	-127.5018	544.6168	9.3294	681.4479
40	BA1259	<i>E. grandis</i>	BA	-127.5018	544.6168	8.8543	680.9728
54	BA110873	<i>E. grandis</i>	BA	-127.5018	544.6168	8.3825	680.5010
55	BA3996	<i>E. urophylla</i>	BA	-127.5018	544.6168	7.9139	680.0324
59	BA3482	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	BA	-127.5018	544.6168	7.4486	679.5671
78	SP6218	<i>E. grandis</i>	SP	-127.5018	544.6168	6.9864	679.1049
81	SP6229	<i>Eucalyptus</i> spp	SP	-127.5018	544.6168	6.5274	678.6459
95	BA110207	<i>E. grandis</i>	BA	-127.5018	544.6168	6.0715	678.1900
102	BA9324	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	BA	-127.5018	544.6168	5.6187	677.7372
105	BA1525	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	BA	-127.5018	544.6168	5.1690	677.2875
111	BA1754	<i>E. robusta</i> x <i>E. grandis</i>	BA	-127.5018	544.6168	4.7223	676.8408
112	BA3692	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	BA	-127.5018	544.6168	4.2786	676.3971
113	BA1122	<i>E. grandis</i> x <i>Eucalyptus</i> spp	BA	-127.5018	544.6168	3.8378	675.9564

140	A1620	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	MA	-127.5018	544.6168	3.4000	675.5186
181	MA3074	<i>E. urophylla</i> x <i>E. tereticornis</i>	MA	-127.5018	544.6168	2.9652	675.0837
191	MA3003	<i>E. grandis</i>	MA	-127.5018	544.6168	2.5331	674.6517
195	MA2019	<i>E. grandis</i> x <i>E. brassiana</i>	MA	-127.5018	544.6168	2.1040	674.2225
208	H4212	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	MA	-127.5018	544.6168	1.6777	673.7962
221	FGCA0597	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	MA	-127.5018	544.6168	1.2541	673.3726
231	MA3188	<i>E. urophylla</i>	MA	-127.5018	544.6168	0.8333	672.9519
265	QGS109	<i>Eucalyptus</i> spp	MA	-127.5018	544.6168	0.4153	672.5338
270	SUZ0287 - A1606	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	MA	-127.5018	544.6168	0.0000	672.1185

Fonte: a autora

5.4. DISCUSSÃO

O ranqueamento dos clones foi realizado no SELEGEN, ordenando os clones dos mais para os menos suscetíveis à doença. Essa forma de ordenamento se deve a escala de pontuação utilizada que atribui valores menores aos indivíduos com menor severidade da doença.

Desde o primeiro relato da murcha bacteriana do eucalipto, tem havido busca constante por genótipos resistentes que possam auxiliar na redução de danos e perdas causados por essa doença (DIANESE et al., 1990, MAFIA et al., 2014; FONSECA et al., 2016; SANTOS, 2020). Porém, entre todas as pesquisas sobre resistência do eucalipto a murcha bacteriana do eucalipto realizadas até o momento em escala mundial, esta é a que envolveu o maior número de espécies/híbridos (27) e variedades clonais (308) de forma experimental em campo.

O clone N°. 306 (URO22) da espécie *E. urophylla* foi o mais suscetível à murcha bacteriana, exibindo maior ganho genético à suscetibilidade da doença. Contudo, o clone N°. 10 (URO10) da espécie *E. urophylla*, foi considerado resistente, isso demonstra que a resistência à doença está mais relacionada a variabilidade genética dos clones do que das espécies e híbridos testados. Fonseca et al. (2016) também constataram variabilidade genética em dois clones da mesma espécie (*E. saligna*), sendo que o clone D se comportou como resistente e o clone I como altamente suscetível a murcha bacteriana do eucalipto (*R. solanacearum*).

A constatação da suscetibilidade do *E. urophylla* corrobora com os resultados obtidos em um estudo realizado na China (WU; LIANG, 1988). De acordo com esses autores *E. urophylla* é uma das espécies mais sensíveis ao patógeno *R. solanacearum*, além das espécies de *E. tereticornis*, e *E. camaldulensis* (WU; LIANG, 1988). Ademais, cabe salientar que *E. camaldulensis* ocupou a posição 86 pelo clone N°. 228 (C3330) no presente estudo. Já *E. tereticornis* fez parte da composição genética de alguns híbridos, contudo não foi avaliado individualmente.

Segundo Sappi (2012) as espécies de eucalipto diferem em suscetibilidade à infecção por *R. solanacearum*, mas os mais suscetíveis são: *E. grandis*, *E. saligna* e o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*. A espécie *E. grandis* e o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* também foram listados por Ciesla et al. (1996), como suscetíveis a *R. solanacearum* sob condições naturais.

Entre os 308 clones avaliados neste estudo o clone Nº. 107 (BA3767) híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* e o clone Nº. 1 (SP6678) da espécie *E. grandis* ficaram como o quinto e o sétimo, respectivamente, como mais suscetíveis á infecção por *R. solanacearum*. Já a espécie de *E. saligna* não foi avaliada. Tais comprovações corroboram com os estudos de Sappi (2012) e Ciesta et al. (2006).

Um estudo realizado no Brasil avaliou seis espécies de eucaliptos (*E. camaldulensis*, *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. saligna* e *E. tereticornis*), em um infectário, quanto a resistência genética do eucalipto à murcha bacteriana e classificou como altamente suscetível a espécie de *E. grandis* e *E. tereticornis* como moderadamente resistente e os demais como suscetíveis (MAFIA et al., 2014). Neste sentido, as espécies de *E. camaldulensis* e *E. grandis* foram consideradas como suscetíveis, corroborando com o estudo dos autores citados acima. As outras espécies não foram avaliadas no presente estudo.

No estudo de Fonseca et al. (2016) foi testado 21 clones em relação à resistência à murcha bacteriana por inoculação do patógeno *R. solanacearum* (cepa UFV32) na base do caule e encontraram 4 clones resistentes, sendo três *Eucalyptus* spp. e um *E. saligna*. Os autores também constataram 4 clones como suscetíveis (*Eucalyptus* spp) e os demais clones de *E. saligna*, *Eucalyptus* spp., *E. urophylla* x *E. grandis*, *E. dunnii*, *E. urophylla* x *E. maidenii*, *E. urophylla* x *E. globulus*, *E. urophylla* x *E. dunnii*, como altamente suscetível (FONSECA et al., 2016).

Santos (2020) avaliou a resistência de 4 genótipos de eucalipto *in vitro* ao patógeno *Ralstonia*, e obteve apenas o genótipo 1 (híbrido de *Eucalyptus* spp.) como moderadamente suscetível os genótipos 2, 3 e 4 (híbrido de *E. urophylla*, híbrido de *E. Urophylla*, híbrido de *E. pellita*), respectivamente, foram suscetíveis à bactéria *Ralstonia*.

Observou-se que há uma variação entre espécies e/ou híbridos susceptíveis e resistentes. Provavelmente essa variação se deve aos diferentes tipos e proporção de espécies e/ou híbridos utilizados em cada estudo, e das condições que cada estudo foi realizado, além da variação de virulência das cepas utilizadas. Informações geradas nos estudos de inoculação podem ser restritas ao país de origem da cepa, pois as cepas aplicadas em cada experimento são variáveis (FONSECA et al., 2016).

Ademais, evidências sugerem que a murcha bacteriana do eucalipto e a morte associada tanto *R. solanacearum* quanto *R. pseudosolanacearum* estão intimamente

associadas a condições estressantes decorrentes de fatores bióticos e abióticos (COUTINHO et al., 2017).

A resistência genética é uma das estratégias mais eficazes e econômicas de controlar a murcha bacteriana do eucalipto. Contudo, a resistência é específica da cepa e é pode ser suplantada em determinadas condições: alta temperatura, umidade excessiva do solo e ferimento de raízes (CHOUDHARY et al., 2018). Dessa maneira, torna-se imprescindível a utilização de vários clones resistentes a doença. Com base nos resultados deste estudo verifica-se que há 25 clones resistentes a murcha bacteriana do eucalipto (*Ralstonia solanacearum*) que podem ser utilizados em povoamentos florestais.

5.5. CONCLUSÕES

Todas as espécies e híbridos que compõem a informação genética dos 308 clones de eucalipto estudados foram considerados suscetíveis a murcha bacteriana.

Há 25 clones de eucalipto resistentes a murcha bacteriana.

5.6. 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**, v. 31, n. 4, p. 357-366, 2006.

CHAO, J. A preliminary investigation of bacterial wilt occurrence in *Eucalyptus saligna* and *E. grandis* plantations in Guangxi Province, China (in Chinese). **Guangxi For. Information**, v. 4, p. 30-31, 1982.

CHOUDHARY, D. K.; NABI, S. U.; DAR, M. S.; KHAN, K. A. *Ralstonia solanacearum*: A wide spread and global bacterial plant wilt pathogen. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP**, v. 7, n. 72, p. 85-90, 2018.

CIESLA, W. M.; DIEKMANN, M.; PUTTER, C. A. *Eucalyptus* spp. **FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm**, n. 17, 1996.

COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J. *Ralstonia solanacearum* and *R. pseudosolanacearum* on Eucalyptus: Opportunists or Primary Pathogens?. **Frontiers in plant science**, v. 8, n. 761, 2017.

DELL, B.; XU, D. Bacterial wilt and boron deficiency stress: a new disorder in eucalypt plantations in south China. **Chinese Forestry Science and Technology**, v. 5, n.1, p. 45-50, 2006.

DENNY, T. P. Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: GNANAMANICKAM, S. S. **Plant-Associated Bacteria**. Dordrecht: Springer, 2006, p. 573-644.

DIANESE, J. C.; DRISTIG, M. C. G.; CRUZC, A. P. Susceptibility to wilt associated with *Pseudomonas solanacearum* among six species of Eucalyptus growing in equatorial Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v. 19, n. 3, p. 71-76, 1990.

FREITAS, R. G.; HERMENEGILDO, P. S.; GUIMARÃES, L. M.; ZAUZA, E. A.; BADEL, J. L.; ALFENAS, A. C. Molecular characterization and aggressiveness of the *Ralstonia solanacearum* species complex from *Eucalyptus* spp. in Brazil. **Forest Pathology**, p. e12704, 2021.

FONSECA, N. R.; OLIVEIRA, L. S.; GUIMARÃES, L. M.; TEIXEIRA, R. U.; LOPES, C. A.; ALFENAS, A. C. An efficient inoculation method of *Ralstonia solanacearum* to test wilt resistance in *Eucalyptus* spp. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 42-47, 2016.

GAN, S.; LI, M.; LI, F.; WU, K.; WU, J.; BAI, J. Genetic analysis of growth and susceptibility to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in Eucalyptus by interspecific factorial crossing. **Silvae Genetica**, v. 53, n. 1-6, p. 254-258, 2004.

GONÇALVES, D. A.; ALVES, R.; SILVIO JUNIOR, B. **Sistema agroflorestal com paricá** (*Schizolobium amazonicum* Huber ex. Ducke), **cupuaçu** (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) e **banana** (*Musa* spp.), 50 ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008.

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

HAYWARD, A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD A. C.; HARTMAN, G. L. **Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford, UK: CAB International, p. 9-24, 1994.

HE, L. Y.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. **Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China**. 1983.

LI, M.; GAN, S. M.; LI, F. G.; WU, K. M.; WU, J. Y.; QIAN, R. G.; GAN, W. Y. Selection of growth and bacterial wilt resistance in Eucalyptus interspecific hybrids. **Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)**, v. 6, 2007.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, M. A. Avaliação da resistência do eucalipto à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. **Revista Árvore**, p. 649-656, 2014.

MAFIA, R.; 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**, v. 36, n. 4, p. 593–602, 2012.
- MARQUES, E.; UESUGI, C. H.; BLUM, L. E. B. Virulence of *Ralstonia solanacearum* strains (biovar 1 and 2T) to Eucalyptus spp. Virulência de estirpes (biovar 1 e 2T) de *Ralstonia solanacearum* a Eucalyptus spp. **Ciência Rural**, v.43 n. 11, p. 1952-1958, 2013.
- RESENDE, M.D.V. Melhoramento de essências florestais. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 589-647.
- SANTOS, C. C. dos. Métodos de inoculação, avaliação da resistência e manejo de *Ralstonia solanacearum* em viveiro de produção de mudas. 2020. 78 f.Tese (Ciência Florestal) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp, Botucatu, 2020.
- SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; DOS ANJOS, L. H. C.; DE OLIVEIRA, V. A., LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; CUNHA, T. J. F. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5 ed. Brasília, DF: Embrapa, 2018. 353 p.
- SUDO, S.; OLIVEIRA, G. H. N.; PEREIRA, A. C. Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e bracatinga (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith. **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p. 631. 1983.
- SUPRIADI, D.; MULYA, K.; SIPETU, D. Bacterial wilt disease of woody trees caused by *Ralstonia solanacearum*: a review. **J Penelitian dan Pengembangan Pertanian**, v. 20, n. 3, p. 106-112, 2001.
- VASSE, J.; FREY, P.; TRIGALET, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 8, n. 2, p. 241-251, 1995.
- WANG, Y.; ARNOLD, R.; LI, G.; XIE, Y.; ZHOU, X. Identification and rapid detection of bacterial wilt in plantation Eucalyptus in China. **Australian forestry**, v. 77, n. 2, p. 133-139, 2014.
- WU, Q.; LIANG Z. Selection of species and provenance of Eucalyptus for resistance to bacterial wilt. **J S Journal of South China Agricultural University**, v. 9, p. 41–45, 1988.
- XU, J.; PAN, Z. C.; PRIOR, P.; XU, J. S.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; FENG, J. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. **European journal of plant pathology**, v. 125, n. 4, p. 641-653, 2009.
- ZAMPROGNO, K. C.; FURTADO, E. L.; MARINO, C. L.; BONINE, C. A.; DIAS, D. C. Utilização de análise de segregantes agrupados na identificação de marcadores ligados a genes que controlam a resistência à ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) em Eucalyptus sp. **Summa Phytopathologica**, **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 3, p. 253-255, 2008.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A murcha bacteriana (*Ralstonia* spp.) é um dos patógenos mais destrutivos do mundo, infecta plantas por meio da raiz causando o bloqueio no transporte e água ocasionando murcha permanente e morte da planta. Na cultura do eucalipto já causou diversas consequências econômicas.

Compreender como a murcha bacteriana do eucalipto progride no tempo e no espaço possibilita uma visão mais completa da estrutura e do comportamento do patossistema. Essa compreensão é possível por meio da análise espaço-temporal da doença. A combinação dessas duas análises permite a aplicação prática como a caracterização do padrão ou dos padrões de dispersão da doença, delineamento de estratégias de controle e a dedução dos centros de origem de patógeno.

Diante disso, o objetivo com esse estudo foi descrever a dinâmica espaço-temporal da murcha bacteriana do eucalipto e avaliar a resistência de clones de eucalipto em campo.

Com a análise espacial, observou-se que a murcha bacteriana do eucalipto apresentou padrão de agregação. Os focos da doença possuem maior comprimento na direção da linha de plantio e são caracterizados pela forma não compactada.

O modelo Monomolecular foi ajustado aos dados, estimando incidência de murcha bacteriana do eucalipto de 48,98% para um ciclo de corte de sete anos. Essa projeção indica inviabilidade da manutenção do plantio florestal, caso não seja tomada alguma medida de manejo que vise diminuir o inóculo inicial.

Diante da dificuldade de manejo dessa doença, o plantio com clones de eucalipto resistentes constitui um dos meios mais eficazes de se controlar a murcha bacteriana. Este trabalho identificou 25 clones resistentes à bactéria *R. solanacearum* que podem ser utilizados em povoamentos florestais em locais com histórico da doença. Porém, para estudos posteriores é importante que se avalie também o comportamento dos clones de eucalipto a espécie *Ralstonia pseudosolanacearum*, uma vez que este filotipo foi registrado no Brasil em 2020 causando murcha em eucalipto.

8. APÊNDICE A

Apêndice B: Ranqueamento dos clones de eucalipto utilizado no experimento. Fazenda Saudade de Mnas, Dom Eliseu-PA

Seleção de Clones

Ordem	Clone	g	u + g	Ganho	Nova Média
1	306	754.7583	1426.8768	754.7583	1426.8768
2	276	626.9259	1299.0444	690.8421	1362.9606
3	160	454.8939	1127.0124	612.1927	1284.3112
4	301	447.5273	1119.6458	571.0264	1243.1449
5	107	393.3610	1065.4795	535.4933	1207.6118
6	241	359.3446	1031.4631	506.1352	1178.2537
7	1	355.2280	1027.3465	484.5770	1156.6955
8	14	343.0947	1015.2132	466.8917	1139.0102
9	2	330.9615	1003.0800	451.7884	1123.9069
10	143	322.7282	994.8467	438.8823	1111.0009
11	302	310.5950	982.7135	427.2199	1099.3384
12	64	294.1284	966.2469	416.1289	1088.2474
13	255	288.4951	960.6136	406.3109	1078.4294
14	167	286.3285	958.4470	397.7407	1069.8593
15	157	280.6952	952.8137	389.9377	1062.0562
16	174	279.3952	951.5137	383.0288	1055.1473
17	76	269.4286	941.5471	376.3464	1048.4649
18	159	259.8954	932.0139	369.8769	1041.9954
19	274	259.0287	931.1472	364.0428	1036.1613
20	5	252.5287	924.6472	358.4671	1030.5856
21	212	249.4954	921.6139	353.2780	1025.3965
22	154	240.3955	912.5140	348.1470	1020.2655
23	32	234.7622	906.8807	343.2172	1015.3357
24	116	231.7289	903.8474	338.5718	1010.6904
25	115	221.7623	893.8808	333.8995	1006.0180
26	239	216.5623	888.6808	329.3865	1001.5050
27	151	216.1290	888.2475	325.1918	997.3103
28	25	213.9624	886.0809	321.2193	993.3378
29	124	210.9291	883.0476	317.4162	989.5347
30	279	210.4957	882.6142	313.8522	985.9707
31	87	205.2958	877.4143	310.3503	982.4689
32	304	204.6458	876.7643	307.0471	979.1656
33	272	195.3292	867.4477	303.6617	975.7802
34	267	190.5625	862.6810	300.3352	972.4538
35	282	188.3959	860.5144	297.1370	969.2555
36	106	171.4960	843.6145	293.6470	965.7655
37	278	160.2294	832.3479	290.0411	962.1596
38	122	145.0629	817.1814	286.2259	958.3444
39	235	140.7296	812.8481	282.4952	954.6137
40	28	139.4296	811.5481	278.9185	951.0370
41	268	124.6964	796.8149	275.1570	947.2755
42	303	124.6964	796.8149	271.5746	943.6931
43	121	122.0964	794.2149	268.0984	940.2169
44	182	119.4964	791.6149	264.7211	936.8396
45	33	118.6297	790.7482	261.4746	933.5931
46	186	118.1964	790.3149	258.3599	930.4784
47	82	116.0298	788.1483	255.3316	927.4501
48	83	114.2964	786.4149	252.3933	924.5118
49	3	113.8631	785.9816	249.5662	921.6847

50	117	112.1298	784.2483	246.8174	918.9360
51	305	111.6965	783.8150	244.1680	916.2865
52	280	110.8298	782.9483	241.6038	913.7223
53	226	105.1965	777.3150	239.0301	911.1486
54	218	103.4632	775.5817	236.5196	908.6381
55	103	102.5965	774.7150	234.0846	906.2031
56	285	98.2632	770.3817	231.6593	903.7778
57	89	97.3966	769.5151	229.3038	901.4223
58	233	90.0300	762.1485	226.9025	899.0210
59	275	88.7300	760.8485	224.5606	896.6791
60	26	86.1300	758.2485	222.2534	894.3719
61	271	84.3967	756.5152	219.9935	892.1120
62	172	81.7967	753.9152	217.7645	889.8830
63	11	79.1967	751.3152	215.5650	887.6835
64	148	79.1967	751.3152	213.4342	885.5527
65	162	77.8967	750.0152	211.3490	883.4676
66	232	75.2967	747.4152	209.2876	881.4062
67	277	74.4301	746.5486	207.2748	879.3934
68	65	73.9967	746.1152	205.3149	877.4334
69	155	73.1301	745.2486	203.3992	875.5177
70	123	70.5301	742.6486	201.5010	873.6195
71	165	64.8968	737.0153	199.5770	871.6955
72	178	63.5968	735.7153	197.6884	869.8069
73	126	62.2968	734.4153	195.8337	867.9522
74	225	58.8302	730.9487	193.9823	866.1008
75	188	55.3635	727.4821	192.1341	864.2526
76	187	47.5636	719.6821	190.2318	862.3503
77	152	46.6969	718.8155	188.3677	860.4863
78	7	44.0970	716.2155	186.5181	858.6366
79	42	43.6636	715.7821	184.7098	856.8283
80	214	43.6636	715.7821	182.9468	855.0653
81	286	41.4970	713.6155	181.2005	853.3190
82	262	40.6303	712.7488	179.4862	851.6047
83	96	40.1970	712.3155	177.8080	849.9265
84	247	38.8970	711.0155	176.1543	848.2728
85	4	36.2970	708.4155	174.5089	846.6274
86	228	34.9970	707.1155	172.8867	845.0052
87	29	33.6970	705.8155	171.2868	843.4053
88	230	32.3971	704.5156	169.7085	841.8270
89	153	29.7971	701.9156	168.1365	840.2550
90	289	29.7971	701.9156	166.5994	838.7179
91	58	28.4971	700.6156	165.0818	837.2003
92	49	25.8971	698.0156	163.5689	835.6874
93	284	25.8971	698.0156	162.0886	834.2071
94	269	25.4638	697.5823	160.6351	832.7536
95	179	25.0304	697.1489	159.2077	831.3262
96	193	22.4305	694.5490	157.7829	829.9014
97	176	19.3971	691.5157	156.3563	828.4748
98	300	19.3971	691.5157	154.9587	827.0772
99	48	18.5305	690.6490	153.5807	825.6992
100	142	18.0972	690.2157	152.2258	824.3443
101	84	16.7972	688.9157	150.8849	823.0035
102	9	15.4972	687.6157	149.5576	821.6761
103	264	13.3305	685.4490	148.2350	820.3535
104	213	10.7305	682.8491	146.9129	819.0314
105	137	8.9972	681.1157	145.5994	817.7179
106	290	7.6972	679.8157	144.2984	816.4169

107	86	6.3972	678.5158	143.0096	815.1281
108	23	5.9639	678.0824	141.7407	813.8592
109	258	5.9639	678.0824	140.4950	812.6135
110	248	5.0973	677.2158	139.2641	811.3826
111	50	3.7973	675.9158	138.0437	810.1622
112	229	3.7973	675.9158	136.8451	808.9636
113	138	3.3639	675.4824	135.6638	807.7823
114	299	1.1973	673.3158	134.4843	806.6028
115	171	-0.1027	672.0158	133.3140	805.4325
116	257	-0.9694	671.1491	132.1564	804.2749
117	263	-2.7027	669.4158	131.0037	803.1222
118	291	-2.7027	669.4158	129.8706	801.9891
119	119	-5.3027	666.8158	128.7347	800.8532
120	156	-5.3027	666.8158	127.6177	799.7362
121	6	-6.6027	665.5159	126.5085	798.6270
122	273	-6.6027	665.5159	125.4174	797.5359
123	77	-8.7693	663.3492	124.3264	796.4450
124	168	-9.2026	662.9159	123.2496	795.3681
125	170	-11.8026	660.3159	122.1692	794.2877
126	180	-13.1026	659.0159	121.0956	793.2141
127	99	-15.7026	656.4159	120.0184	792.1370
128	164	-15.7026	656.4159	118.9581	791.0766
129	34	-18.3026	653.8159	117.8941	790.0126
130	169	-20.4692	651.6493	116.8298	788.9483
131	69	-22.2025	649.9160	115.7684	787.8869
132	73	-22.2025	649.9160	114.7232	786.8417
133	205	-23.5025	648.6160	113.6839	785.8024
134	224	-24.8025	647.3160	112.6504	784.7689
135	206	-26.1025	646.0160	111.6226	783.7411
136	136	-26.5358	645.5827	110.6068	782.7253
137	12	-28.7025	643.4160	109.5899	781.7084
138	149	-28.7025	643.4160	108.5878	780.7063
139	203	-29.1358	642.9827	107.5970	779.7155
140	134	-29.5692	642.5494	106.6172	778.7357
141	72	-30.0025	642.1160	105.6483	777.7668
142	250	-33.0358	639.0827	104.6716	776.7901
143	173	-34.3358	637.7827	103.6995	775.8181
144	201	-34.3358	637.7827	102.7410	774.8595
145	249	-35.2024	636.9161	101.7896	773.9081
146	8	-36.5024	635.6161	100.8424	772.9609
147	177	-36.5024	635.6161	99.9081	772.0266
148	196	-36.5024	635.6161	98.9864	771.1049
149	240	-36.5024	635.6161	98.0771	770.1956
150	147	-37.8024	634.3161	97.1712	769.2897
151	217	-39.1024	633.0161	96.2688	768.3873
152	252	-39.1024	633.0161	95.3782	767.4967
153	261	-39.1024	633.0161	94.4992	766.6177
154	146	-40.4024	631.7161	93.6232	765.7417
155	175	-40.4024	631.7161	92.7585	764.8770
156	222	-40.4024	631.7161	91.9049	764.0234
157	98	-41.7024	630.4161	91.0539	763.1724
158	132	-41.7024	630.4161	90.2137	762.3322
159	266	-44.3024	627.8161	89.3677	761.4862
160	234	-46.0357	626.0828	88.5214	760.6399
161	281	-46.9024	625.2162	87.6803	759.7988
162	238	-48.2023	623.9162	86.8415	758.9600
163	190	-49.0690	623.0495	86.0077	758.1262

164	254	-49.5023	622.6162	85.1814	757.2999
165	39	-50.8023	621.3162	84.3573	756.4758
166	204	-50.8023	621.3162	83.5431	755.6616
167	185	-52.1023	620.0162	82.7308	754.8493
168	251	-52.1023	620.0162	81.9282	754.0467
169	296	-56.0023	616.1162	81.1121	753.2306
170	85	-57.3023	614.8162	80.2979	752.4164
171	223	-57.7356	614.3829	79.4907	751.6092
172	47	-58.6023	613.5162	78.6878	750.8063
173	184	-58.6023	613.5162	77.8942	750.0127
174	288	-58.6023	613.5162	77.1097	749.2283
175	307	-59.9023	612.2162	76.3268	748.4453
176	57	-61.2022	610.9163	75.5454	747.6639
177	51	-61.6356	610.4829	74.7704	746.8889
178	118	-62.9356	609.1829	73.9967	746.1152
179	210	-63.8022	608.3163	73.2269	745.3454
180	128	-65.1022	607.0163	72.4584	744.5769
181	295	-65.1022	607.0163	71.6984	743.8169
182	38	-65.9689	606.1496	70.9420	743.0605
183	91	-66.4022	605.7163	70.1915	742.3100
184	127	-66.4022	605.7163	69.4491	741.5676
185	197	-66.8355	605.2830	68.7125	740.8310
186	183	-67.7022	604.4163	67.9790	740.0976
187	293	-67.7022	604.4163	67.2535	739.3720
188	110	-68.1355	603.9830	66.5333	738.6518
189	20	-69.0022	603.1163	65.8162	737.9347
190	90	-70.3022	601.8163	65.0998	737.2183
191	308	-70.3022	601.8163	64.3909	736.5094
192	71	-70.7355	601.3830	63.6871	735.8056
193	101	-74.2022	597.9164	62.9726	735.0912
194	109	-74.2022	597.9164	62.2656	734.3841
195	44	-75.5021	596.6164	61.5591	733.6776
196	68	-75.5021	596.6164	60.8598	732.9783
197	158	-76.8021	595.3164	60.1610	732.2795
198	236	-76.8021	595.3164	59.4692	731.5877
199	18	-78.1021	594.0164	58.7779	730.8964
200	133	-79.4021	592.7164	58.0870	730.2055
201	150	-79.4021	592.7164	57.4030	729.5215
202	259	-79.4021	592.7164	56.7257	728.8443
203	297	-79.4021	592.7164	56.0552	728.1737
204	130	-80.7021	591.4164	55.3848	727.5033
205	135	-80.7021	591.4164	54.7210	726.8395
206	46	-82.0021	590.1164	54.0572	726.1758
207	53	-82.0021	590.1164	53.4000	725.5185
208	92	-82.0021	590.1164	52.7490	724.8675
209	139	-82.0021	590.1164	52.1042	724.2227
210	141	-82.0021	590.1164	51.4656	723.5841
211	209	-82.0021	590.1164	50.8331	722.9516
212	66	-83.3021	588.8164	50.2004	722.3189
213	243	-83.3021	588.8164	49.5736	721.6921
214	22	-84.6021	587.5164	48.9466	721.0651
215	43	-84.6021	587.5164	48.3255	720.4440
216	63	-84.6021	587.5164	47.7101	719.8286
217	70	-84.6021	587.5164	47.1003	719.2188
218	97	-84.6021	587.5164	46.4962	718.6147
219	161	-84.6021	587.5164	45.8976	718.0161
220	189	-84.6021	587.5164	45.3044	717.4229

221	192	-84.6021	587.5164	44.7166	716.8351
222	220	-84.6021	587.5164	44.1341	716.2526
223	245	-84.6021	587.5164	43.5568	715.6753
224	283	-84.6021	587.5164	42.9846	715.1031
225	237	-85.9021	586.2164	42.4118	714.5303
226	244	-85.9021	586.2164	41.8440	713.9625
227	67	-86.3354	585.7831	41.2794	713.3979
228	104	-86.7687	585.3498	40.7178	712.8363
229	37	-87.2021	584.9165	40.1591	712.2777
230	129	-87.2021	584.9165	39.6054	711.7239
231	199	-87.2021	584.9165	39.0565	711.1750
232	194	-88.5020	583.6165	38.5066	710.6251
233	198	-88.5020	583.6165	37.9615	710.0800
234	41	-88.9354	583.1831	37.4192	709.5377
235	80	-89.8020	582.3165	36.8779	708.9964
236	88	-89.8020	582.3165	36.3411	708.4596
237	120	-91.1020	581.0165	35.8034	707.9219
238	166	-98.9020	573.2165	35.2374	707.3559
239	13	-100.2020	571.9166	34.6707	706.7892
240	215	-100.2020	571.9166	34.1087	706.2272
241	253	-100.2020	571.9166	33.5514	705.6699
242	30	-104.1019	568.0166	32.9826	705.1011
243	24	-106.7019	565.4166	32.4078	704.5263
244	200	-107.5686	564.5499	31.8341	703.9526
245	94	-108.0019	564.1166	31.2633	703.3818
246	114	-108.0019	564.1166	30.6972	702.8157
247	211	-108.0019	564.1166	30.1357	702.2542
248	298	-108.0019	564.1166	29.5787	701.6972
249	246	-109.3019	562.8166	29.0209	701.1394
250	60	-110.6019	561.5166	28.4624	700.5809
251	62	-110.6019	561.5166	27.9084	700.0269
252	36	-111.9019	560.2166	27.3536	699.4721
253	45	-111.9019	560.2166	26.8032	698.9217
254	108	-111.9019	560.2166	26.2571	698.3756
255	219	-111.9019	560.2166	25.7153	697.8338
256	31	-113.2019	558.9166	25.1726	697.2911
257	93	-113.2019	558.9166	24.6342	696.7527
258	163	-113.2019	558.9166	24.1000	696.2185
259	287	-113.2019	558.9166	23.5698	695.6883
260	15	-115.8018	556.3167	23.0338	695.1523
261	56	-115.8018	556.3167	22.5019	694.6204
262	75	-115.8018	556.3167	21.9740	694.0925
263	100	-115.8018	556.3167	21.4501	693.5686
264	144	-115.8018	556.3167	20.9302	693.0487
265	216	-115.8018	556.3167	20.4142	692.5328
266	227	-115.8018	556.3167	19.9022	692.0207
267	74	-121.0018	551.1167	19.3744	691.4929
268	16	-123.6018	548.5167	18.8409	690.9594
269	52	-123.6018	548.5167	18.3114	690.4299
270	61	-123.6018	548.5167	17.7858	689.9043
271	79	-123.6018	548.5167	17.2641	689.3826
272	125	-123.6018	548.5167	16.7462	688.8647
273	145	-123.6018	548.5167	16.2321	688.3506
274	202	-123.6018	548.5167	15.7218	687.8403
275	242	-123.6018	548.5167	15.2151	687.3336
276	292	-123.6018	548.5167	14.7122	686.8307
277	294	-123.6018	548.5167	14.2128	686.3313

278	19	-124.9018	547.2167	13.7124	685.8309
279	35	-124.9018	547.2167	13.2156	685.3341
280	131	-124.9018	547.2167	12.7223	684.8408
281	207	-124.9018	547.2167	12.2326	684.3511
282	256	-124.9018	547.2167	11.7463	683.8648
283	260	-124.9018	547.2167	11.2634	683.3819
284	10	-127.5018	544.6168	10.7748	682.8933
285	17	-127.5018	544.6168	10.2896	682.4081
286	21	-127.5018	544.6168	9.8078	681.9263
287	27	-127.5018	544.6168	9.3294	681.4479
288	40	-127.5018	544.6168	8.8543	680.9728
289	54	-127.5018	544.6168	8.3825	680.5010
290	55	-127.5018	544.6168	7.9139	680.0324
291	59	-127.5018	544.6168	7.4486	679.5671
292	78	-127.5018	544.6168	6.9864	679.1049
293	81	-127.5018	544.6168	6.5274	678.6459
294	95	-127.5018	544.6168	6.0715	678.1900
295	102	-127.5018	544.6168	5.6187	677.7372
296	105	-127.5018	544.6168	5.1690	677.2875
297	111	-127.5018	544.6168	4.7223	676.8408
298	112	-127.5018	544.6168	4.2786	676.3971
299	113	-127.5018	544.6168	3.8378	675.9564
300	140	-127.5018	544.6168	3.4000	675.5186
301	181	-127.5018	544.6168	2.9652	675.0837
302	191	-127.5018	544.6168	2.5331	674.6517
303	195	-127.5018	544.6168	2.1040	674.2225
304	208	-127.5018	544.6168	1.6777	673.7962
305	221	-127.5018	544.6168	1.2541	673.3726
306	231	-127.5018	544.6168	0.8333	672.9519
307	265	-127.5018	544.6168	0.4153	672.5338
308	270	-127.5018	544.6168	0.0000	672.1185
