

DANIELLA FLÁVIA SAID HEID SCHETTINI SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DAS DOENÇAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS EM
VIVEIROS E PLANTIOS FLORESTAIS DE *Eucalyptus* spp.**

**Botucatu
2019**

DANIELLA FLÁVIA SAID HEID SCHETTINI SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DAS DOENÇAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS EM
VIVEIROS E PLANTIOS FLORESTAIS DE *Eucalyptus* spp.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciência Florestal pelo programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Celso Luís Marino

Coorientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Botucatu

2019

S586c	Silva, Daniella Flávia Said Heid Schettini Caracterização das doenças causadas por bactérias em viveiros e plantios florestais de <i>Eucalyptus</i> spp. / Daniella Flávia Said Heid Schettini Silva. -- Botucatu, 2019 154 p. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu Orientador: Celso Luís Marino Coorientador: Edson Luiz Furtado 1. Eucalipto. 2. Florestas Proteção. 3. Plantas Melhoramento genético. 4. Bactérias gram-negativas. 5. Enterobacterias. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DAS DOENÇAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS EM VIVEIROS E PLANTIOS FLORESTAIS DE *Eucalyptus* spp.

AUTORA: DANIELLA FLÁVIA SAID HEID SCHETTINI SILVA

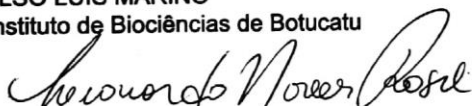
ORIENTADOR: CELSO LUIS MARINO

COORIENTADOR: EDSON LUIZ FURTADO

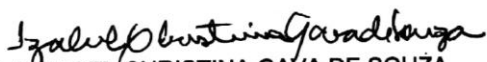
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA FLORESTAL, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. CELSO LUIS MARINO
Genética / Instituto de Biociências de Botucatu



Pesquisador Dr. LEONARDO NOVAES ROSSE
Pesquisa e Biotecnologia Florestal / Eldorado Brasil Celulose S/A



Pesquisadora Dr.ª IZABEL CHRISTINA GAVA DE SOUZA
Pesquisa e Biotecnologia Florestal / Suzano Papel e Celulose

Botucatu, 19 de julho de 2019

*Aos meus pais João Flávio da Silva e Enezia
Maria Claret, por mais uma vitória conquistada
juntos, dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter feito tudo no tempo e na maneira dele e também por ter me guiado pelas rodovias em todos os mais de trinta mil quilômetros percorridos entre a UNESP/FCA, UNESP/Rubião Jr., Três Lagoas no Mato Grosso do Sul e Andradina em São Paulo.

À Nossa Senhora das Graças, por ter me protegido com seu manto, me salvado e ter enviado o anjo Rafael e sua família para me socorrer.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 por financiar meus estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal por ter aberto as portas para que eu continuasse minha trajetória profissional.

Aos meus dois orientadores, Dr. Celso Luís Marino e Dr. Edson Luiz Furtado, por toda confiança, dedicação, paciência e principalmente por terem confiado um dos maiores desafios do início da minha carreira.

À empresa Eldorado Brasil, pela parceria e financiamento da nossa pesquisa, em nome dos coordenadores Sharlles Christian Dias e Anderson Bobko por toda confiança em mim depositada desde os tempos de estagiária.

Ao Luciano Flavio Neves por toda troca de experiência e disponibilidade com a coleta de dados.

Ao Caio Marçal pela colaboração nas atividades e a todos do Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Genético da empresa, em nome dos colaboradores Fabiana Lima, Gabriel Rodrigues, João Victor Padovan, Mirian Veiga. Aos colaboradores do viveiro de produção de mudas por serem sempre acolhedores.

Ao Laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Proteção de Plantas da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP de Botucatu, em especial à Anny Mery Ruiz, parceira e irmã nos desafios diários e à Helena Farsoni por toda disponibilidade e auxílio nos experimentos.

Ao Centro de Análises Genômicas (Cagen) do Departamento de Genética da UNESP/Rubião Jr. de Botucatu.

Ao pesquisador Luis Otávio Berian, do Instituto Biológico de Campinas, por todo conhecimento repassado sobre o mundo das bactérias fitopatogênicas em plantas, principalmente na caracterização bioquímica do presente trabalho.

Ao meu pai e mestre, João Flávio da Silva que com seus 32 anos de Engenharia Florestal me inspira todos os dias. É uma honra ser filha de alguém que conseguiu ser uma marco para o setor florestal.

À minha mãe, Enezia Maria Claret, que sempre rezou para que Nossa Senhora das Graças me protegesse de todos os perigos e quando mais precisei foram suas orações que me salvaram. Mais uma vez vencemos tudo isso juntas, você venceu o câncer mais uma vez e esse título é nosso!

À família Said Heid Schettini, fonte de inspiração, em especial a minha tia Sylvia Maria.

As melhores amigas que eu poderia ter, que me acompanham por mais de vinte anos e me renovam todos os dias, Camila Prates, Juliana Coelho, Luiza Saad, Natalia Arruda, Salísia Fantin e aos meus dois lindos sobrinhos, Cauã Saad e Otto Fantin.

Ao Felipe Queiroz Mendes, que me ensinou muito sobre a paixão pela pesquisa, resiliência, dedicação e principalmente, por todo auxílio acadêmico.

Assim, percebo que mais uma vez vim, vivi e venci cada uma das batalhas durante este período e sou grata a cada um que direta ou indiretamente cruzou meu caminho durante esta trajetória.

“Quem se arrisca a andar por ares nunca antes respirados ou pensar fora da curva tem grandes chances de encontrar pedras no caminho. No entanto, ninguém é digno de contribuir para a ciência se não usar suas dores e insônias nesse processo. Não há céu sem tempestade. Risos e lágrimas, sucessos e fracassos, aplausos e vaias fazem parte do currículo de cada ser humano, em especial daqueles que são apaixonados por produzir novas ideias.”

Augusto Cury

RESUMO

O setor florestal brasileiro, em grande maioria advindos de plantios de eucalipto, é destaque no mercado de florestas plantadas, tornando-se um dos mais relevantes no cenário global, para produção de matéria-prima para diversas indústrias e consequentemente movimentando a economia do país. Assim, é crescente a necessidade de estudos que visem compreender fatores que afetam diretamente a produção da cultura. Dentre estes fatores, destacam-se os ligados diretamente as doenças bióticas, sendo causadas por diferentes patógenos fúngicos e bacterianos. Nos últimos anos observa-se o aumento gradativo de doenças de origem bacteriana, como as causadas por *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas* sp. e *Pseudomonas* sp. e mais recente a seca de ponteiros causada por bacterioses. Sendo assim, o presente trabalho realizou a diferenciação entre essas, bem como, buscou o entendimento através da caracterização bioquímica, molecular, patogênica e epidemiológica da bacteriose causadora de seca de ponteiros em eucalipto, a fim de servir como base para tomadas de decisão em práticas de manejo para controle e erradicação. Através desse estudo, conclui-se que o sintoma de necrose apical seguida de seca dos ponteiros do eucalipto é causado pelo complexo de enterobactérias *Erwinia psidii* e *Pantoea eucalypti* e que esse causa danos e prejuízos consideráveis para mudas e árvores do gênero.

Palavras-chave: Bacterioses. Complexo bacteriano. Proteção florestal. Genética florestal. *Eucalyptus* spp.

ABSTRACT

The Brazilian forestry sector in its majority coming from plantations of *Eucalyptus* has been highlighted in a global scenario due to the large production of raw material to various industries and, thus, driving the economy. Thus, studies aimed at understanding factors that directly affect crop production are extremely relevant. Among these factors, those directly linked to biotic diseases are highlighted, being caused by different fungal and bacterial pathogens. In recent years, it is possible to observe the gradual increase of bacterial diseases, such as those caused by *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas* sp. and *Pseudomonas* sp. and more recently the die back caused by a bacteriosis. Therefore, the present work seeks to differentiate bacterioses, as well as to understand through the biochemical, molecular and pathogenic characterization of the bacteriosis which causes die back in eucalyptus, in order to serve as a basis for decision-making in management practices for control and eradication of this disease. Throughout this study, it was possible to conclude that the symptom of apical necrosis followed by the die back in eucalyptus is caused by the complex of enterobacteria *Erwinia psidii* and *Pantoea eucalypti* and it causes considerable damages and losses to seedlings and trees of this genus.

Keywords: Bacterioses. Bacterial complex. Forest protection. Forest genetics. *Eucalyptus* spp.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Isolado utilizado para a caracterização patogênica. A) Massa bacteriana crescida em meio de cultura NA e B) Suspensão bacteriana a 3×10^8 UFC.....	52
Figura 2 - Sintomatologia da doença em plantios de eucalipto em Inocência, no Mato Grosso do Sul. A) Arroxamento da nervura principal e B) Desfolha das árvores e seca de ramos e ponteiros	53
Figura 3 - Sintomatologia da doença em minicepas e mudas de eucalipto em Andradina, São Paulo. A) Arroxamento de nervura e b) Necrose apical e arroxamento da nervura principal	53
Figura 4 - Plaqueamento por estria simples para utilização na caracterização bioquímica. A) Isolado LPFG_002 e B) Isolado LPFG_31	55
Figura 5 - Teste de oxidação e fermentação (O/F). A) No início do teste e B) Após 48 horas da realização	56
Figura 6 - Teste de hipersensibilidade em folhas de fumo. A) Início do teste após a aplicação dos isolados bacterianos e B) Após 48 horas do início do procedimento.....	57
Figura 7 - Teste de produção de enzima pectinolítica em pimentão. A) Início do teste e B) Após 48 horas da inoculação das massas bacterianas	57
Figura 8 - Teste de ativação da fosfatase redutora. A) Crescimento bacteriano após 24 horas do plaqueamento e B) Mudança de coloração após a aplicação do hidróxido de amônio	58
Figura 9 - Teste de produção de enzima catalase. A) Início do teste, com as massas bacterianas e B) Após a aplicação de peróxido de hidrogênio	59
Figura 10 - Teste de produção de ácidos a partir de carboidratos. A) Ao início do teste e B) Após aplicação dos reagentes e o período de incubação.....	59
Figura 11 - Teste de redução do nitrato em nitrito. A) Início do teste e B) Após a introdução de ácido sulfanílico e N-dimetil-alfanaftilamina.....	60

Figura 12 - Isolados utilizados durante o experimento, através dos métodos de inserção. A) Isolado LPFG_027; B) Isolado LPFG_031 e C) Isolado LPFG_032	62
Figura 13 - Isolados utilizados durante o experimento, através dos métodos de injeção. A) Isolado LPFG_027; B) Isolado LPFG_031 e C) Isolado LPFG_032	63
Figura 14 - Arroxamento da nervura principal, seguido da seca total da muda de <i>Eucalyptus</i> spp. através da inserção de massa bacteriana nas gemas...	64
Figura 15 - Crescimento de massa bacteriana advindos de mudas submetidas a inoculação artificial.....	65
Figura 16 - Sintomas da doença tanto em goiaba quanto em jambo A) Seca dos ponteiros da goiaba e B) Minicancro na haste do jambo	66

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Validação dos <i>primers</i> gapA (a), recA (b), rpoB (c) e 16S (d) através do uso de géis de agarose em eletroforese.....	77
Figura 2 - Validação dos <i>primers</i> gapA (a) e recA (b) através do uso de géis de agarose em eletroforese.....	77
Figura 3 - Validação dos <i>primers</i> gapA (a) e recA (b) através do uso de géis de agarose em eletroforese.....	78

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Escala de avaliação de severidade da bacteriose causadora de necrose apical e seca de ponteiros em minicepas de eucalipto. A) Nota 0; B) Nota 1; C) Nota 2; D) Nota 3 e E) Nota 4.....	89
Figura 2 - Forma de distribuição da doença em canteiro de minicepas de eucalipto	92
Figura 3 - Incidência da bacteriose causadora de necrose apical e seca de ponteiros em viveiro de produção de mudas de eucalipto.....	93
Figura 4 - Porcentagem de minicepas infectadas ao longo do ano por parcela de avaliação.....	94

Figura 5 - Total de brotos das minicepas contaminadas ao longo de um ano.....	94
Figura 6 - Severidade dos brotos infectados através da avaliação por escala de notas	96
Figura 7 - Precipitação anual no viveiro de produção de mudas de eucalipto	97
Figura 8 - Temperaturas (°C) máximo e mínima durante o ano em viveiro de produção de mudas de eucalipto	97

CAPÍTULO 4

Figura 1 - Caracterização da área 1 ao início do monitoramento. A) Destruição do lenho medular por conta do ataque bacteriano; B) Arroxamento da nervura principal das folhas e C) Crescimento bacteriano evidente através do isolamento indireto.....	107
Figura 2 - Caracterização da área 2 ao início do monitoramento. A) Destruição do lenho medular por conta do ataque bacteriano; B) Arroxamento da nervura principal das folhas e C) Crescimento bacteriano evidente através do isolamento indireto.....	108
Figura 3 - Ataque de psíldeo-de-concha nas áreas afetadas pelo complexo de enterobactérias.....	109
Figura 4 - Número de ciclos de ataque do complexo de enterobactérias ao longo do período de um ano para a Área 1.....	110
Figura 5 - Severidade da doença bacteriana ao longo do período de um ano para a Área 1 (2018-2019)	111
Figura 6 - Seca das árvores causado pelo complexo de enterobactérias. A) Seca total da árvore; B) Seca dos ramos e C) Árvore seca próxima de árvores aparentemente sadias	112
Figura 7 - Situação da área com a evolução da doença bacteriana. A) Árvores mortas ao longo do plantio; B) Desfolhas pelo ataque bacteriano e C) Quebra de árvores	112
Figura 8 - Seca e mortalidade das árvores em campo ao longo do período de avaliação da Área 1.....	113
Figura 9 - Número de ciclos de ataque do complexo de enterobactérias ao longo do período de um ano para a Área 2.....	114
Figura 10 - Severidade da doença bacteriana ao longo do período de um ano para a Área 2 (2018-2019)	115

Figura 11 - Seca e mortalidade das árvores em campo ao longo do período de avaliação da Área 2	116
Figura 12 - Situação da área com a evolução da doença bacteriana. A) Desfolha parcial causada pelo patógeno; B) Fontes de inóculo da doença e C) Desenvolvimento das árvores ao final das avaliações.....	116

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 - Isolados armazenado no Laboratório de Patologia Florestal Unesp/Botucatu e utilizados ao longo do estudo	54
Tabela 2 - Testes bioquímicos propostos por SCHAAD (2001) e os resultados encontrados para os isolados avaliados	60
Tabela 3 - Avaliação dos métodos de inoculação bacteriana	65

Capítulo 2

Tabela 1 - Sequência dos quatro <i>primers</i> utilizados durante a amplificação por PCR	75
Tabela 2 - Identificação dos isolados bacterianos causadores de seca de ponteiros em mudas e árvores de eucalipto através da comparação da sequência do gene 16S do DNA com as sequências depositadas no GenBank	79

Capítulo 3

Tabela 1 - Escala de notas atribuídas na avaliação da severidade do complexo de enterobactérias em minicepas no viveiro de eucalipto	88
--	----

Capítulo 4

Tabela 1 - Escala de notas para avaliação da severidade da doença em campo	105
Tabela 2 - Inventário aos dois anos de plantio da Área 1 afetada pelo complexo de enterobactérias	117
Tabela 3 - Inventário aos dois anos de plantio da Área 2 afetada pelo complexo de enterobactérias	117
Tabela 4 - Volume (m ³) observado aos dois anos de idade para áreas com alta e baixa severidade causada pelo complexo de enterobactérias	118

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	25
OBJETIVOS.....	28
Objetivo Geral	28
Objetivos específicos.....	28
REVISÃO DE LITERATURA	29
O gênero <i>Eucalyptus</i> e sua importância econômica.....	29
A importância da qualidade na implantação florestal	30
Bactérias patogênicas na cultura do eucalipto	31
Mancha bacteriana causada por <i>Pseudomonas spp.</i> e <i>Xanthomonas spp.</i> em <i>Eucalyptus spp.</i>	32
Murcha vascular bacteriana causada por <i>Ralstonia solanacearum</i> em <i>Eucalyptus spp.</i>	33
Seca de ponteiros causada por <i>Erwinia psidii</i> em <i>Eucalyptus spp.</i>	35
A caracterização como método de diagnose precisa	36
O uso das análises epidemiológicas no manejo de doenças bióticas	37
Quantificação de doenças de plantas: a fitopatometria como ferramenta na tomada de decisão	38
Análise espaço-temporal de doenças de plantas	38
CAPÍTULO 1 - NECROSE APICAL E SECA BACTERIANA DOS PONTEIROS DO EUCALIPTO: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PATOGENICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	40
1.1 INTRODUÇÃO	42
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	44
1.2.1 Obtenção dos inóculos e construção da biblioteca de isolados bacterianos	44
1.2.1.1 Levantamento da área e coleta de materiais infectados	44
1.2.1.2 Isolamento do patógeno e obtenção dos isolados bacterianos	44
1.2.1.3 Armazenamento, preservação e construção da biblioteca de isolados bacterianos.....	45
1.2.2 Caracterização bioquímica dos isolados em grupos bacterianos	46
1.2.2.1 Teste de Gram de Ryu ou teste de hidróxido de potássio (KOH).....	46
1.2.2.2 Teste de Oxidação e Fermentação (O/F) ou de crescimento anaeróbico	47
1.2.2.3 Teste de hipersensibilidade (HR) em folhas de fumo (<i>Nicotiana tabacum</i>) ...	48
1.2.2.4 Teste de produção de enzima pectinolítica	48
1.2.2.5 Teste de ativação de fosfatase redutora	49
1.2.2.6 Teste de produção de enzima catalase	49
1.2.2.7 Teste de produção de ácidos a partir de carboidratos.....	49
1.2.2.8 Teste de redução de nitrato (NO ₃ ⁻) em nitrito (NO ₂ ⁻)	50
1.2.3 Caracterização patogênica dos isolados	50
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52

REFERÊNCIAS	67
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DAS BACTÉRIAS CAUSADORAS DA NECROSE APICAL E SECA DE PONTEIROS DO EUCALIPTO	68
2.1 INTRODUÇÃO.....	70
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	72
2.2.1 Extração de DNA Genômico	72
2.2.2 Quantificação das amostras de DNA Genômico.....	73
2.2.3 Amplificação por PCR para confirmação da identidade dos isolados e sequenciamento de regiões de interesse	74
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
REFERÊNCIAS	81
CAPÍTULO 3 - ESTUDO DO COMPORTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DAS BACTÉRIAS CAUSADORAS DA NECROSE APICAL E SECA DE PONTEIROS EM MINICEPAS DE VIVEIRO DE PRODUÇÃO DE MUDAS DE EUCALIPTO	84
3.1 INTRODUÇÃO.....	86
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	88
3.2.1 Criação de escala de avaliação para estimativa da severidade do ataque causado pelo complexo de enterobactérias	88
3.2.2 Estudo do comportamento epidemiológico do complexo de enterobactérias em viveiro	90
3.2.3 Avaliação da eficiência de métodos de controle químico para o complexo de enterobactérias em viveiro.....	91
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
REFERÊNCIAS	99
CAPÍTULO 4 - ESTUDO DO COMPORTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO E QUANTIFICAÇÃO DE DANOS E PERDAS POR BACTÉRIAS CAUSADORAS DE NECROSE APICAL E SECA DE PONTEIROS EM PLANTIOS DE EUCALIPTO	100
4.1 INTRODUÇÃO.....	102
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	104
4.2.1 Avaliação da progressão da doença bacteriana em campo ao longo de um ano	104
4.2.2 Inventário parcial das árvores atacadas pelo complexo de bactérias em campo	105
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
REFERÊNCIAS	119
CONSIDERAÇÕES FINAIS	121
REFERÊNCIAS	124

APÊNDICE A - Mapa de distribuição da doença em canteiro de material propagativo em viveiro de eucalipto	127
APÊNDICE B - Base de dados de campo	128
ANEXO A - Protocolo utilizados para a realização da caracterização bioquímica	150
ANEXO A1 - Teste de Gram de Ryu	150
ANEXO A2 - Reação de Hipersensibilidade (HR) em folhas de fumo (<i>Nicotiana tabacum</i>)	150
ANEXO A3 - Teste de oxidação e fermentação (O/F)	151
ANEXO A4 - Teste de produção de fosfatase	151
ANEXO A5 - Teste de produção de enzima catalase	152
ANEXO A6 - Teste de redução de nitrato a nitrito	152
ANEXO A7 - Teste de produção de ácidos a partir de carboidratos	153

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Eucalyptus* tem sido extensivamente utilizado em plantios florestais devido às características de rápido crescimento, alta produtividade, ampla diversidade de espécies, capacidade de adaptação em diferentes condições edafoclimáticas e aplicações para diferentes finalidades (MORA & GARCIA, 2000). Tal fato reflete em cerca de 73% dos plantios florestais no país, com uma produção média de aproximadamente 138,50 milhões de metros cúbicos de madeira por ano e 5,70 milhões de hectares plantados (IBÁ, 2016).

Diante da expansão do mercado e das oportunidades internacionais de fornecimento de matéria-prima, as indústrias de celulose e papel, em grande maioria, expandiram suas áreas de florestas plantadas, estabelecendo as novas fronteiras florestais, como é o caso dos estados do Maranhão, Mato Grosso do Sul, Tocantins, dentre outros. Para estas áreas marginais torna-se ainda mais importante considerar o balanço entre estresse e adaptabilidade nos processos de seleção de material genético para plantio. Além disso, é importante considerar que a expansão para novas áreas de plantio pode implicar, potencialmente, em alteração do conjunto de doenças que são mais ou menos frequentes e importantes para a cultura (MAFIA; ABAD; FERREIRA, 2013).

Salienta-se então que, o avanço das áreas plantadas com espécies e, ou clones sem o prévio conhecimento da resistência a doenças e o plantio de extensas áreas com um mesmo clone/genótipo criam condições favoráveis à ocorrência de epidemias, cujos agentes etiológicos encontravam-se endemicamente presentes ou foram acidentalmente introduzidos nessas regiões (ALFENAS et al., 2009). Além dos fungos, principal grupo de fitopatógenos da cultura do eucalipto, fitobactérias como *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Erwinia psidii* foram relatadas como importantes agentes causais de doenças do eucalipto no Brasil (ALFENAS et al., 2009).

No momento atual do cenário florestal, o qual a eucaliptocultura atingiu um crescimento de 2,40% a.a. nos últimos cinco anos (IBÁ, 2016) cabe destacar que, preocupações como os danos causados por doenças bacterianas vem ganhando espaço no panorama florestal como consequência da perda em produtividade nos

plantios florestais e grandes níveis de mortalidade, devido a fácil disseminação e o difícil controle das mesmas.

A mancha bacteriana causada pelo complexo bacteriano *Xanthomonas* e *Pseudomonas* spp. obteve seus primeiros registros na metade da década de 90 (REIS et al., 1996) em mudas de *Eucalyptus* spp. em viveiros do Estado de São Paulo. De acordo com ALFENAS et al. (2009), em um levantamento feito entre os anos de 2003 e 2008 em doze viveiros nos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, foram perdidos cerca de 15 milhões de reais, com descartes de 11.266.819 de mudas e 553.991 minicepas.

Além do complexo bacteriano, a murcha-de-*Ralstonia*, foi reportada no Brasil pela primeira vez no início da década de 1980, no município de Prata, Minas Gerais, em plantios de *Eucalyptus grandis* (SUDO et al., 1983). Em 2005, foram estimadas as perdas de mudas e propágulos na fase de multiplicação de estacas e concluiu-se que a doença resultou em elevadas perdas econômicas em viveiros de eucalipto nos estados da Bahia, Espírito Santo, Maranhão, Minas Gerais e Pará, totalizando em um prejuízo estimado em cerca de R\$ 50 milhões de reais (ALFENAS et al., 2006).

Por fim, a seca de ponteiros do eucalipto, causada por *Erwinia psidii* (ARRIEL et al., 2014) originou-se inicialmente no Uruguai e Argentina e posteriormente no Brasil (COUTINHO et al., 2011; ARRIEL et al., 2014). Segundo BORGES JÚNIOR (2017), entre os anos de 2010 a 2016 no sul do Brasil cerca de 314 hectares de áreas com plantios de eucalipto foram afetados pela doença, com média e alta severidade, reduzindo crescimento em altura e em circunferência a altura do peito (CAP).

Portanto, percebe-se a real necessidade de serem aprofundados os estudos com relação as fitobactérias relatadas visando esclarecer a interação entre estas e os danos crescentes aos plantios florestais, pois o controle de doenças bacterianas em plantas é geralmente difícil, tornando-se praticamente impossível após o início da epidemia. Sendo assim, o estudo em questão comprometeu-se em realizar pesquisas para buscar um maior conhecimento acerca das principais bacterioses na cultura do eucalipto, bem como, o emprego de técnicas de estudos epidemiológicos auxiliando assim na tomada de decisões para minimizar as perdas.

Postulou-se então, que exista uma interação entre as principais bacterioses causadoras de danos aos plantios florestais e que esta pode ser explicada através da caracterização de isolados das mesmas, bem como, com a criação de ferramentas epidemiológicas para auxílio na tomada de decisão para controle da doença.

Com este estudo espera-se contribuir significativamente para o controle destas importantes bacterioses na cultura do eucalipto através da caracterização bioquímica, molecular e patogênica dos isolados obtidos em viveiros de produção de mudas e plantios de *Eucalyptus*, por meio de técnicas modernas de diferenciação, permitindo entender a existência da interação entre complexos bacterianos e suas possíveis consequências no manejo de doenças.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a existência da interação entre as perdas e os danos causados por *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia psidii* e *Xanthomonas axonopodis* em *Eucalyptus* spp., ou seja, tratam-se de um conjunto de bactérias promovendo os sintomas ou se estes foram causados separadamente.

Objetivos específicos

- Estabelecer uma coleção de isolados bacterianos, a serem mantidos no Laboratório de Patologia Florestal da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA)/UNESP para continuidade dos estudos.
- Comparar os isolados obtidos em diferentes culturas de mirtáceas.
- Realizar a caracterização bioquímica, molecular e patogênica das bacterioses em questão.
- Elaborar escalas para avaliação da severidade das bacterioses em viveiro e em plantios de eucalipto.
- Quantificar as perdas e danos causadas pelas doenças em nível de viveiro e plantios de eucalipto.
- Efetivar estudos de sazonalidade das bacterioses em viveiro e plantios de eucalipto.

REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Eucalyptus* e sua importância econômica

O eucalipto pertence à divisão Angiospermae, classe Dicotyledonea, ordem Myrtales, família Myrtaceae e gênero *Eucalyptus*. Esse gênero possui cerca de 700 espécies já catalogadas, quase todas nativas da Austrália (PIRES et al., 2014). Apenas duas espécies possuem o centro de origem fora da Austrália, o *Eucalyptus urophylla*, que ocorre na Indonésia e o *Eucalyptus deglupta*, que ocorre na Indonésia e em Papua Nova Guiné. Porém, embora possua uma ampla variedade de espécies, os plantios de eucalipto são estabelecidos exclusivamente com algumas poucas espécies, devido ao seu alto desempenho em produtividade.

A inserção do gênero no Brasil foi inicialmente apoiada por incentivos fiscais ao reflorestamento, bem como, através dos programas nacionais de siderurgia e as indústrias de celulose e papel. Além das funções produtivas, os plantios florestais diminuem a pressão sobre florestas nativas, promovem o reaproveitamento de terras degradadas, atuam no sequestro de carbono e na proteção do solo e da água. Os híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (“*urograndis*”) são destaques em produtividade e em matéria-prima no país desde a década de 1980 (FONSECA et al., 2010).

Diante do crescente aumento em produtividade, cuja média chega a 39 m³/ha.ano, o Brasil passou a ser mundialmente conhecido no setor de florestas plantadas de eucalipto (IBÁ, 2017). Esses altos índices têm como responsáveis as condições de clima e solo favoráveis para a cultura no país. Além disso, são resultados dos investimentos contínuos das empresas do setor no país, priorizando a manutenção em pesquisa e desenvolvimento, buscando primordialmente a melhoria genética dos materiais plantados e das técnicas de manejo florestal (IBÁ, 2016). Diante disso, nas últimas quatro décadas a produtividade desta espécie saltou de 15 m³/ha.ano para 39 m³/ha.ano. Além disso, a área de plantio foi triplicada e a espécie introduzida em diferentes regiões edafoclimáticas do Brasil (FAO, 2000).

Dentre as diversas áreas de pesquisa utilizadas para a obtenção do aumento da produtividade em plantios de eucalipto, seleção de características de elite para a produção da matéria-prima, homogeneidade de plantio e principalmente resistência à doenças, destaca-se o melhoramento genético. No caso do critério de resistência à

doenças, atua na busca por clones pelo menos tolerantes às doenças, não afetando a alta produtividade destes e a finalidade do plantio (RESENDE et al., 2014). Por isso, empresas do setor florestal têm buscado através de programas de melhoramento genético, reduzir as perdas de produção e atender a demanda do mercado de papel e celulose, podendo citar assim busca por genes de resistência à doenças (ZAMPROGNO et al., 2008).

A importância da qualidade na implantação florestal

A produção de mudas de *Eucalyptus* spp. é, em sua grande maioria, estabelecida através de clones altamente produtivos, propagados vegetativamente por miniestaquia em viveiros florestais. A técnica consiste em multiplicar assexuadamente partes da planta que podem ser células, tecidos, órgãos ou propágulos, de modo a gerar indivíduos geneticamente idênticos à planta mãe. A importância dessa pode ser confirmada quando se verifica que, hoje, a maioria das florestas plantadas é oriunda de mudas produzidas por propagação vegetativa (FERRARI, 2004).

A formação de uma floresta de alta produtividade é totalmente dependente, no meio do ciclo, da qualidade das mudas plantadas, que deverão resistir a diversos intempéries e apresentar alta taxa de sobrevivência em campo (GONÇALVES, 2014). Para a produção de mudas de eucalipto essa qualidade pode ser expressa através de parâmetros como altura da muda, diâmetro de colo, sistema radicular bem desenvolvido, haste rígida, ausência de deficiência nutricional evidente e ser livre de danos mecânicos ou físicos (PIRES et al., 2014). Outro aspecto importante é o fitossanitário, ou seja, mudas livres de pragas e doenças, uma vez que existe a possibilidade de ocorrência de agentes causais de doenças ao longo de todas as etapas do processo produtivo de mudas florestais, comprometendo o sucesso do plantio (GONÇALVES, 2014).

O viveiro de produção de mudas de *Eucalyptus* spp. possui diversas características e condições ambientes que, associadas à fisiologia do hospedeiro auxiliam no surgimento e desenvolvimento de agentes patogênicos bióticos. Dentre elas, as doenças causadas por agentes causais fúngicos, como: *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Cylindrocladium* spp., *Puccinia psidii*, *Oidium eucalypti*, dentre outros. Ademais, as doenças causadas por bactérias, como as manchas foliares causadas

por *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp., murchas vasculares bacterianas causadas por *Ralstonia solanacearum* e a seca de ponteiros por *Erwinia psidii* (ALFENAS et al., 2009).

O material propagativo originário de matrizes infectadas, a água de irrigação e a areia utilizada no canaletão dos minijardins são possíveis fontes de inóculo de doenças em viveiros, se contaminados previamente, além de instrumentos de podas e substrato não esterilizados (ALFENAS et al., 2006). Por isso, as medidas fitossanitárias neste ambiente como forma de controle são imprescindíveis para que as mudas possam atingir o aspecto fitossanitário adequado para o plantio em campo.

O controle das doenças neste ambiente é importante pois, além de ser o berço para a formação de florestas, é um ambiente de maior facilidade de controle do que no campo. Após a introdução do patógeno em áreas de florestas plantadas esses causam prejuízos, como a perda de produtividade e a necessidade de limpeza clonal para a desinfecção patogênica.

Bactérias patogênicas na cultura do eucalipto

Na década de 1990 foram relatadas as primeiras doenças causadas por bactérias na cultura do eucalipto. Assim, os sintomas de manchas foliares em mudas foram atribuídas à *Pseudomonas cichorri* e *Xanthomonas campestris* (GONÇALVES, 2014). Recentemente, o surgimento de novas doenças do eucalipto tem se tornado mais frequentes, em parte como resultado da expansão das atividades florestais para novas áreas, incluindo sítios marginais, pelo uso de novas espécies de eucalipto e combinações híbridas, bem como, por alterações já perceptíveis do clima de modo geral (MAFIA; ABAD; FERREIRA, 2013).

Nos últimos oito anos, quatro novos fatores bióticos e abióticos foram detectados ou ganharam importância para a cultura. Destas, podemos citar a murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (ALFENAS et al., 2006), a desfolha causada por espécies de *Mycosphaerella* e *Teratosphaeria* (TEODORO et al., 2012), o distúrbio fisiológico do eucalipto, atribuído a fatores abióticos e mais recentemente, a seca dos ponteiros causada por bactérias em viveiros e plantios atribuídas a *Erwinia psidii* (MAFIA; ABAD; FERREIRA, 2013).

As bactérias são importantes patógenos tanto pela gravidade das enfermidades que causam, quanto pela facilidade com que se disseminam aliado ao seu difícil controle. São, em sua grande maioria, advindos por microrganismos fitopatogênicos que, na ausência da planta hospedeira podem sobreviver como saprófitos no solo e ou nos restos culturais, eventualmente podendo causar doença, dependendo de sua capacidade patogênica e da suscetibilidade do hospedeiro (ALFENAS, 2016).

A disseminação desse patógeno podem ocorrer através de mudas contaminadas, aparentemente sadias produzidas em viveiros, que ao serem levadas para áreas de plantio proporcionam condições de temperatura e umidade adequadas para a multiplicação do patógeno, podendo assim trazer danos significativos ao desenvolvimento da floresta. Por isso, para muitos autores, a doença bacteriana é comparada a uma bomba relógio de efeito retardado, uma vez que de maneira silenciosa a mesma pode ocorrer, dependendo apenas de condições favoráveis.

Além de levar a diminuição do crescimento e da produtividade, a madeira de árvores infectadas pode apresentar maior teor de extrativos e de lignina, o que requer uma maior concentração de produtos químicos para o cozimento e o branqueamento da polpa celulósica, resultando em menor rendimento de celulose (ALFENAS, 2016). Por isso, reforça-se a necessidade em caracterizar as doenças bacterianas, bem como, os complexos formados e elucidar as causas, auxiliando assim nas formas de controle destas doenças.

Mancha bacteriana causada por *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas* spp. em *Eucalyptus* spp.

A mancha bacteriana causada por *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas* spp. pode incidir tanto em mudas quanto em plantios de eucalipto e provocam danos significativos em materiais genéticos suscetíveis que estejam sob condições favoráveis à infecção, como temperatura e umidade relativa. Nos viveiros de produção de mudas, observa-se que a maior incidência da doença ocorre no período mais quente e úmido do ano, nos meses de outubro a abril (FURTADO et al., 2009). Segundo NEVES (2007), a faixa ótima de temperatura para o desenvolvimento da doença, varia entre 26 e 30°C. As espécies mais suscetíveis são: *E. urophylla*, *E. globulus*, *E. robusta*, *E. maidenii*, *E. pellita*, *E. saligna*, *E. viminalis* e *E. cloeziana*.

(ALFENAS et al., 2009). Também tem sido relatada a ocorrência da doença no híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* (SANTOS et al., 2010).

Os sintomas iniciais são lesões encharcadas, também chamadas de anasarcas, internervurais, angulares, concentradas tanto na nervura principal quanto nas margens da folha ou distribuídas aleatoriamente no limbo (ALFENAS et al., 2009). Com a progressão da doença as lesões tornam-se ressecadas e de coloração palha a marrom clara, podendo conter orifícios no centro da lesão ou áreas recortadas do limbo em consequência do aborto da área necrosada (NEVES, 2007).

A doença leva a diminuição da área fotossintética, prejudicando o desenvolvimento da planta e a redução do crescimento, principalmente em viveiros, onde as mudas ficam debilitadas, tornando-se inaptas para o plantio em campo (ALFENAS et al., 2009). A presença de água livre na folha é fundamental para a movimentação de bactérias fitopatogênicas em seus hospedeiros, tendo em vista que sua porta de entrada são as aberturas naturais ou ferimentos pré-existent na planta (NEVES, 2007). Por isso, a doença bacteriana incide intensamente em mudas irrigadas por aspersão, cuja lâmina d'água sobre a folha favorece a multiplicação, dispersão e a penetração das bactérias.

Segundo ROMEIRO (2011) o ideal é a erradicação das plantas doentes e até mesmo não plantar a mesma espécie no mesmo local onde houve a infecção. Portanto, a solução ideal é prevenir a cultura do surgimento e a disseminação das bactérias no eucalipto. As práticas de manejo fitossanitário são o foco principal para o controle da mancha bacteriana no eucalipto, as quais priorizam a redução das fontes de inóculo e das condições favoráveis à infecção. Dentre tais práticas estão a eliminação de folhas e plantas doentes, uso de irrigação por gotejamento, propagação de clones suscetíveis em épocas desfavoráveis à infecção e o uso de material propagativo e ferramentas de poda livres de patógenos. Procedimentos como desinfecção com água quente (80°C por 1 minuto) de tesouras de poda e recipientes reutilizados no viveiro evitam a disseminação da bactéria (ALFENAS et al., 2009).

Murcha vascular bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* em *Eucalyptus* spp.

A bactéria *Ralstonia solanacearum*, agente causal de murcha vascular em eucalipto, foi descrita pela primeira vez como *Bacillus solanacearum*. Atualmente, é

uma das fitobactérias mais importantes do mundo, capaz de causar doença em mais de 450 espécies de plantas de diferentes famílias botânicas. É uma bactéria gram-negativa, aeróbica, bastonetiforme, habitante do solo, com um ou mais flagelos polares, pertencente à subdivisão β -proteobacteria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae (EUZÉBY, 2009).

No caso da eucaliptocultura, a murcha vascular é uma doença com alto potencial de causar danos à cultura, sobretudo por se tratar de um patógeno cosmopolita, extremamente variável, vascular e que se associa ao sistema radicular de várias plantas cultivadas e daninhas, em regiões tropicais e subtropicais (LOPES; TAKATSU; 1997). A murcha-de-*Ralstonia* pode ocorrer tanto em mudas quanto em árvores plantadas. No viveiro, a patogenicidade é representada por sintomas principalmente em minijardim clonal, apresentando necrose foliar, escurecimento anelar ou completo do lenho, murcha e morte de minicepas. Na fase de enraizamento, as miniestacas infectadas podem apresentar arroxamento das nervuras do limbo foliar e podridão desses (ALFENAS et al., 2009).

No campo, o sintoma típico da bacteriose é a murcha de cima para baixo, que ocorre quando o clone é suscetível e o ambiente apresenta altas temperatura e umidade relativa, pois tais fatores proporcionam a multiplicação bacteriana, produzindo exsudatos viscosos que auxiliarão diretamente na transmissão da doença entre plantas. Além disso, a doença caracteriza-se por bronzeamento e necrose foliar, desfolha basal, ascendente escurecimento interno do lenho e morte da planta, geralmente a partir do quarto mês após o transplântio (ALFENAS et al., 2009).

A murcha típica causada pela doença normalmente inicia nas folha mais novas, principalmente nas horas mais quentes do dia. Com isso, ao passar do tempo a murcha se torna irreversível e a planta morre. As enzimas produzidas pela bactéria levam ao escurecimento dos vasos, o que pode ser percebido pelo corte longitudinal do caule, na parte inferior das plantas afetadas. A formação de raízes adventícias também pode ser observada no coleto, sendo uma reação da planta a falta de água suficiente para mantê-la túrgida (GONÇALVES, 2014).

Seca de ponteiros causada por *Erwinia psidii* em *Eucalyptus* spp.

Sendo *Erwinia psidii* uma bactéria fitopatogênica pertencente à família Enterobacteriaceae, *Erwinia psidii* apresenta flagelos peritríquios e coloração esbranquiçada em meio de cultura nutriente ágar (RODRIGUES NETO et al., 1987). Foi descrita pela primeira vez causando sintomas de queima de ponteiros em plantios de goiaba (*Psidium guava* L.), no Estado de São Paulo (RODRIGUES et al., 1987), Espírito Santo, Distrito Federal e Paraná (USEGUI et al., 2001). Atualmente é um dos patógenos mais importantes que afetam a cultura da goiaba no Brasil (TEIXEIRA et al., 2009). Na eucaliptocultura, foi identificado como causador da seca de ponteiros no Uruguai e Argentina (COUTINHO et al., 2011) e, posteriormente, no Brasil (ARRIEL et al., 2014).

No Brasil, a doença em *Eucalyptus* spp. foi primeiramente constatada em Lençóis Paulista, no estado de São Paulo e, posteriormente, em Guaíba e Rosário do Sul, no Rio Grande do Sul, em plantios clonais de híbridos de *E. urophylla* x *E. grandis* e em plantios seminais de *E. grandis* e *E. dunii* (ARRIEL et al., 2014). A incidência da bactéria na cultura depende de condições ambientais favoráveis para a transmissão da doença, bem como, determinados locais e épocas do ano e pode ocorrer em quase 100% das plantas, secando as árvores de cima para baixo, além de levar à perda da dominância apical e possível redução do crescimento, causando assim prejuízos nos plantios.

Os principais sintomas de incidência da doença em eucaliptos são as lesões necróticas em folhas recém-formadas e exsudação de pus bacteriano. Porém, o sintoma típico da doença é a morte dos ponteiros, com consequente quebra da dominância apical e surgimento de brotações laterais, afetando assim o crescimento da planta (COUTINHO et al., 2011). Em folhas jovens, é possível observar o arroxamento da nervura principal, bem como, a descoloração do xilema ao ser feita a secção do caule da planta.

Além de incitar a seca dos ponteiros, *E. psidii* pode causar a morte descendente, o “die back”, em plantas de eucalipto culminando na morte de árvores no campo (ARRIEL et al., 2014). Nesse caso, é comum observar amarelecimento das folhas e desfolha do ápice para a base. A partir de seções transversais do caule, observa-se escurecimento dos tecidos internos do lenho resultante da infecção e, após

alguns minutos de realização do corte, pode ser observado exsudação macroscópica de pus (ARRIEL et al., 2014).

A caracterização como método de diagnose precisa

Para as doenças bióticas, uma diagnose completa e inequívoca demanda observar uma associação constante e uma relação de causa e efeito entre patógeno e os sintomas expressos. Para as doenças mais conhecidas, a observação dos sintomas e em, alguns casos, dos sinais dos patógenos, já é suficiente para realizar a identificação do agente causal. Por outro lado, no caso de doenças novas ou pouco conhecidas, bem como, nas doenças bacterianas os quais muitos dos sintomas e sinais se assemelham, torna-se necessário realizar uma série de procedimentos para comprovação da etiologia. Nesses casos, recursos laboratoriais e maior dispêndio de tempo são necessários para completar a diagnose (MAFIA; ABAD; FERREIRA, 2013).

Por isso são realizados testes bioquímicos, patogênicos e moleculares para identificar e caracterizar isolados bacterianos e diferencia-los uns dos outros. A caracterização bioquímica permitirá então que seja possível identificar à nível de grupo bacteriano o patógeno em questão através de testes de gram, bem como, para diferenciação por tipo bacteriano, hipersensibilidade, produção de carboidratos, dentre outros. Tais testes vão separar as bactérias de acordo com suas características bioquímicas, facilitando também no encontro das medidas de controle.

No caso do teste de patogenicidade, os isolados são submetidos ao postulado de Koch em patologia de plantas, para confirmação da patogenicidade dos isolados através do isolamento do patógeno em plantas infectadas e a inoculação deste em mudas sadias de *Eucalyptus* spp. No caso dessas apresentarem os mesmos sintomas da doença, confirma-se então a patogenicidade do isolado, ou seja, sua capacidade em causar doença na espécie. Por fim, a caracterização molecular permitirá a resposta à nível de gênero e espécie do patógeno causador da doença, ou seja, a específica identificação do mesmo com base na amplificação de regiões de interesse do DNA do mesmo através de ferramentas de engenharia genética.

O uso das análises epidemiológicas no manejo de doenças bióticas

A expansão das florestas de eucalipto vem se tornando cada vez mais recorrentes para as fronteiras florestais do país, cujas condições ambientais são favoráveis à infecção patogênica, causando epidemias e consequentes prejuízos em mudas e árvores no campo. Dentre essas, destacam-se as causadas devido à contaminação bacteriana, por se tratarem de patógenos de fácil disseminação e difícil controle. Dependendo da doença, as perdas podem atingir milhões de dólares em poucos anos (ALFENAS et al., 2009). Por isso, a estimativa das perdas e consequentes prejuízos são fundamentais para a avaliação da necessidade da implementação de medidas de controle, baseadas em dados reais do comportamento do patógeno.

No caso da ocorrência de uma epidemia de doença em plantas existe a necessidade contínua de se avaliarem as condições favoráveis envolvidas no processo, tais como uma população de plantas suscetíveis, grande quantidade do inóculo do patógeno virulento e ambiente favorável e duradouro (VALE & ZAMBOLIM, 1996). Existe essa necessidade de se estudarem todos os fatores de forma conjunta pois todos estão inter-relacionados (TUMURA, 2015).

O ambiente é o agregado de todas as condições externas afetando a vida e o desenvolvimento de um organismo, podendo interferir tanto no hospedeiro quanto no patógeno. A maioria das bactérias patogênicas necessitam de altos níveis de molhamento para infectar o hospedeiro, sendo que alguns exigem a presença de água livre na superfície do hospedeiro (VALE & ZAMBOLIM, 1996). A temperatura constitui a variável do ambiente de maior correlação com a incidência e a severidade das doenças de plantas, uma vez que pode ter um efeito importante em cada componente do patossistema.

Todos os processos do ciclo de relação patógeno-hospedeiro são afetados pelos fatores meteorológicos, principalmente pela temperatura e a umidade relativa do ar (TAKAHASHI, 2002). O fator temperatura pode afetar o hospedeiro, o patógeno ou a interação entre eles pois para a maioria das doenças as temperaturas favoráveis para o crescimento do hospedeiro são também favoráveis para o crescimento de muitos patógenos. Assim, os estudos epidemiológicos são de extrema importância pois requerem métodos padronizados para avaliação da severidade das doenças,

visto que a quantificação da intensidade e da severidade é considerada uma das fases mais importantes no manejo de doenças de plantas (TAKAHASHI, 2002).

Quantificação de doenças de plantas: a fitopatometria como ferramenta na tomada de decisão

A quantificação de doenças de plantas, também conhecida como fitopatometria, visa avaliar os sintomas causados por agentes patogênicos nas plantas e seus sinais (TUMURA, 2015). A incidência, expressa a porcentagem ou proporção do número total de unidades avaliadas como, por exemplo, a porcentagem de plantas, folhas ou frutos doentes em relação a unidade amostral. No caso da severidade, expressa a área do tecido vegetal afetada pela doença em termos de porcentagem ou proporção (JULLIANTE & SANTOS, 1999). O principal foco da quantificação dos danos das doenças é avaliar a importância dessa; determinar danos e perdas de rendimento; definir medidas de controle e manejo; estudar a progressão da doença e avaliar a resistência de genótipos aos patógenos, auxiliando assim os programas de melhoramento genético.

Essas variáveis podem ser obtidas através de métodos de parcela experimental ou através da análise individual de plantas, geralmente exibindo diferentes níveis de doença, utilizando-se de escalas de avaliação (VALE & ZAMBOLIM, 1996). Destacam-se as escalas diagramáticas, representações ilustradas de uma série de plantas, folhas ou partes de plantas com sintomas em diferentes níveis de severidade (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 1996). Essas devem ser de fácil uso e de larga aplicação, além de possuir intervalo suficiente para representar todos os estágios de desenvolvimento da doença e permitir uma avaliação imediata (VALE & ZAMBOLIM, 1996)

Análise espaço-temporal de doenças de plantas

Segundo GILLIGAN (1983) o padrão espacial da doença de plantas é o arranjo ou posicionamento das plantas doentes, umas em relação às outras. Por isso, em um estudo de padrão espacial é importante a localização das plantas infectadas, em uma determinada área. A principal razão para o estudo de padrões espaciais de doenças é que este expressa o processo de dispersão do patógeno (HUGHES et al., 1997),

bem como, possibilitam o entendimento da forma como ocorre a contaminação do hospedeiro, o que pode resultar em padrões distintos, para fungos e bactérias. Dentre os possíveis padrões de dispersão estão o padrão espacial aleatório e o de dispersão agregado.

O padrão espacial aleatório ou ao acaso é relacionado a patógenos dispersos pelo vento e possui características de independência sobre as plantas, o que faz com que todas as plantas tenham oportunidades iguais de infecção e a ocorrência da doença não é influenciada pela distância da fonte de inóculo (MADDEN et al., 1995). O padrão de dispersão agregado indica uma dispersão do patógeno que costuma ser disseminado por respingos de chuva em plantas com ferimentos ou em períodos de abertura de estômatos. Neste padrão, os patógenos têm diferentes oportunidades de infecção e a ocorrência da doença é influenciada pela distância até a fonte de inóculo. Além disso, nesse tipo de padrão também há uma correlação entre as plantas sintomáticas dentro da área, havendo uma probabilidade elevada de que plantas doentes estejam próximas umas das outras (MADDEN et al., 1995).

No caso da análise temporal de doenças avalia a evolução da interação entre os componentes do patossistema, estabelecida por dados acumulados de incidência e severidade e retratada pela curva de progresso da doença (VANDERPLANK, 1963). Curvas de progresso de doença expressam a proporção de doença no tempo e podem caracterizar, a época de início da epidemia, a quantidade de inóculo inicial, a taxa de desenvolvimento da doença, as quantidades máximas e final de doença e a duração da epidemia (BERGAMIN FILHO et al., 1995).

Para o estudo do progresso de doenças, tem-se usado modelos empíricos, dos quais descrevem a relação entre duas ou mais variáveis. Os principais modelos empíricos utilizados são: exponencial, logístico e de Gompertz, que têm em comum a proporcionalidade entre a velocidade do progresso ou o aumento da doença e a intensidade (VALE et al., 2004).

CAPÍTULO 1 - NECROSE APICAL E SECA BACTERIANA DOS PONTEIROS DO EUCALIPTO: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PATOGÊNICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Autores: Daniella Flávia Said Heid Schettini Silva, Helena Farsoni, Celso Luis Marino, Luis Otávio Saggion Berian e Edson Luiz Furtado

RESUMO

O gênero *Eucalyptus* tornou-se de ampla utilização no Brasil, devido a sua alta produtividade, matéria-prima para diversas finalidades, bem como, capacidade de adaptação em diversas condições edafoclimáticas. Porém, dentre os fatores que interferem diretamente no desenvolvimento desse estão as doenças bióticas, divididas em fungicas ou bacterianas. As doenças causadas por bactérias, nos últimos anos, ganham destaque devido aos danos e perdas que causam em viveiros e plantios florestais advindos de eucalipto. Os principais agentes causais já descritos são o complexo bacteriano formado por *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas* spp., bem como, a murcha vascular causada por *Ralstonia solanacearum* e a bacteriose causadora da seca de ponteiros e necrose apical em mudas e árvores de eucalipto. O objetivo do trabalho foi realizar a diferenciação entre essas. O estudo foi dividido em três partes, o isolamento e a obtenção de isolados bacterianos, caracterização bioquímica e caracterização patogênica. Diante das metodologias utilizadas, foram obtidos quarenta e dois isolados bacterianos, distribuídos em dezesseis amostras de plantios de eucalipto e vinte e seis amostras de minicepas e mudas em viveiro de produção. Posteriormente, com a realização da caracterização bioquímica, observou-se que a maioria dos isolados eram do grupo das enterobactérias e a patogenicidade desses foi confirmada utilizando-se do Postulado de Koch, com a reprodução dos sintomas da necrose apical e seca bacteriana dos ponteiros de eucalipto em mudas sadias de clone suscetível a doença.

Palavras-chave: Isolamento. Reativação. Grupos bacterianos. Postulado de Koch. Bactérias fitopatogênicas.

ABSTRACT

The genus *Eucalyptus* is widely used in Brazil due to its high productivity and adaptability in various edaphoclimatic conditions. However, among the factors that directly interfere with its development are biotic diseases, divided into fungal or bacterial. Bacterial diseases in recent years have gained prominence due to the damage and losses they cause to eucalyptus nurseries and plantations. The main causal agents already described are the bacterial complex composed of *Pseudomonas* spp. and *Xanthomonas* spp., the vascular wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and the die back caused by a bacteriosis. Therefore, the objective of the work was to differentiate between these bacteriosis. The study was divided into three parts, isolation and obtaining bacterial isolates, biochemical and pathogenic characterization. Forty-two bacterial isolates were obtained, distributed in sixteen samples of eucalyptus plantations and twenty six samples of miniceps and seedlings in production nursery. Subsequently, with the biochemical characterization, it was observed that most of the isolates were from the group of enterobacteria and their pathogenicity was confirmed using the Koch Postulate, with the die back symptoms reproduction in healthy seedlings of disease susceptible clone.

Keywords: Isolation. Reactivation. Bacterial Groups. Koch Postulate. Phytopathogenic bacterium.

1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os principais produtores de celulose, papel e painéis de madeira no mundo advindos de eucalipto como matéria-prima. O país é referência por sua atuação pautada pela sustentabilidade, competitividade e inovação (IBÁ, 2016). Diante da relevância do gênero para a indústria florestal brasileira, a compreensão dos fatores que afetam a produção e a qualidade desse se tornam cada vez importante. Dentre esses, as perdas causadas por doenças bióticas, principalmente os fungos e bactérias fitopatogênicas, os quais ao serem introduzidos na cultura podem afetar o crescimento e a produtividade, provocando até a morte de mudas e árvores de *Eucalyptus* spp.

Destacam-se dentre as bacterioses já descritas para a eucaliptocultura, *Ralstonia solanacearum*, causadora de murcha vascular e o complexo formado por *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas* spp., causador de mancha foliar. Tais doenças foram capazes de causar a morte de diversas árvores plantadas, bem como, consequentes prejuízos aos viveiros de produção de mudas de *Eucalyptus* spp. devido ao fato de serem patógenos de eficiente disseminação e difícil controle. Segundo ARRIEL et al. (2014), além dessas bacterioses, os sintomas de seca de ponteiros de árvores de eucalipto, bem como, o arroxamento da nervura principal das folhas de mudas e árvores já formadas foram atribuídos a *Erwinia psidii*, por serem sintomas semelhantes aos encontrados em goiabeiras, relatados pela primeira vez em 1987 (RODRIGUES NETO et al., 1987).

Nos últimos anos observa-se a crescente importância dos patógenos bacterianos na cultura, pois muitos sintomas marcadores destas doenças se assemelham. Um exemplo é arroxamento da nervura da folha presente tanto em estacas submetidas ao enraizamento e sob ataque de *Ralstonia solanacearum* em casa de vegetação, bem como, em minicepas atacadas por *Erwinia psidii*. A obtenção de isolados em culturas puras para futuros estudos de identificação do patógeno são fundamentais, auxiliando assim na caracterização destes microrganismos fitopatogênicos, o que ao final auxiliará na diagnose correta e na tomada de decisão para medidas de controle e ou manejo das doenças.

Dentre os métodos de caracterização, é empregada a caracterização bioquímica para distinguir grupos bacterianos e separá-los conforme as características encontradas. Esse método permite distinguir grupos bacterianos

diferentes de acordo com suas principais características, diferenciando-as quanto ao tipo de respiração – anaeróbica ou não, a capacidade de causarem reação de hipersensibilidade em *Nicotiana tabacum* (fumo) ou até mesmo a produção de enzimas específicas, como a catalase e a fosfatase, dentre outras. Tal processo também auxilia na busca por medidas de controle e manejo de doenças.

Além de separar os isolados em grupos descritos na literatura, faz-se necessário comprovar a patogenicidade dos mesmos em materiais sadios. Segundo o postulado de Koch (AGRIOS, 2005) como forma de comprovação da patogenicidade de um isolado, é necessário constatar a presença do microrganismo nas lesões das plantas doentes, formando assim uma associação constante entre o patógeno e a planta. Na situação da bacteriose estudada no presente trabalho, tal sintoma pode ser descrito como a seca de ponteiros das mudas e árvores, bem como, o arroxamento da nervura principal das folhas e posteriormente necrose dos tecidos adjacentes à nervura.

Para validar o postulado, o microrganismo deve então ser isolado, cultivado em meio de cultura e a cultura pura inoculada em plantas sadias, em busca da reprodução dos mesmos sintomas da doença. Ao ser reisolado da planta inoculada artificialmente o mesmo deve corresponder, em todas as suas características com o isolado inicialmente obtido das lesões do material doente em campo, efetivando assim as regras de patogenicidade para o patógeno em estudo.

Portanto, diante da relevância dos patógenos bacterianos causadores de doença em *Eucalyptus* spp. e sua capacidade em formas complexos, faz-se necessário a obtenção de isolados em condições puras para estudos de identificação do agente causador, através da caracterização bioquímica e patogênica dos inóculos obtidos, o que constitui o objetivo do presente estudo.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Com o objetivo de elucidar e descrever a metodologia das etapas do primeiro capítulo deste estudo, o mesmo será dividido em três etapas, que serão descritas a seguir:

1.2.1 Obtenção dos inóculos e construção da biblioteca de isolados bacterianos

1.2.1.1 Levantamento da área e coleta de materiais infectados

Durante o período de novembro de 2017 a janeiro de 2018 foram efetivadas diversas coletas em áreas com materiais genéticos de eucalipto com sintomas de seca de ponteiros. O levantamento inicial ocorreu em um viveiro de produção de mudas clonais de *Eucalyptus* spp. localizado na cidade de Andradina, no interior de São Paulo. Foram feitas análises visuais da presença de sintomas principais da doença em questão, como o arroxamento da nervura principal de folhas jovens tanto de minicepas quanto em mudas de *Eucalyptus* spp. produzidas, bem como, a seca do ponteiro destas e posteriormente a morte do material vegetal.

Posteriormente, nos meses de janeiro a março de 2018 o mesmo processo foi realizado em áreas com até dois anos de plantio da espécie, nas cidades de Águas Claras, Inocência e Três Lagoas, no estado do Mato Grosso do Sul. Foram avaliados plantios com severidade média e alta da doença. Tanto nas áreas de campo quanto em viveiro também foram coletas amostras vegetais sem sintomas da doença, a fim de que fosse observada a presença endofítica do patógeno na planta.

Feito isso, amostras de tecido vegetal dessas áreas foram coletadas, acondicionada em sacos de papel e deixadas em baixas temperaturas, para manter a integridade das mesmas. Subsequente, foram transportadas para o Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na Fazenda Lageado, no Câmpus de Botucatu, São Paulo, para início dos procedimentos laboratoriais de obtenção dos isolados bacterianos com condições de purificação.

1.2.1.2 Isolamento do patógeno e obtenção dos isolados bacterianos

Antes de iniciar o procedimento de isolamento do material vegetal, foi feita a confirmação da origem bacteriana de algum dos materiais infectados, através do teste

de exsudação em lâminas, visualizando a corrida bacteriana em microscópio. Para realiza-lo, de posse de materiais contaminados, foram feitos pequenos cortes próximos a lesões, depositados na lâmina e colocados água destilada posteriormente. Ademais, também foram feitos testes de corrida bacteriana em copo transparente com água. Porém, nem sempre foi possível obter uma resposta positiva através dos testes, uma vez que é necessário que exista uma grande concentração bacteriana para que os mesmos sejam validados.

Para o isolamento do patógeno, optou-se então pelo isolamento indireto utilizando diversas partes das plantas com ou sem sintomas marcadores da doença, bem como, pedaços de tecidos escuros do lenho medular – sendo esse um sintoma característico encontrado nas plantas de eucalipto. Tais partes da planta foram lavadas com água e sabão e após a remoção do excesso de água com papel toalha os fragmentos seguiram o protocolo de isolamento indireto. Foram desinfetados com etanol 70% por 1 minuto, em seguida com hipoclorito de sódio 0,50% por 30 segundos. Posteriormente, tais fragmentos foram enxaguados em água destilada autoclavada por 3 minutos, para remoção do excesso de solução e deixados para secar.

Após a desinfecção e esterilização do material, o tecido foi macerado em solução de água destilada autoclavada e a suspensão replicada por plaqueamento pelo método de estrias simples em placas de Petri, de 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura Nutriente Ágar (NA) enriquecido e vertidos com fungicida Nistatina 0,50% em álcool. Ademais, as placas foram incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa BOD (demanda bioquímica de oxigênio) com fotoperíodo de 12 horas. O crescimento bacteriano pôde então ser observado após 24 a 48 horas do procedimento. Para obtenção de culturas puras, foram refeitos o processo de plaqueamento por até duas vezes.

1.2.1.3 Armazenamento, preservação e construção da biblioteca de isolados bacterianos

Após a obtenção dos isolado, esses foram armazenados de quatro formas diferentes: (a) tubos de ensaio contendo meio sólido NA e cobertos com óleo mineral estéril (DYE, 1968); (b) tubo de ensaio com água destilada estéril e suspensão bacteriana a 3×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC); (c) micro túbulo de 1,5

mL com glicerol e estocados a -20°C; e (d) micro túbulo de 1,5 mL com água ultrapura e massa bacteriana.

Desse modo, todos os materiais obtidos nos levantamentos de campo e viveiro que tiveram crescimento bacteriano aparente foram devidamente inventariados, bem como, cadastradas em uma biblioteca de isolados bacterianos para continuidade do estudo em questão. Por fim, de dois em dois meses as amostras armazenadas foram reativadas.

1.2.2 Caracterização bioquímica dos isolados em grupos bacterianos

Os testes bioquímicos foram realizados conforme a metodologia sugerida por MARQUES et al. (2002), com o propósito de realiza-los para identificação de grupos bacterianos. A lista de testes permite diferenciar as enterobactérias dentre as demais fitopatogênicas. Para tal, os inóculos depositados na biblioteca de isolados do Laboratório de Patologia Florestal da UNESP/Botucatu foram reativados e submetidos aos seguintes testes: (a) Gram de Ryu ou também chamado de teste de hidróxido de potássio (KOH); (b) oxidação e fermentação (O/F) ou crescimento anaeróbico; (c) hipersensibilidade (HR) em folhas de *Nicotiana tabacum*; (d) produção de enzima pectinolítica; (e) ativação de fosfatase redutora; (f) produção de enzima catalase; (g) produção de ácidos a partir de carboidratos e (h) redução de nitrato (NO_3^-) em nitrito (NO_2^-). Os testes foram todos conduzidos e as soluções preparadas segundo proposto por SCHAAD (2001).

1.2.2.1 Teste de Gram de Ryu ou teste de hidróxido de potássio (KOH)

Esta análise permitiu diferenciar as bactérias Gram-negativas das Gram-positivas. Para tal, utilizou-se o reagente hidróxido de potássio (3% aq.; p/v) que, com o auxílio de uma pipeta *Pauster* limpa e esterilizada, foram adicionadas gotas do reagente sobre uma lâmina de microscopia. Feito isso, foram removidas pequenas porções da colônia bacteriana de cada um dos isolados, separadamente, misturando-as com a solução até ser obtido uma suspensão homogênea do material.

A solução formada por colônias bacterianas adicionadas ao hidróxido de potássio, por se tratar de uma solução alcalina, pode promover a lise da parede celular no caso das bactérias Gram-negativas, formando um muco contínuo quando se retira

as amostras desta solução com o uso da alça de platina. No caso das bactérias Gram-positivas cuja parede é permeável devido à grossa camada de peptidoglicanos (SUSLOW et al., 1982) não ocorre a lisa e nem a formação do muco bacteriano.

1.2.2.2 Teste de Oxidação e Fermentação (O/F) ou de crescimento anaeróbico

Segundo HUGH & LEIFSON (1953) o teste realiza a separação das bactérias pela característica de tipo respiratório, podendo estas serem facultativas (fermentativas - OF), anaeróbicas restritas (F) ou aeróbicas restritas (oxidativas). Tal parte da caracterização bioquímica é importante pois permite distinguir o gênero *Erwinia*, que é uma bactéria anaeróbica facultativa (OF), das bactérias Gram-negativas aeróbicas (O), como as pertencentes aos gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (ROMEIRO, 2005).

Para isso, utilizou-se do meio de cultura com a junção dos reagentes dextrose, extrato de levedura, peptona e água destilada, além do indicador de pH azul de bromotimol a 1%. Ademais, foi feito o ajuste do pH a 7, deixando a coloração verde ao indicador com água. Após o ajuste, toda a mistura foi transferida para tubos de ensaio, com 5 a 10 mL do meio de cultura por recipiente e, após a solidificação do meio introduziu-se no tubo com o auxílio de uma alça de *Drigalski* colônias de cada um dos isolados, separadamente.

Após a introdução das colônias bacterianas, em um dos tubos houve a deposição de óleo mineral autoclavado 5 a 10 mm acima do meio e em outro tubo, com a mesma bactéria, não foi realizado este procedimento. Por fim, foi feita a incubação do material a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa BOD por 24 horas, possibilitando assim a resposta do teste após o processo. Após o procedimento de incubação, as bactérias que tiveram a capacidade de mudar a coloração do meio de cultura do verde para o amarelo, ou seja, diminuir o pH do mesmo e de crescer em ambos os tubos (com ou sem óleo mineral) foram classificadas bactérias anaeróbicas facultativas (OF).

1.2.2.3 Teste de hipersensibilidade (HR) em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum*)

Segundo LOZANO & SEQUEIRA (1970) o teste consiste na infiltração de células bacterianas em uma folha de planta não hospedeira da doença, que na maioria dos casos é feita com folhas de fumo (*Nicotiana tabacum*). Por tanto, para a realização do mesmo foram utilizadas suspensões bacterianas formadas a partir de culturas ultrapuras de crescimento de colônias de bactérias obtidas e colocadas em tubos de ensaio com água destilada estéril à concentração de 3×10^8 UFC. Após isso, a suspensão de cada um dos isolados separadamente foi infiltrada sob a epiderme da folha no espaço internerval da face inferior da folha de fumo, por meio de uma seringa hipodérmica de 5 mL e incubado por até 24 horas para a observação de lesões de defesa na folha da planta.

Após o período, foi observado se houve ou não a hipersensibilidade, que dependendo do isolado pode ser positiva ou negativa. A lesão formada ou não é uma reação da planta devido à infecção por fitobactérias não compatíveis, onde acontece quando a bactéria entra em contato com os tecidos dos hospedeiros e após 24 horas ocorre a morte das células ao redor do sítio de infecção, resultando no dessecamento da área necrosada (ROMEIRO, 2005). Caso a lesão fosse formada, indicaria hipersensibilidade positiva da planta ao isolado.

1.2.2.4 Teste de produção de enzima pectinolítica

A avaliação do teste permite identificar se os isolados bacterianos possuem ou não a capacidade de produzir enzima pectinolítica capaz de romper e quebrar a lamela média do fruto de pimentão (*Capsicum annuum* Group) e causar danos para o mesmo, como a podridão desse. Assim, para a realização do teste inicialmente foram reativados os isolados bacterianos.

Após o crescimento das colônias foi feita a raspagem com a utilização de um palito de madeira esterilizado de cada colônia bacteriana e inserido em um pimentão, deixando o material à temperatura ambiente em um recipiente a vácuo. Aguardou-se então o período de 24 horas para o surgimento dos sintomas de podridão do fruto. Para aqueles isolados em que houve a podridão, confirmou-se a capacidade dos isolados em produzir a enzima pectinolítica e causar danos.

1.2.2.5 Teste de ativação de fosfatase redutora

Segundo SCHAAD (2001) o teste mede a capacidade do microrganismo de produzir enzima fosfatase suficiente para quebrar a cadeia do difosfato de fenolftaleína. Para realizá-lo inicialmente foi fundido o meio de cultura nutriente ágar (NA) com Nistatina 0,50% em álcool e adicionado uma solução previamente esterilizada de fenolftaleína a 5% e distribuídos em placas de Petri.

Após a inoculação dos isolados e a incubação dos mesmos a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa BOD por 24 horas, todas essas foram expostas ao vapor de hidróxido de amônia (NH_3OH), pela adição de algumas gotas do mesmo em papel filtro e colocados por dentro da tampa da placa de Petri. Como conclusão do teste, foram considerados, após a adição de NH_3OH , fosfatase positivo os isolados que ficaram com a coloração vermelha ou rósea nas colônias, os demais foram considerados negativos.

1.2.2.6 Teste de produção de enzima catalase

O teste consiste na caracterização das bactérias que conseguem converter o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, onde a liberação do oxigênio é observada com a formação de bolhas. A função da catalase é remover o H_2O_2 tóxico resultante dos processos de oxidação e redução envolvendo oxigênio. Para isso, foram colocadas individualmente sobre uma lâmina microscópica colônias dos isolados bacterianos e posteriormente adicionado uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (H_2O_2) nas mesmas. Ao serem observadas a formação de bolhas de ar, indicativo de teste positivo para catalase, ou seja, o isolado consegue produzir a enzima.

1.2.2.7 Teste de produção de ácidos a partir de carboidratos

Para a realização do presente teste deve-se adicionar manitol ao meio de cultura próprio do procedimento. Esse foi preparado na concentração de 15% e filtrados com o uso de uma membrana. No preparo do meio de cultura, corrigiu-se o pH para o valor 7,0 e separou-se em tubos de ensaio 5 mL para cada isolado bacteriano. Este teste é importante para detecção de possíveis rotas metabólicas diferentes entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

1.2.2.8 Teste de redução de nitrato (NO_3^-) em nitrito (NO_2^-)

O teste detecta a capacidade das bactérias de utilizarem o nitrato como um receptor final de elétrons final na sua cadeia respiratória. Nesta reação, o nitrato é reduzido para nitrito, que pode ser posteriormente reduzido para gás nitrogênio ou amônia. A redução é detectada pela adição do ácido sulfanílico e a base N-dimetil-alfanaftilamina, que se combinam com o nitrito para formar um composto vermelho, que indica a resposta positiva ao teste (SCHAAD, 2001).

Sendo assim, após a incubação dos isolados e o crescimento de colônias bacterianas, os mesmos foram colocados em soluções líquidas próprias para a realização do teste e introduzidos os reagentes indicadores, ácido sulfanílico e N-dimetil-alfanaftilamina. O desenvolvimento de uma coloração alaranjada a amarronzada indicou a presença de nitrito. Caso a coloração houvesse desaparecido dentro de minutos acrescentou-se o pó de zinco (Zn), agitando a solução após a introdução do mesmo. Feito isso, se a coloração alaranjada aparecesse, significaria que o nitrato existente foi reduzido pelo metal e reagiu com o reagente, portanto o resultado é negativo. Se a coloração não aparecer, isto indicou que o nitrato e o nitrito estão ausentes do meio e que a desnitrificação ocorreu, portanto o resultado é positivo.

1.2.3 Caracterização patogênica dos isolados

Foram seguidos os passos do postulado de Koch para a reprodução de sintomas e sinais da bacteriose causadora de seca de ponteiros em mudas sadias de *Eucalyptus* spp. através da inoculação de isolados do presente estudo. Sendo assim, foram utilizados quatro métodos de inoculação da bactéria em mudas sadias, que variavam entre massa bacteriana e solução em água destilada autoclavada. Os métodos utilizados foram: (a) introdução de massa bacteriana nas três primeiras gemas axilares do ápice da planta com palitos de madeira previamente esterilizados, impregnados com a massa bacteriana (FERRAZ et al., 2015); (b) inserção de massa bacteriana nas gemas axilar e apical da planta através do uso de palito de madeira esterilizado; (c) injeção de 2 a 5 mL de 3×10^8 UFC da solução bacteriana na gema

apical e (d) injeção de 2 a 5 mL de 3×10^8 UFC da solução bacteriana na gema apical e axilar.

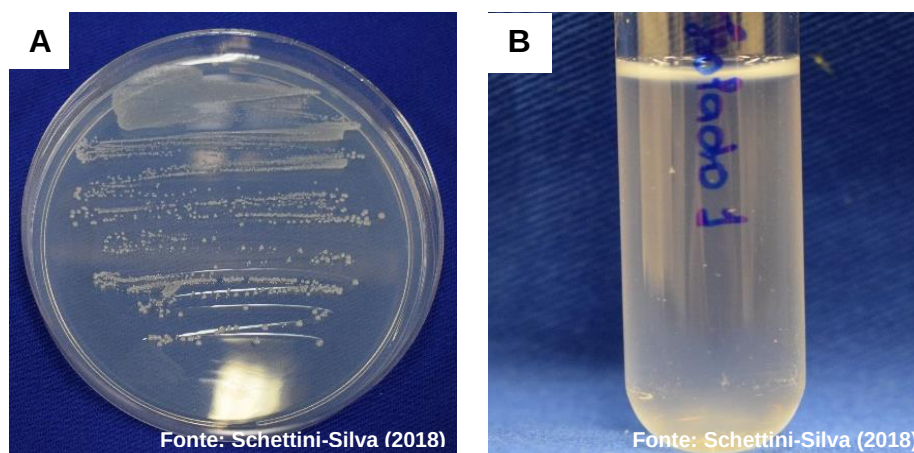
O processo de avaliação da caracterização patogênica foi conduzido em estufa com controle de temperatura e irrigação localizada no Departamento de Proteção Vegetal (DPV) da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), na Fazenda Lageado, no Câmpus de Botucatu, São Paulo nos meses de agosto e setembro de 2018. A escolha dos isolados teve como base os resultados encontrados na caracterização bioquímica realizada, bem como, nas informações de coleta dos mesmos, a fim de que fossem testadas amostras de mudas e de árvores adultas de eucalipto.

Os isolados bacterianos foram reativados e ultrapurificados em dois métodos diferentes de acordo com o tipo de inoculação utilizados ao longo do experimento (Figura 1). Ao todo foram utilizadas 120 mudas no presente experimento, sendo 30 plantas por método.

Anteriormente a realização do experimento todas as mudas de eucalipto foram testadas, a fim de confirmar de que a bactéria não estaria agindo de forma endofítica no hospedeiro. Todas as mudas então estavam 100% sadias e prontas para ser realizada a inoculação do patógeno. Além disso, foram empregadas 5 mudas servidas como testemunha para cada método avaliado.

Após a inoculação de todas as mudas de eucalipto através dos métodos propostos, essas foram colocadas em câmara úmida seguidas por 72 horas, a fim de auxiliar no melhor desenvolvimento do inóculo introduzido. Feito isso, a câmara foi retirada e as mudas seguiram o manejo de irrigação de 30 em 30 minutos em estufa por um período de 30 dias.

Figura 1 - Isolado utilizado para a caracterização patogênica. A) Massa bacteriana crescida em meio de cultura NA e B) Suspensão bacteriana a 3×10^8 UFC



Para a confirmação da eficiência patogênica dos isolados escolhidos, para cada planta foi atribuída uma nota de acordo com a presença dos sintomas da bacteriose causadora de seca de ponteiros (FERRAZ et al., 2015), onde 0 – plantas sem sintomas; 1 – necrose da nervura central e, ou nervuras secundárias; 2 – morte de folhas sem perda de dominância apical; 3 – morte do ápice com perda de dominância apical e 4 – morte da planta.

Por fim, visando à confirmação da bactéria nos tecidos da planta, as mudas foram submetidas à presença de exsudação microscópica de pus bacteriano, 30 dias após a inoculação bacteriana.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos levantamentos de áreas com sintomas ou não da doença em campo e viveiro, foram coletadas 52 amostras de tecido vegetais de dois clones de eucalipto distintos. Dentre essas, 19 amostras foram obtidas através da sintomatologia observada em campo (Figura 2) e 33 amostras de minicepas e mudas em viveiro de produção (Figura 3).

Em placa de Petri com meio de cultura NA enriquecido e com fungicida Nistatina 0,50% em álcool, foi possível observar o crescimento de massa bacteriana pura, composta de colônias amareladas e/ou esbranquiçadas em apenas 16 amostras de campo e 26 amostras de viveiro, totalizando então 42 isolados armazenados na biblioteca do Laboratório de Patologia Florestal da Unesp/Botucatu (Tabela 1).

Figura 2 - Sintomatologia da doença em plantios de eucalipto em Inocência, no Mato Grosso do Sul. A) Arroxamento da nervura principal e B) Desfolha das árvores e seca de ramos e ponteiros



Figura 3 - Sintomatologia da doença em minicepas e mudas de eucalipto em Andradina, São Paulo. A) Arroxamento de nervura e b) Necrose apical e arroxamento da nervura principal



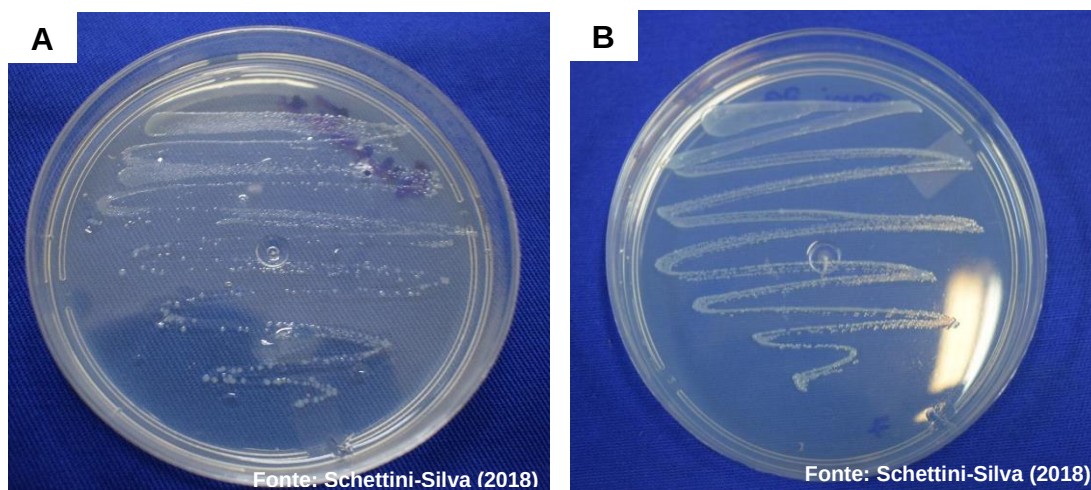
Tabela 1 - Isolados armazenado no Laboratório de Patologia Florestal Unesp/Botucatu e utilizados ao longo do estudo

Isolado	Material Genético	Tipo	Local	Coordenadas
LPFG_001	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_002	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_003	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_004	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_005	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_006	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X=-5777743,61361; Y=-2272557,181
LPFG_007	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X=-5777743,61361; Y=-2272557,181
LPFG_008	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X=-5777743,61361; Y=-2272557,181
LPFG_009	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X=-5777743,61361; Y=-2272557,181
LPFG_010	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X= -5758829,291; Y= -2241869,792
LPFG_011	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_012	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_013	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_014	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_015	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_016	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_017	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_018	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_019	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_020	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_021	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_022	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_023	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_024	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_025	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_026	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_027	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_028	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_029	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X= -5758829,291; Y= -2241869,792
LPFG_030	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X= -5758829,291; Y= -2241869,792
LPFG_031	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X= -5758829,291; Y= -2241869,792
LPFG_032	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X=-57588292905; Y=-224.186.979.231
LPFG_033	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X=-5777743,61361; Y=-2272557,181
LPFG_034	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_035	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_036	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Minicepa	SP	X=-20,53119; Y=-51,213241
LPFG_037	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X=-5777743,61361; Y=-2272557,181
LPFG_038	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X=-5777743,61361; Y=-2272557,181
LPFG_039	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X=-5777743,61361; Y=-2272557,181
LPFG_040	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X=-5777743,61361; Y=-2272557,181
LPFG_041	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X=-57588292905; Y=-224.186.979.231
LPFG_042	<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	Árvore	MS	X=-57588292905; Y=-224.186.979.231

Com relação a caracterização bioquímica dos isolados patogênicos, inicialmente houve a reativação dos mesmos, através do método de plaqueamento por estria simples e observou-se novamente o crescimento de massa bacteriana amarelada e/ou esbranquiçada (Figura 4). Segundo ROMEIRO 2005, a coloração presente, na maioria das vezes, para o completo *Pseudomonas* e *Xanthomonas* spp. é de coloração amarelada, bem como, para *Ralstonia solanacearum* o aspecto pode variar de creme a rosado.

No caso de *Erwinia psidii* a coloração das colônias bacterianas é de aspecto creme a esbranquiçado, segundo o mesmo autor. No caso do presente trabalho, visualmente alguns dos isolados obtidos se assemelhavam bastante aos isolados padrões do complexo causador de mancha foliar – *Pseudomonas* e *Xanthomonas* spp., bem como, ao descrito como causador da seca de ponteiros em *Eucalyptus* spp (ARRIEL et al., 2014). Porém, é importante ressaltar que o aspecto coloração é algo bastante variado, podendo mesmo dentro do mesmo isolado apresentar diversidades de acordo com a capacidade deste, por isso a importância na realização da caracterização completa dos mesmos.

Figura 4 - Plaqueamento por estria simples para utilização na caracterização bioquímica. A) Isolado LPFG_002 e B) Isolado LPFG_31

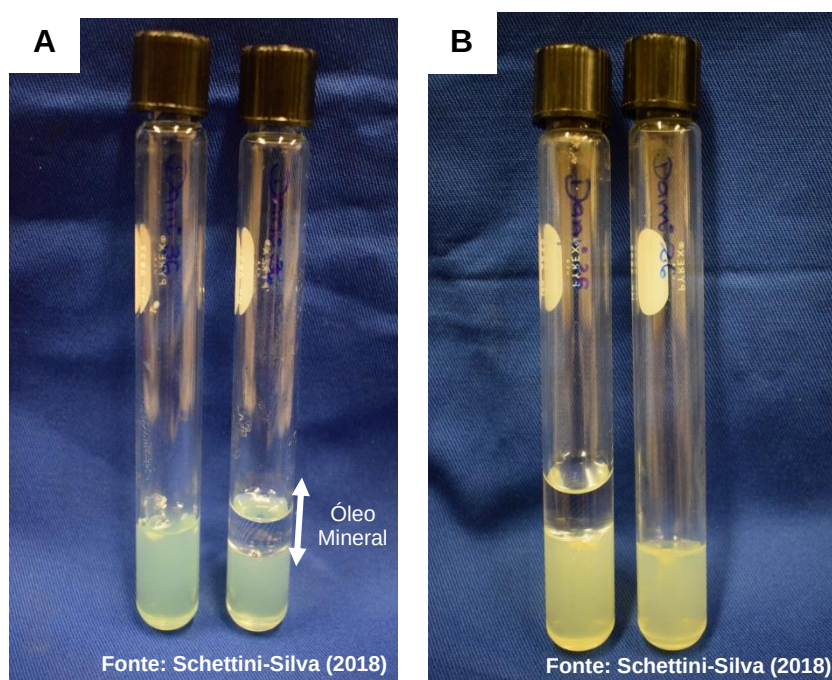


Após o plaqueamento dos quarenta e dois isolados, levou-se ao início os testes bioquímicos. É importante ressaltar que para todos os testes bioquímicos houve réplica, a fim de comprovação dos resultados encontrados. O primeiro teste realizado foi o de Gram de Ryu (teste de KOH) e comprovou-se que todos os isolados eram

correspondentes a bactérias Gram-negativas, ou seja, causadoras de patogenicidade na cultura do eucalipto.

Adiante, os resultados para o teste de fermentação e oxidação (O/F) mostraram o crescimento bacteriano em ambos os tubos de ensaio, com e sem óleo mineral como forma de vedação. Além disso, também foi possível perceber que houve o processo de fermentação em ambos os casos, com a mudança da coloração do meio de cultura utilizado de verde para amarelo. Tal fato confirmou que na maioria dos casos os isolados bacterianos estudados são fermentativos e oxidativos, ou seja, caracterização bactérias anaeróbicos facultativos (Figura 5). Apenas os isolados LPFG_016 e LPFG_038 diferiram desse resultado, crescendo em apenas um dos tubos de ensaio e não modificando a cor do meio de cultura.

Figura 5 - Teste de oxidação e fermentação (O/F). A) No início do teste e B) Após 48 horas da realização



Ademais, todos os isolados apresentaram respostas negativas a hipersensibilidade em folhas de fumo, ou seja, não foram capazes de formar lesões de defesa na planta causando a morte celular, como forma de proteção da mesma (Figura 6).

Com relação a avaliação dos isolados para produção de enzima pectinolítica em pimentão, apenas o isolado LPFG_016 apresentou-se positivo ao teste, ou seja, ao ser introduzido no pimentão foi capaz de dissolver a lamela média do fruto e causar a podridão do material. Para os demais isolados a reação de produção de enzima pectinolítica foi negativa (Figura 7).

Figura 6 - Teste de hipersensibilidade em folhas de fumo. A) Início do teste após a aplicação dos isolados bacterianos e B) Após 48 horas do início do procedimento

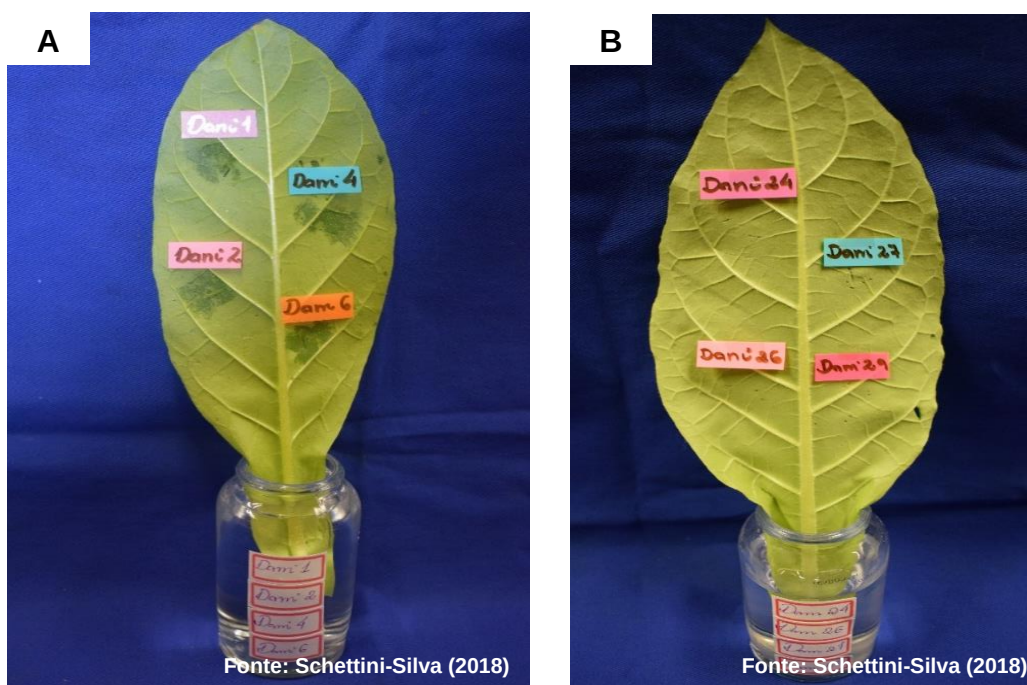
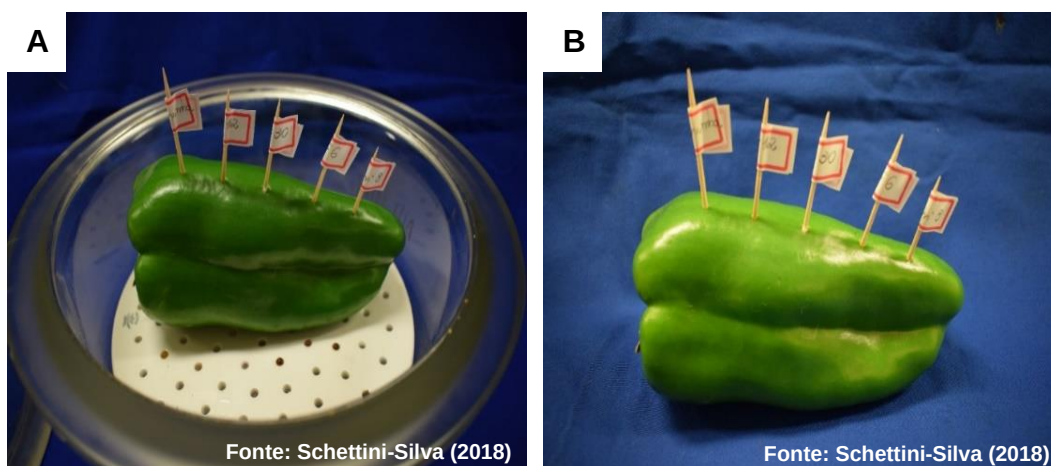
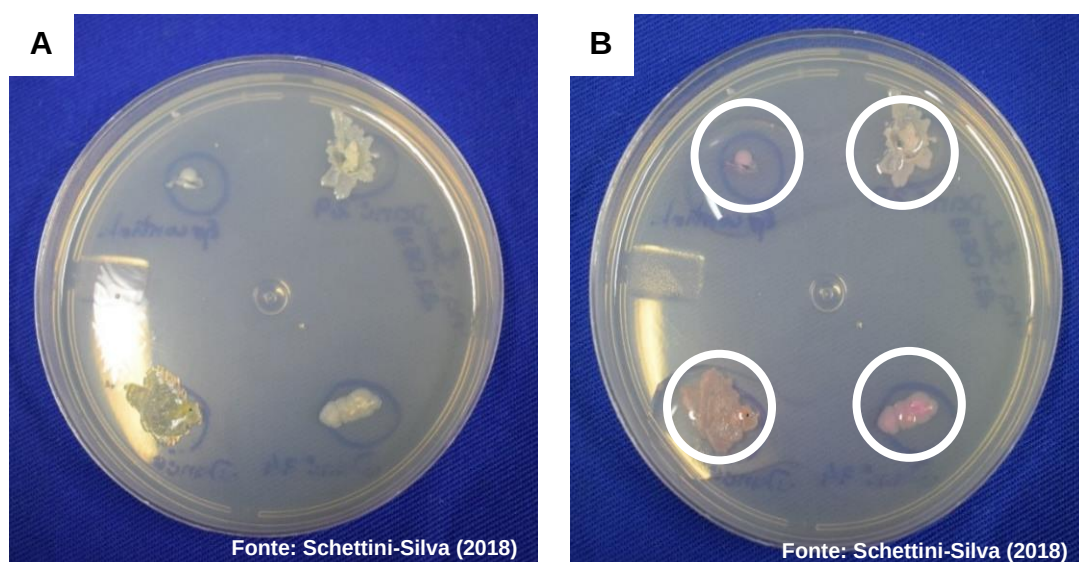


Figura 7 - Teste de produção de enzima pectinolítica em pimentão. A) Início do teste e B) Após 48 horas da inoculação das massas bacterianas



Adiante, o teste de ativação de enzima fosfatase redutora mostrou-se positivo para a maioria dos isolados, mudando assim a coloração da bactéria de creme ou esbranquiçada para rosa, após a introdução de vapor de hidróxido de amônio (NH_4OH) nas mesmas (Figura 8). Apenas para o LPFG_019 o resultado diferiu das demais, mostrando-se ineficiente para a ativação da enzima após a introdução do hidróxido.

Figura 8 - Teste de ativação da fosfatase redutora. A) Crescimento bacteriano após 24 horas do plaqueamento e B) Mudança de coloração após a aplicação do hidróxido de amônio



Após a introdução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), confirmou-se que no caso da produção de enzima de catalase, todos os isolados bacterianos avaliados possuem esta capacidade, produzindo assim bolhas de oxigênio após o contato com o líquido (Figura 9).

Posteriormente, completando assim a lista dos testes bioquímicos a serem seguidos, todos os isolados apresentaram-se positivos para os testes de produção de ácidos a partir do manitol (Figura 10), bem como, foram capazes de reduzir nitrato em nitrito (Figura 11).

Figura 9 - Teste de produção de enzima catalase. A) Início do teste, com as massas bacterianas e B) Após a aplicação de peróxido de hidrogênio

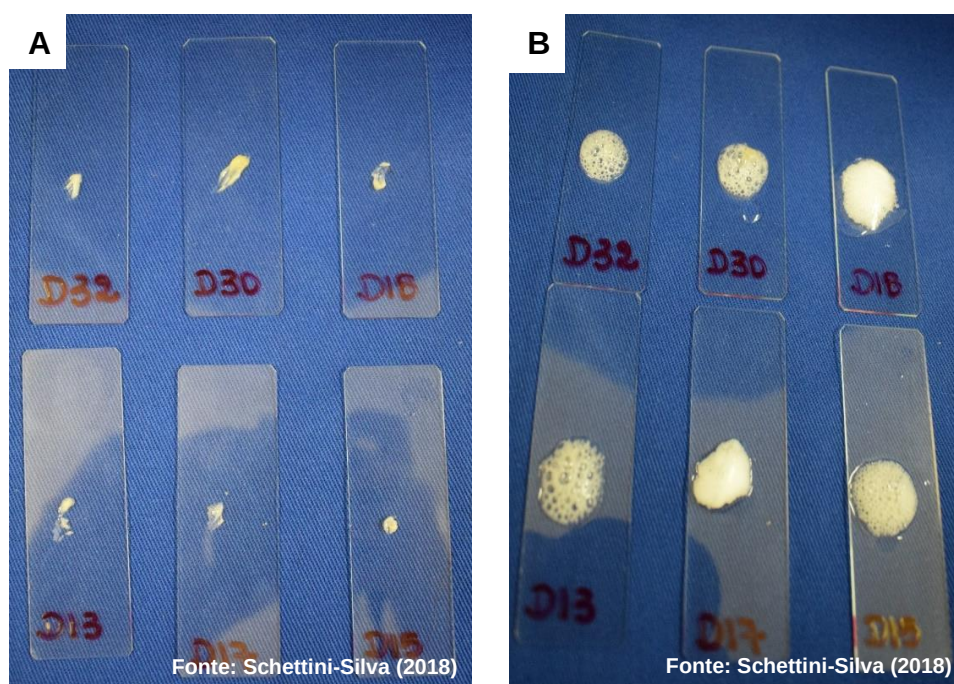


Figura 10 - Teste de produção de ácidos a partir de carboidratos. A) Ao início do teste e B) Após aplicação dos reagentes e o período de incubação (Schettini-Silva, 2018)

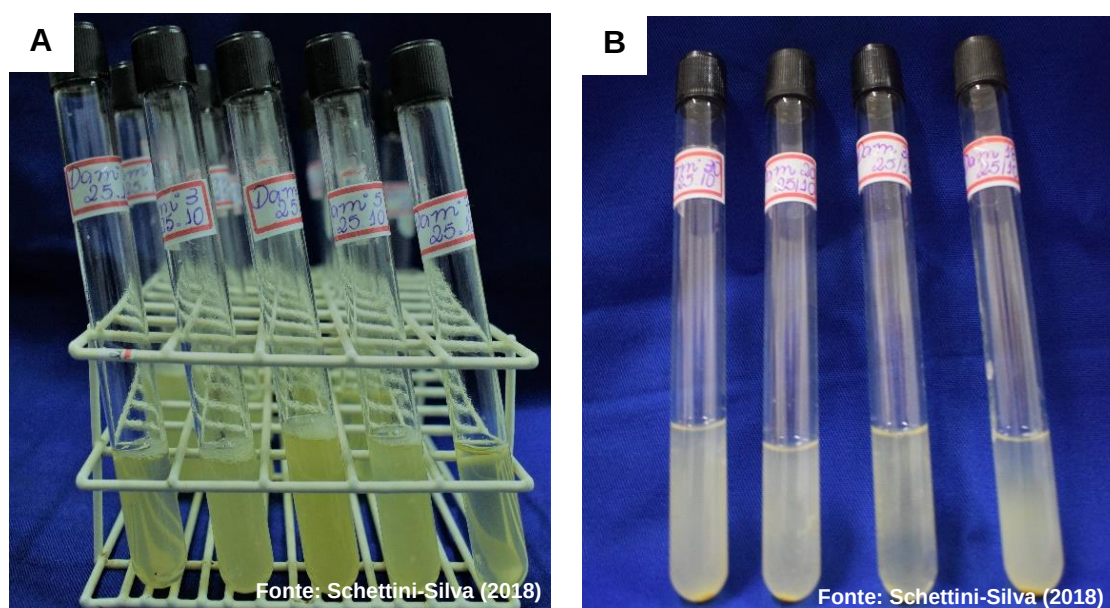
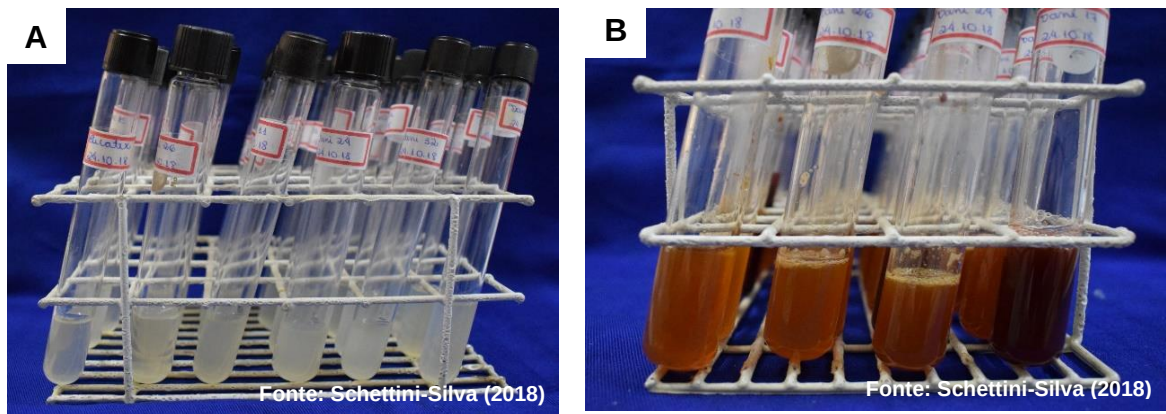


Figura 11 - Teste de redução do nitrato em nitrito. A) Início do teste e B) Após a introdução de ácido sulfanílico e N-dimetil-alfanaftilamina (Schettini-Silva, 2018)



Os dados obtidos a partir da realização dos oito testes para os quarenta e dois isolados bacterianos reativos serão apresentados na tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 - Testes bioquímicos propostos por SCHAAD (2001) e os resultados encontrados para os isolados avaliados

(Continua)

Isolado	Gram de Ryu	O/F	HR em fumo	Enzima pectinolítica	Fosfatase redutora	Catalase	Manitol	Nitrato a nitrito
LPFG_001	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_002	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_003	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_004	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_005	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_006	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_007	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_008	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_009	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_010	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_011	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_012	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_013	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_014	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_015	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_016	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_017	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_018	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_019	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

(Conclusão)								
Isolado	Gram de Ryu	O/F	HR em fumo	Enzima pectinolítica	Fosfatase redutora	Catalase	Manitol	Nitrato a nitrito
LPFG_020	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_021	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_022	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_023	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_024	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_025	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_026	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_027	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_028	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_029	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_030	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_031	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_032	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_033	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_034	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_035	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_036	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_037	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_038	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_039	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_040	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_041	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
LPFG_042	Gram-Negativa	O/F	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

Assim, diante dos resultados percebe-se que, de maneira geral, os isolados bacterianos são Gram-negativos, positivos para os testes de oxidação e fermentação, fosfatase redutora, catalase, produção de ácidos a partir de carboidratos (manitol) e redutores de nitrato em nitrito. Além disso, mostraram-se negativos aos testes de hipersensibilidade em fumo e produção de enzima pectinolítica em pimentão.

Concluiu-se nesta primeira parte do presente trabalho que, de acordo com os testes bioquímicos descritos as bactérias avaliadas são, em grande maioria, pertencentes ao grupo das Enterobactérias. Nesse caso, descarta-se a possibilidade do patógeno ser *Ralstonia solacearum*, uma vez que esse se encontra no grupo das Betaproteobacterias. No caso dos isolados LPFG_016 e LPFG_038, os resultados

diferem dos demais, podendo então dar indícios que se tratam de bactérias do grupo das Gammaproteobactérias.

O grupo das enterobactérias inclui diversas bactérias fitopatogênicas, como as do gênero *Brenneria*, *Dickeya*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pectobacteria*. É o maior e mais variado grupo de bacilos Gram-negativos (SCHAAD, 2001). Segundo a literatura, apenas *Erwinia psidii* já foi descrita como causadora da seca de ponteiros de eucalipto no Brasil (ARRIEL et al., 2014). De acordo com COUTINHO et al. (2002) também foi possível encontrar *Pantoea eucalypti* causando o mesmo sintoma de necrose apical e seca de ponteiros em plantios de eucalipto na África do Sul. Sendo assim, os resultados bioquímicos então validam a necessidade de continuação dos estudos, através das ferramentas moleculares, a fim de descobrir à nível de gênero e espécie o patógeno estudado.

Diante dos resultados bioquímicos, escolheu-se utilizar os isolados LPFG_027, LPFG_031 e LPFG_032 para a realização da caracterização patogênica em mudas sadias de um clone cujo cruzamento *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, avaliado anteriormente como suscetível à doença. Inicialmente, os três isolados foram reativados e deixado em placa de Petri (Figura 12) para introdução na planta, bem como, em formato de suspensão bacteriana a 3×10^8 UFC (Figura 13).

Figura 12 - Isolados utilizados durante o experimento, através dos métodos de inserção. A) Isolado LPFG_027; B) Isolado LPFG_031 e C) Isolado LPFG_032

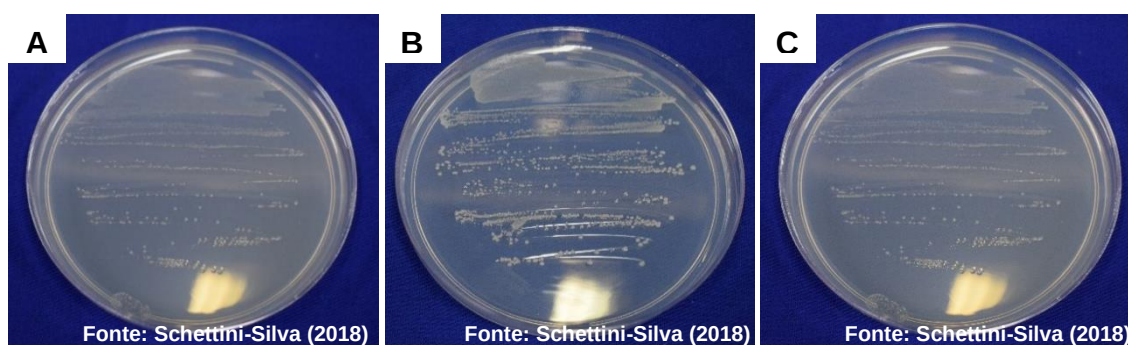
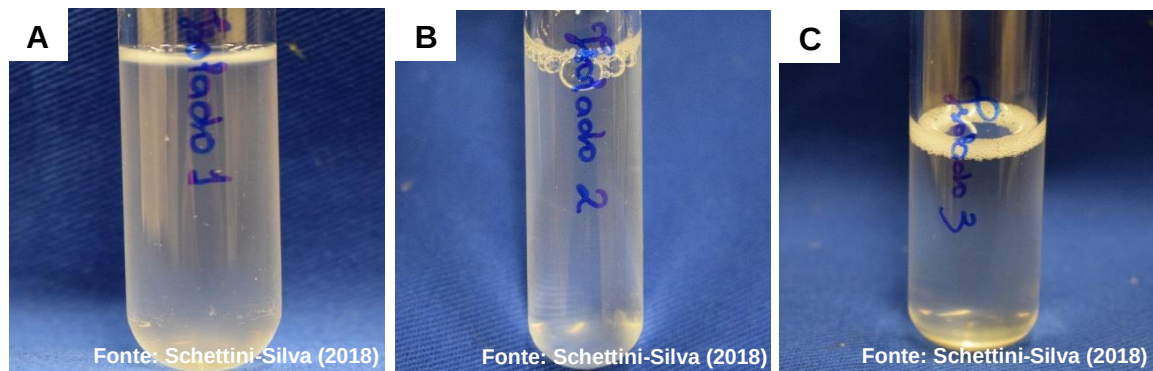


Figura 13 - Isolados utilizados durante o experimento, através dos métodos de injeção. A) Isolado LPFG_027; B) Isolado LPFG_031 e C) Isolado LPFG_032



Após a retirada das câmaras úmidas das mudas de eucalipto, foi iniciado o processo de avaliação do surgimento de sintomas marcados da doença. Foram feitas avaliações de dois em dois dias segundo os sintomas da escala proposta por FERRAZ et al. (2015). Diante disso, observou-se o início da seca de ponteiros de mudas aleatórias nos métodos de inserção de bactéria através do uso de palito de madeira.

Foi possível observar a seca no método da inserção da massa bacteriana nas gemas axilar e apical da planta através do uso de palito de madeira esterilizado (b) e posteriormente no método da inserção da massa bacteriana nas três primeiras gemas axilares do ápice da planta com palito de madeira(a), aos vinte dias da inoculação.

Tal fato pode ser explicado pela grande carga bacteriana depositada na planta, uma vez que o método permitiu a aplicação em ambas as gemas. Após este período também foi observado o aparecimento da seca de ponteiros nos métodos apenas de introdução da suspensão, com o uso da seringa.

Posteriormente, vinte dias após o início da avaliação do experimento foi possível observar o surgimento do sintoma de arroxamento de nervura principal, seguido da necrose do mesmo (Figura 14), sendo este um sintoma encontrado nos métodos (a) e (b). Aos demais métodos, em algumas mudas, apresentou-se o sintoma da seca de ponteiro, porém, não apresentou o arroxamento de nervura principal das folhas.

Figura 14 - Arroxamento da nervura principal, seguido da seca total da muda de *Eucalyptus* spp. através da inserção de massa bacteriana nas gemas



Como forma de comprovação da presença do patógeno foram feitos aos 32 dias após a inoculação artificial os isolamentos direto e indireto de mudas, a fim de que fossem obtidas colônias bacterianas que comprovassem a presença do patógeno inoculado nas plantas. A observação em microscópio foi possível, com a presença de exsudação bacteriana em mudas. Além disso, foi realizado o crescimento desses em placa de Petri com meio de cultura, pelo método de isolamento indireto (Figura 15).

Ao final do experimento, observou-se o fato de que muitas plantas inoculadas não apresentavam o sintoma da doença, por isso, foi realizado o plaqueamento destas através do isolamento indireto e também observou-se o crescimento de colônias bacterianas, ou seja, o patógeno poderia estar em sua forma endofítica na muda de eucalipto.

Figura 15 - Crescimento de massa bacteriana advindos de mudas submetidas a inoculação artificial



Ademais, a partir da avaliação visual das mudas foi possível concluir que o método (b) foi o que mais causou mortalidade das plantas, seguidos do método (a), (d) e (c), como é pode ser observado na Tabela 3. Além disso, nos meses de realização do experimento observou-se uma baixa de temperatura, com médias entre 10 a 18°C, o que pode não ter favorecido o aparecimento de sintomas marcantes da doença para os métodos (c) e (d) de inoculação, como o da necrose das folhas e o arroxamento das mesmas.

Tabela 3 - Avaliação dos métodos de inoculação bacteriana

Método	Sintomas				
	Nota 0	Nota 1	Nota 2	Nota 3	Nota 4
Método A	20%	17%	7%	40%	17%
Método B	10%	33%	13%	20%	23%
Método C	47%	0%	0%	47%	7%
Método D	50%	0%	10%	30%	10%

¹Os métodos utilizados foram: (a) introdução da massa bacteriana nas três primeiras gemas axilares da planta, com palito de madeira; (b) introdução da massa bacteriana em todas as gemas da planta; (c) injeção de 2 a 5 mL de 3×10^8 UFC da solução na gema apical e (d) injeção de 2 a 5 mL de 3×10^8 UFC da solução em todas as gemas da planta.

²As notas utilizadas foram: 0 – plantas sem sintomas; 1 – necrose da nervura central e, ou nervuras secundárias; 2 – morte de folhas sem perda de dominância apical; 3 – morte do ápice com perda de dominância apical e 4 – morte da planta.

Com relação as mudas testemunhas, nenhuma dessas apresentaram sintomas visuais da doença, bem como, ao ser realizado o plaqueamento dessas as mesmas também não cresceram em placa de Petri. A partir dos dados obtidos conclui-se que o método capaz de causar maior mortalidade em mudas sadias de eucalipto é o de inserção de massa bacteriana através das gemas apical e axilar. Assim, através da visualização dos sintomas da doença, bem como, do crescimento em placa de Petri vindo das mudas presentes no experimento conclui-se então que os isolados são capazes de causar patogenicidade na cultura em plantas sadias, positivando assim a caracterização patogênica.

Por fim, também foi realizada a caracterização patogênica dos mesmos isolados escolhidos de eucalipto em duas espécies de mirtácea, sendo elas *Psidium guajava* (goiaba) e *Syzygium jambos* (jambo) da mesma maneira que foi realizado anteriormente. Aos trinta e dois dias de inoculação dos isolados também foi realizada a avaliação e confirmou-se a patogenicidade dos isolados de eucalipto nas duas espécies, sendo que o sintoma da seca dos ponteiros e de minicancro na haste das espécies mais evidentes (Figura).

Nesse caso, o método de introdução do patógeno com palito de madeira também demonstrou maior severidade do que com a seringa. Conclui-se então através dessa inoculação que isolados de eucalipto também são patogênicos em outras espécies de mirtáceas, podendo então serem fontes de inóculos umas para as outras.

Figura 16 - Sintomas da doença tanto em goiaba quanto em jambo A) Seca dos ponteiros da goiaba e B) Minicancro na haste do jambo



REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5 ed. Amsterdam: Elsevier, 952p. 2005
- ARRIEL, D. A. A. et al., Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. **Forest Pathology**. 44: 255-265. 2014.
- COUTINHO et al., Bacterial blight and dieback of Eucalyptus species hybrids and clones in South Africa. **Plant Dis** 86:20-25. 2002.
- DYE, D.W. A taxonomic study of genus *Erwinia*: I. The “amylovora” group. **New Zealand Journal Sci** 11:590-607. 1968.
- FERRAZ, H. G. M. et al., Methods of inoculation and evaluation of *Erwinia psidii* in *Eucalyptus*. **Forest Pathology**. 240-247. 2015.
- HUGH, R. & LEIFSON E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. **Journal Bacteriological** 66:24-26. 1953.
- IBÁ. 2016. **Relatório Indústria Brasileira de Árvores**. Disponível em: <http://iba.org/images/shared/iba_2016.pdf> Acesso em: 09 abr. 2019.
- LOZANO, J.C. & SEQUEIRA, L. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by leaf infiltration technique. **Phytopathology** 60:833-838. 1970.
- MARQUES, A. S. dos A. et al., Caracterização nutricional e molecular de *Erwinia psidii*, agente causal da seca dos ponteiros da goiabeira. **Fitopatologia Brasileira** 27: 64. 2002.
- MARQUES, A. S. dos A., COELHO, M.V.S & FERREIRAS, M.A.S.V. Caracterização nutricional e molecular de *Erwinia psidii*, agente causal da seca dos ponteiros da goiabeira. **Fitopatologia Brasileira** 27: 64. 2002.
- RODRIGUES NETO, J., ROBBS, C. F. & YAMASHIRO, T. A bacterial disease of guava (*Psidium guava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. **Fitopatologia Brasileira** 12:345-350. 1987.
- ROMEIRO, R.S. **Bactérias Fitopatogênicas**. 5ª ed. Viçosa-MG. Editora UFV. 417p. 2005.
- SCHAAD, N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Pau-Minesota. **APS Press** (The American Phytopathological Society). 2001.
- SUSLOW, T.V., SCHROTH M.N. & ISAKA, M. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. **Phytopathology** 72:917-918. 1982.

CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DAS BACTÉRIAS CAUSADORAS DA NECROSE APICAL E SECA DE PONTEIROS DO EUCALIPTO

Autores: Daniella Flávia Said Heid Schettini Silva, Celso Luis Marino, Vanusa Otoni, Helena Farsoni, Bruno Rossini e Edson Luiz Furtado

RESUMO

Os plantios de eucalipto possuem ampla expansão no território nacional, dispondo de resultados tão favoráveis que no país é possível encontrar clones com produtividade acima de 50m³/ha/ano. Dentre as áreas que auxiliam no ganho das florestas, pode-se citar o melhoramento genético e a proteção florestal e suas respectivas técnicas. Atualmente, as doenças bacterianas vem tendo destaque na literatura, podendo ocorrer tanto em fases de viveiro até em plantios adultos. Ferramentas bioquímicas e patogênicas auxiliam no descobrimento da origem do agente causal. Porém, a caracterização molecular permite a identificação à nível de gênero e espécie do patógeno, através da realização da amplificação das sequências de DNA. Por isso, a execução da caracterização completa é importante para a identificação do patógeno. Sendo assim, o estudo realizou a extração de DNA das quarenta e duas amostras obtidas em campo e em viveiro com sintomas de necrose apical e seca de ponteiros do eucalipto, seguidas da realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) com quatro pares de *primers* diferentes e, por fim, o sequenciamento das amostras. Os resultados comprovam que os danos apresentados são causados pela interação entre enterobactérias, sendo elas *Erwinia psidii* e *Pantoea eucalypti*, formando assim um complexo. Ademais, também foi possível observar a interação desses, em menor escala, com *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas* spp., atuando como oportunista na planta. Por isso, a necessidade de se aprofundar em estudos de controle da doença em questão, como a utilização de estudos em biotecnologia.

Palavras-chave: DNA Genômico. *Primers*. PCR. Sequenciamento. Doenças florestais.

ABSTRACT

Eucalyptus plantations are widely exploited in the national territory, having high productivity being possible to find clones with productivity above 50m³/ha/year. Genetic improvement and forest protection are among the areas that aid in forest productivity. Currently, bacterial diseases have been highlighted in the literature and can occur both in nursery stages and in adult plantings. Biochemical and pathogenic tools assist in discovering the origin of the pathogen. However, molecular characterization allows identification at the genus and species level of the pathogen, since it performs the amplification of DNA sequences. Therefore, the realization of full characterization is important for pathogen identification. Thus, in this study was extracted the DNA from forty-two field and nursery samples with die back symptoms, following by PCR with four different *primers* and finally, sequencing of the samples. The results show that the damage presented is caused by the interaction between enterobacteria, *Erwinia psidii* and *Pantoea eucalypti*, composing a complex of enterobacteria. Moreover, it was also possible to observe their interaction with *Pseudomonas* spp. and *Xanthomonas* spp., possibly being opportunistic. Therefore, the need to study methods for controlling the disease in question, such as the use of biotechnology.

Keywords: DNA Genômico. *Primers*. PCR. Sequencing. Plant diseases.

2.1 INTRODUÇÃO

Alta produtividade, rápido crescimento, ampla variedade de espécies para usos múltiplos e capacidade de adaptação em diversas regiões edafoclimáticas brasileiras, são algumas das inúmeras características que resultam em espécies de eucalipto com extensiva utilização nos plantios florestais (MOURA, 2000). Dispõe de resultados tão favoráveis que no Brasil é possível encontrar clones com produtividade acima de 50 m³/ha/ano, com ciclos entre 6 e 7 anos (SILVA, 2008). Para que seja possível, são muitos os investimentos em práticas de melhoria da espécie, bem como, em tratamentos silviculturais que possibilitem a melhor adaptabilidade dos materiais genéticos em condições de produção de mudas e posteriormente, a sobrevivência em campo.

A evolução das técnicas de manejo, criando ambientes adequados à expressão máxima do potencial genético dos clones é fator importante na evolução positiva da produtividade das florestas de eucalipto. Assim, dentre os fatores para formação de uma floresta produtiva, destaca-se a adoção de práticas adequadas de proteção florestal (MAFIA et al., 2013). A cultura é acometida por diversos patógenos de cunho biótico, ou seja, aqueles causados por agentes infecciosos e são transmissíveis de uma planta doente para outra sadia.

Atualmente, as doenças causadas por bactérias vem tendo destaque na literatura. Elas podem ocorrer desde as fases de viveiro até mesmo em plantios adultos. Dentre essas, destacam-se a *murcha-de-Ralstonia*, causadora de murcha vascular, bem como, a mancha foliar causada pelo complexo *Pseudomonas* e *Xanthomonas* spp. Ademais, estudos recentes mostram a seca de ponteiros causada por *Erwinia psidii* (ARRIEL et al., 2014) uma importante doença na cultura do eucalipto, sendo um patógeno recente e que requer maiores estudos a respeito, a fim de preencher lacunas desse patossistema.

Embora a caracterização fenotípica seja de grande importância para a identificação do patógeno e a diagnose correta da doença, a ferramenta não consegue por si só detectar diferenças entre os isolados, podendo responder apenas se é uma doença de origem fúngica ou bacteriana. Diante disso, em alguns casos a diferenciação dos sintomas entre bacterioses não é evidente, podendo assim demonstrar uma errônea diagnose do patógeno avaliado. Em alguns casos é possível observar evidências de arroxamento de nervura, murcha e seca semelhante para diferentes bacterioses, bem como, manchas foliares que descrevem mais de um

patógeno em questão. Ademais, sinais como exsudação bacteriana vista a olho nu ou até mesmo a corrida bacteriana feita com auxílio da microscopia apenas confirma a origem bacteriana da doença, não diferenciando os patógenos entre si.

Além disso, algumas bactérias são capazes de formar complexos causadores de doença, podendo agregar mais de um patógeno causador de danos a espécie. Percebe-se então a importância do conjunto de caracterizações, ou seja, a caracterização patogênica, bioquímica e molecular. A junção das mesmas possibilita uma resposta exata da diagnose, auxiliando assim na tomada de decisão com relação a erradicação do problema, bem como, nas medidas fitossanitárias utilizadas para impedir a proliferação patogênica.

Enquanto as características fenotípicas não refletem a relação genética entre os diferentes isolados, os métodos baseados na análise do ácido desoxirribonucleico (DNA) são mais estáveis e possibilitam uma derivação precisa do relacionamento genético dos mesmos (LOUWS et al., 1999). Portanto, após a realização da caracterização bioquímica, confirmando o grupo bacteriano pertencente do isolado, bem como, a patogênica que confirma a capacidade do mesmo em causar doença em plantas saudáveis, deve-se finalizar o processo de caracterização através das ferramentas moleculares.

A utilização de um método baseado na detecção direta do DNA, através da sua amplificação em cadeia por meio de uma enzima polimerase, PCR (*Polymerase chain reaction*), permite uma geração de um grande número de cópias de um fragmento específico de DNA, a partir de pequenas quantidades de DNA genômico (PEREIRA, 2003). Assim é possível realizar a diferenciação dos isolados em diferentes níveis, como gênero, espécie, subespécie e biovar das bactérias. Diante disso, dentre as técnicas moleculares utilizadas, uma técnica de análise genômica amplamente utilizada é a PCR convencional, que tem-se mostrado extremamente confiável, reproduzível, de simples e rápida realização e altamente discriminatória (VERSOLAVIC et al., 1991), o que pode possibilitar a separação de distintos isolados bacterianos.

Sendo assim, o objetivo principal do presente capítulo é realizar a caracterização molecular dos isolados obtidos, a fim de separá-los geneticamente à nível de gênero e espécie. Diante disso, através do sequenciamento de regiões específicas do genoma será então possível realizar a correta identificação dos patógenos causadores de seca de ponteiros em mudas e árvores de *Eucalyptus* spp.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Após a obtenção dos quarenta e dois isolados, mantidos na biblioteca do Laboratório de Patologia Florestal da FCA/UNESP – Botucatu, bem como a realização da caracterização bioquímica e patogênica dos mesmos, foi realizada a etapa de caracterização molecular. Esta etapa confirmou à nível de gênero e espécie qual o patógeno causador da seca de ponteiros em mudas e árvores de eucalipto.

Para a execução desta caracterização, foram realizados procedimentos desde a obtenção do DNA dos isolados, realização das PCRs, confirmação da amplificação dos *primers* através da técnica de eletroforese em géis de agarose, até o sequenciamento das regiões de interesse dessas amostras, que no caso de bactérias, segundo a literatura, a região 16S é a mais recomendada por ser a mais genética entre as bactérias. Todos os procedimentos realizados serão descritos a seguir, separadamente.

2.2.1 Extração de DNA Genômico

Para a realização deste procedimento foi utilizado o protocolo padrão para bactérias Gram-negativas, com adaptações, do kit Wizard Genomic DNA Purification®, da empresa Promega. Inicialmente, os isolados bacterianos armazenados em água ultrapura foram reativados. Para isso, foram postos em placas de Petri com meio de cultura NA enriquecido e incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa BOD por 24 horas. Com o uso de uma alça de platina, após o período de crescimento, as colônias bacterianas da placa de Petri foram raspadas e colocadas em microtúbulos com meio de cultura NA líquido. Tais amostras foram encaixadas no orbitador magnético horizontal a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 60 rotações por minuto (rpm) e deixados *overnight*, para crescerem nessas condições.

Após o período, foi adicionado 1 mL de cultura bacteriana em um microtúbulo de 1,5 mL limpo e centrifugado a 16.000 rpm por cerca de dez minutos, para sedimentação das células. Posteriormente o sobrenadante formado foi removido e adicionou-se ao microtúbulo 650 μL de solução de lise de núcleos (*Nuclei Lysis Solution*) e a amostra foi incubada em banho maria a $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. A amostra foi resfriada a temperatura ambiente e passado o período de resfriamento, foi adicionado 3 μL de solução de RNA e foram feitas inversões da amostra por 5 minutos

em agitador vortex. Ademais, essa foi resfriada em temperatura ambiente e adicionados 200 μL de solução de precipitação de proteína (*Protein Precipitation Solution*) ao microtúbulo tratado, realizando um vortex rigoroso por 20 segundos e incubando assim a amostra no gelo por aproximadamente 5 minutos.

Adiante, o microtúbulo foi centrifugado a 16.000 rpm por 10 minutos e feita a transferência do sobrenadante contendo DNA para outro microtúbulo de 1,5 mL contendo 600 μL de isopropanol a temperatura ambiente. Após isso, a amostra foi centrifugada a 16.000 rpm por 3 minutos e derramado cuidadosamente o sobrenadante em papel absorvente autoclavado. Em seguida, foram adicionados 600 μL de etanol 70% em temperatura ambiente e feita, delicadamente, a inversão do tubo várias vezes, limpando assim o pellet de DNA formado.

Após a realização dessa etapa, foi feita a centrifugação da amostra a 16.000 rpm novamente por 2 minutos e após isso a drenagem do tubo foi feita, deixando os mesmos para secar em temperatura ambiente por 15 minutos. Por fim, foram adicionados 100 μL de solução de reidratação de DNA ao microtúbulo e feito o processo de reidratação do DNA, incubando o mesmo a 65°C por 1 hora. Todo esse procedimento foi realizado para os 42 isolados. Posteriormente, as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

2.2.2 Quantificação das amostras de DNA Genômico

A confirmação da eficiência do método de extração de DNA genômico, foi feita através da quantificação do DNA obtido para cada isolado, através do uso do Nanodrop®, da Thermo Scientific. Utilizou-se de 1 μL do DNA para a obtenção dos resultados no aparelho. Após o processo de identificação da concentração, para continuidade das análises todas as amostras de DNA foram diluídas para 10 ng μL^{-1} e mantidas à temperatura de -20°C. Além disso, foi avaliada a integridade dessas amostras, concentradas e diluídas, através do uso de eletroforese em géis de agarose a 2%, com potência de 120 V durante 45 minutos. Os géis foram fotografados pelo sistema de foto documentação sob luz ultravioleta.

2.2.3 Amplificação por PCR para confirmação da identidade dos isolados e sequenciamento de regiões de interesse

Para a realização das PCRs foram utilizados quatro *primers* diferentes, através dos protocolos propostos pela literatura para cada um deles. As reações foram todas realizadas em um volume total de 25 µL. Para os *primers* gapA, recA e rpoB (ARRIEL et al., 2014), as reações para cada um desses teve a proporção de 0,60 µM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1), 7,50 µL de Taq DNA polimerase que foi obtido do kit da Promega, 0,20 mM de cada dextoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) – Invitrogen, 5 unidades de tampão de reação, 2,5 mM MgCl₂, 20 ng de DNA e, para completar a reação, água ultrapura autoclavada. A escolha dos três *primers* utilizados, se deu como base a utilização anteriormente dos mesmos para a caracterização de sequências da região 16S de amostras de *Erwinia psidii* em eucalipto.

Para a amplificação, em termociclador dos três *primers* propostos, foi feito um programa padrão para *Erwinia psidi*, segundo proposto em diversas literaturas para outras culturas. Utilizou-se de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguidas por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, amplificação a 52°C por 30 segundos e alongação a 72°C por 2 minutos, com a finalização de uma alongação a 72°C por 5 minutos.

Ademais, utilizou-se de um quarto par de *primers*, de amplo espectro para a região 16S de qualquer bactéria, denominado 515F e 806R (WALTERS et al., 2016). Para uma reação de 25 µL, utilizou-se de 10 µL de PCR Master Mix (Promega), bem como, 0,50 µL do primer *forward*, 1,0 µL do primer *reverse*, 2,00 µL do DNA bacteriano a ser testado, completando assim o resto da reação com água ultrapura autoclavada. A amplificação, em termociclador, para este *primer* avaliado, seguiu o padrão de 94°C por 3 minutos, para desnaturação inicial, com posterior sequência de 35 ciclos, por 45 segundos cada para desnaturação, com temperatura de 94°C. Posteriormente, a amplificação feita por 50°C por 60 segundos, seguidos da alongação por 72°C por 90 segundos e a alongação final com 72°C por 10 minutos e posteriormente 4°C, para finalização da reação (WALTERS et al., 2016).

Tabela 1 - Sequência dos quatro *primers* utilizados durante a amplificação por PCR

Primer	Sequência (5' - 3') (F e R)	Origem
16 S	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA GGACTACNVGGGTWTCTAAT	Parada et al., 2015 Apprill et al., 2015
gapA	TGAAATATGACTCCACTCACGG TAGAGGACGGGATGATGTTCTG	Brown et al., 2000
recA	GGTAAAGGGTCTATCATGCG CCTTCACCATAACATAATTTGGA	Waleron et al., 2002
rpoB	AACCAGTTCCGCGTTGGCCTG CCTGAACAACACGCTCGGA	Brady et al., 2008

Para a confirmação das reações corridas em termociclador, os produtos finais da PCR foram separados em géis de agarose a 2,0%, a 120 V durante 45 a 60 minutos, dependendo da amplificação dos mesmos. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta pelo sistema de foto documentação e o tamanho dos fragmentos seguindo o mesmo padrão de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Considerou-se como uma reação positiva quando houver a amplificação das regiões do DNA na presença dos *primers* utilizados.

Após a etapa de validação da eficiência do *primer*, através da eletroforese com o gel de agarose, foi feito o sequenciamento de regiões de interesse dos 42 isolados bacterianos, utilizando-se dos mesmos oligonucleotídeos usados para a amplificação do DNA e das reações de PCR realizadas. Tal passo molecular serviu como base para descoberta do patógeno causador da seca de ponteiros em mudas e árvores de eucalipto, bem como, permitiu a distinção entre esses. O *primer* da região 16S confirma se é bactéria ou não, por representar uma região de interesse, já os outros três *primers* confirma a possibilidade de ser ou não *Erwinia*.

O sequenciamento foi realizado no Instituto de Biotecnologia da UNESP/Botucatu, utilizando-se de sequenciador automático de DNA, através do método Sanger de sequenciamento. O método permite que o DNA alvo seja copiado várias vezes, produzindo cadeias de comprimentos diferentes. Os oligonucleotídeos usados para a amplificação do DNA foram os mesmos utilizados no sequenciamento dos isolados. Todas as sequências obtidas foram analisadas e editadas utilizando o software Geneious® (*Bioinformatic Software for Sequence*). Posteriormente, foram comparadas com as sequências disponíveis no banco internacional de sequências de

DNA disponível no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com a utilização da ferramenta Blastn (ALTSCHUL et al., 1997).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, a concentração de DNA das amostras extraídas através do protocolo modificado do kit de extração para bactérias Gram-negativas, apresentaram valores entre 400 a 600 ng μl^{-1} para todos os isolados bacterianos avaliados e todas foram diluídos para a concentração padrão. Posteriormente, as reações de PCR foram realizadas e houve a validação da utilização dos quatro *primers* através da obtenção de géis de agarose pelo método de eletroforese (Figura 1, 2 e 3). Feito isso, realizou-se o sequenciamento Sanger de todos os isolados para os quatro *primers*.

As sequências parciais obtidas do gene 16s rDNA apresentaram cerca de 600 pares de base (pb), 190 pb, 700 pb e 300 pb para os *primers* gapA, recA, rpoB e 16S, respectivamente. As temperaturas de anelamento utilizadas durante o processo de sequenciamento foram 59°C para os três primeiros *primers* citados e 66°C para o primer 16S. Diante das sequências obtidas, essas foram unidas entre *primers forward* e *reverse*, através do software Geneious® e foram comparadas com as outras sequências disponíveis na biblioteca do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), através do programa Blastn.

Figura 1 - Validação dos *primers* gapA (a), recA (b), rpoB (c) e 16S (d) através do uso de géis de agarose em eletroforese

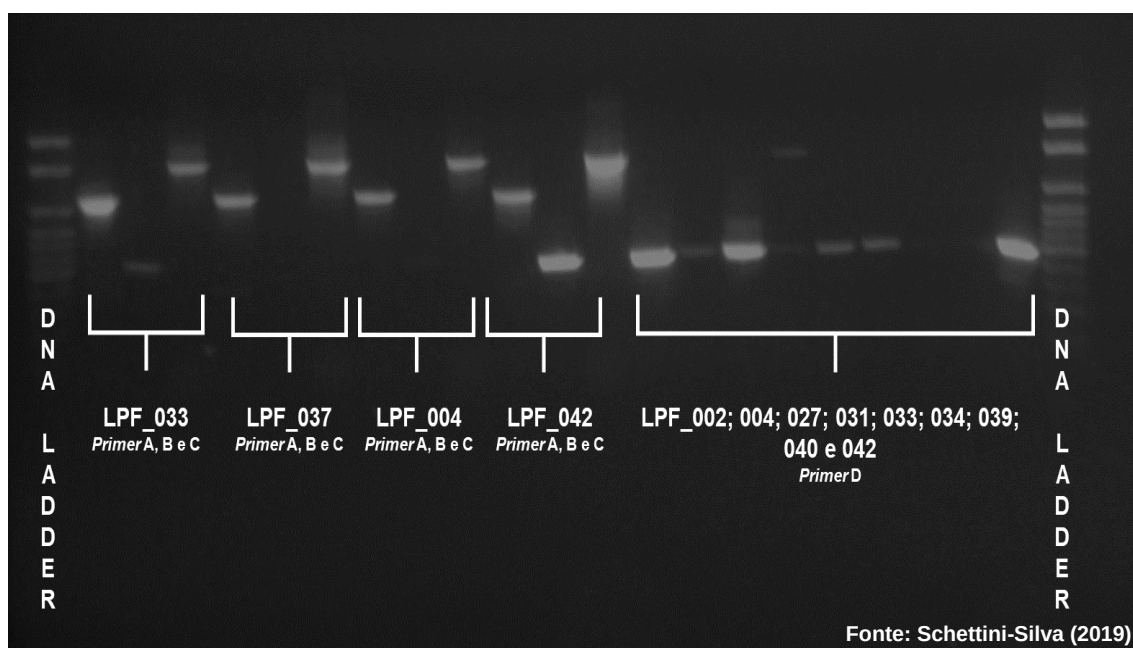


Figura 2 - Validação dos *primers* gapA (a) e recA (b) através do uso de géis de agarose em eletroforese

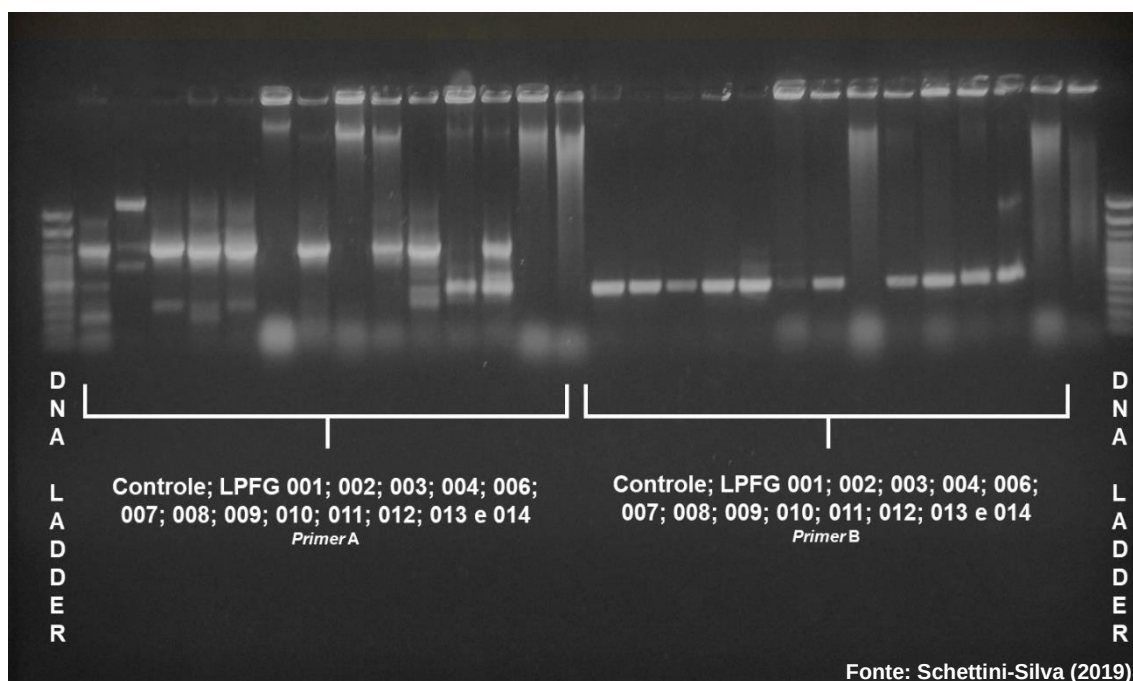
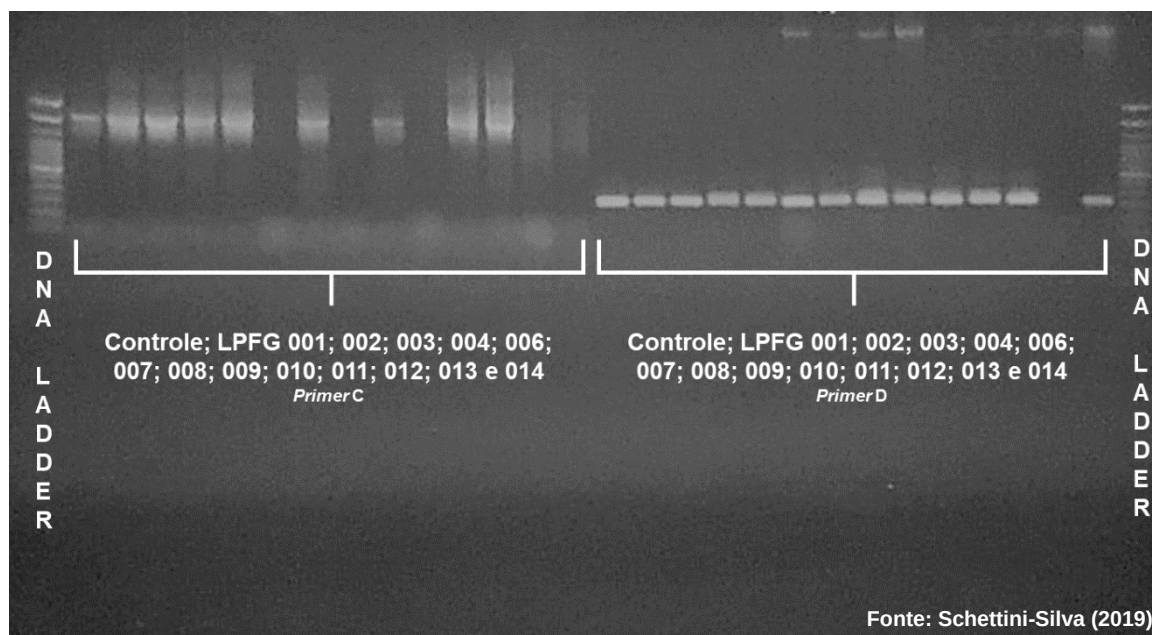


Figura 3 - Validação dos *primers* rpoB (c) e 16S (d) através do uso de géis de agarose em eletroforese



As sequências postas no GenBank indicaram então valores de identidades superiores a 98% para 40 dos isolados obtidos com as bactérias fitopatogênicas do grupo das Enterobactérias. Sendo essas *Erwinia psidii* e *Pantoea eucalypti* (Tabela 2), formando assim um complexo bacteriano de enterobactérias causador de seca de ponteiros em mudas e árvores de *Eucalyptus* spp. Além desse complexo de enterobactérias, 2 dos isolados apresentaram identidade superior a 98% para o complexo bacteriano formado por *Pseudomonas* e *Xanthomonas* spp, correspondente ao grupo das Gammaproteobactérias. Ressaltando o fato de que todas as comparações foram utilizados com o Blastn apresentando e-value = 0.

Portanto, dos 42 isolados sequenciados, apresentando ou não sintomas da doença, cerca de 60% desses correspondiam a *Erwinia psidii*, 36% a *Pantoea eucalypti* e aproximadamente 5% a *Pseudomonas* e *Xanthomonas* spp. Tais resultados encontrados no sequenciamento dessas amostras comprovam a caracterização bioquímica realizada anteriormente.

Tabela 2 - Identificação dos isolados bacterianos causadores de seca de ponteiros em mudas e árvores de eucalipto através da comparação da sequência do gene 16S do DNA com as sequências depositadas no GenBank

Isolados	Espécie identificada	Gene	% de identificação de acordo com o programa Blastn
LPFG_001	<i>Pantoea eucalypti</i>	rpoB	99%
LPFG_002	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	99%
LPFG_003	<i>Pantoea eucalypti</i>	rpoB	98%
LPFG_004	<i>Pantoea eucalypti</i>	gapA	99%
LPFG_005	<i>Pantoea eucalypti</i>	rpoB	98%
LPFG_006	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	99%
LPFG_007	<i>Pantoea eucalypti</i>	rpoB	98%
LPFG_008	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	99%
LPFG_009	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	99%
LPFG_010	<i>Pantoea eucalypti</i>	rpoB	98%
LPFG_011	<i>Erwinia psidii</i>	gapDH	98%
LPFG_012	<i>Pantoea eucalypti</i>	rpoB	99%
LPFG_013	<i>Erwinia psidii</i>	gapDH	99%
LPFG_014	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	98%
LPFG_015	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	98%
LPFG_016	<i>Pseudomonas spp.</i>	rpoB	98%
LPFG_017	<i>Erwinia psidii</i>	rpoB	99%
LPFG_018	<i>Erwinia psidii</i>	gapDH	100%
LPFG_019	<i>Erwinia psidii</i>	gapDH	99%
LPFG_020	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	99%
LPFG_021	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	99%
LPFG_023	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	98%
LPFG_024	<i>Pantoea eucalypti</i>	rpoB	99%
LPFG_025	<i>Erwinia psidii</i>	gapDH	99%
LPFG_026	<i>Pantoea eucalypti</i>	rpoB	98%
LPFG_027	<i>Pantoea eucalypti</i>	gapDH	99%
LPFG_028	<i>Erwinia psidii</i>	gapDH	98%
LPFG_029	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	99%
LPFG_030	<i>Pantoea eucalypti</i>	gapA	98%
LPFG_031	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	99%
LPFG_032	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	98%
LPFG_033	<i>Erwinia psidii</i>	rpoB	98%
LPFG_034	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	99%
LPFG_035	<i>Pantoea eucalypti</i>	rpoB	98%
LPFG_036	<i>Erwinia psidii</i>	R4-368	98%
LPFG_037	<i>Pantoea eucalypti</i>	gapA	99%
LPFG_038	<i>Pseudomonas spp.</i>	gapDH	99%
LPFG_039	<i>Pantoea eucalypti</i>	gapA	99%
LPFG_040	<i>Pantoea eucalypti</i>	gapA	98%
LPFG_041	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	99%
LPFG_042	<i>Erwinia psidii</i>	gapA	100%

Os genes correlacionados, segundo o mesmo banco, envolvidos nas sequências dos isolados bacterianos avaliados são *gapA*, *gapDH*, *rpoB* e *r4-368*, podendo estes variarem entre patógenos bacterianos distintos, como é o caso do que se pôde perceber com relação aos isolados LPFG_028 e LPFG_038. Como no exemplo citados, os isolados diferem quanto ao patógeno, porém, apresentam o mesmo gene. Também cabe ressaltar que, embora se tratem de patógenos diferentes, esses pertencem ao mesmo grupo e expressam o mesmo sintoma, como foi comprovada a caracterização patogênica anterior realizada. Fenotipicamente não é possível ver diferenças entre os sintomas causados por *Erwinia psidii* e *Pantoea eucalypti*, o que reafirma o complexo formado.

Este é o primeiro relato do complexo de enterobactérias causadoras de seca de ponteiros do *Eucalyptus* spp., através da literatura percebe-se que em outros locais a doença foi relatada apenas como sendo causada por *Erwinia psidii* de forma individual tanto em eucalipto (ARRIEL et al., 2014) recentemente, bem como, em goiaba anteriormente (RODRIGUES NETO et al., 1987). Os genes *gapA*, *recA*, *rpoB* utilizados neste estudo para identificação de *Erwinia psidii* vem sendo utilizados em outros trabalhos envolvendo o grupo das enterobactérias (LAWRENCE et al., 1991; BROWN et al., 2000; GEIDER et al., 2006 e 2009; COUTINHO et al., 2011; ARRIEL et al., 2014). Além disso, a fim de não limitar as análises apenas para esta bactéria já relatada, utilizou-se do *primer* genérico com a região 16S a fim de rastrear as demais bactérias, pois esta região abrange um maior número de patógenos bacterianos (WALERON et al., 2002; BRADY et al., 2008 e 2009).

A identificação correta do patógeno mostra o potencial de destruição dos mesmo, por se tratar de um complexo bacteriano ainda tão pouco estudado, podendo vir a se tornar um fator limitante na produção da eucaliptocultura, como é o caso de murcha-de-*Ralstonia*, descrita anteriormente como uma grande causadora de prejuízos para viveiros. Em goiaba, as principais medidas de controle recomendadas para apenas *E. psidii* são o corte e a destruição dos ramos atacados (MARQUES et al., 2007). Entretanto, em eucalipto essas medidas não são viáveis devido as extensas áreas cultivadas e principalmente em virtude do porte das árvores (ARRIEL et al., 2014).

A diferenciação das espécies que formam o complexo bacteriano então é importante, com a maior eficiência e rapidez por meio de técnicas moleculares. A

formação de complexos bacterianos dificultam muitas das vezes o controle químico, uma vez que não se trata apenas de um patógeno causador da doença e sim um composto. Por isso, o avanço dos estudos moleculares é de extrema importância para entender o comportamento da doença, bem como, para trazer respostas com relação à resistência do hospedeiro ao ataque do patógeno. A caracterização molecular dos quarenta e dois isolados reforçou a importância do estudo em questão, acrescentando *Pantoea eucalypti* como causadora da seca de ponteiros em eucalipto. Tal patógeno ainda não havia sido descrito como potencial patógeno na cultura em questão, no Brasil. Segundo BRADY et al. (2009), a atribuição dos sintomas de seca de ponteiros na eucaliptocultura na África do Sul, foi causada por gêneros de *Pantoea*, dentre esses *Pantoea eucalypti*. Porém, no estudo em questão não existiu-se a possibilidade do complexo de bactérias causando a doença.

Sendo assim, o complexo de enterobactérias é descrito como causador de doenças em eucalipto e compreende a necessidade de maiores estudos a fim de entender essa correlação entre as bactérias já descritas. Por fim, responde-se a principal questão relacionada ao presente trabalho, que os sintomas encontrados da seca de ponteiro devem ser atribuídos entre a interação bacteriana de *Erwinia psidii*, *Pantoea eucalypti* e de menor forma, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* spp.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL et al., Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25: 3389-3402. 1997.
- APPRILL et al., Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11. **Aquat Microb Ecol.** 75: 129-137. 2015.
- ARRIEL, D. A. A. et al., Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. **Forest Pathology.** 44: 255-265. 2014.
- BRADY et al., Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). **Syst Appl Microbiol.** 31:447-460. 2008.
- BRADY, et al. *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov. and *Pantoea anthophila* sp. nov. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v. 10, n. 59, p.2339-2345, maio 2009. Trimestral. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19620357>>. Acesso em: 15 maio 2019.

- BROWN et al., Phylogenetic relationships of necrogenic *Erwinia* and *Brenneria* species as revealed by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **J Syst Evol. Microbiologic.** 50:2057-2068. 2000.
- COUTINHO et al., A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. **Australasian Plant Pathol** 40:55-60. 2011.
- GEIDER K., AULING G., JAKOVLJEVIC V., VÖLKSCH B. A polyphasic approach assigns the pathogenic *Erwinia* strains from disease pear trees in Japan to *Erwinia pyrifoliae*. **Lett Appl Microbiol** 48:324-330. 2009.
- LAWRENCE J.G, OCHMAN H, HARTL DL, Molecular and evolutionary relationships among enteric bacteria. **J Gen Microbiol** 137: 1991-1921. 1991.
- LOUWS, F. J. RADEMAKER, J.L.W., DE BRUIJN, F. J. The three DS of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology.** 37:81-125. 1999.
- MAFIA, R. G; ABAD, J. I. M.; FERREIRA, M. A. Desafios e perspectivas para o controle de doenças do eucalipto. In: SANTOS, Bárbara Alves dos et al. **Patologia florestal: Desafios e perspectivas.** Lavras: Lavras: Núcleo de Estudos em Fitopatologia, 2013. Cap. 15. p. 119-133. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/324656888_Desafios_e_perspectivas_para_o_controle_de_doencas_do_eucalipto>. Acesso em: 12 mar. 2019.
- MARQUES et al., Seca de ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: níveis de incidência e aspectos epidemiológicos. **Rev Bras Frutic** 29: 488-493. 2007.
- MORA A.; GARCIA C. A cultura do Eucalipto no Brasil. 1 ed. São Paulo, **Sociedade Brasileira de Silvicultura**, 2000.
- MOURA, A. L. & GARCIA C. H. **A Cultura do Eucalipto no Brasil.** São Paulo/SP, 2000.
- PARADA et al. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for manire microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environ Microbiol.** 1043-1414. 2015.
- PEREIRA, I.S. Amplificação de DNA por PCR. In: Azevedo, M.O., FELIPE, M. S. S., BRÍGIDO, M.M, MARANHÃO, A.Q., SOUZA, M.T. (Eds). **Técnicas básicas em Biologia Molecular.** Brasília. Editora UnB. 99-110. 2003
- RODRIGUES NETO J, ROBBS CF, YAMASHIRO T. A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. **Fitopatol Bras.** 12:345-350. 1987.
- SILVA, J. C.; CASTRO, V. R. DE; XAVIER B. A. **Eucalipto Manual Prático do Fazendeiro Florestal: produzindo madeira com qualidade.** 2ª ed. 72 p. Viçosa, 2008.

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. & LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Reserch.** 1991.

WALERON et al., Genotyping of bacteria belonging to the former Erwinia genus by PCR-RFLP analysis of a recA gene fragmente. **Microbiology.** 148:583-595. 2002

WALTERS et al., Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer market gene primers for microbial community surveys. **American society for Microbiology.** 1-10. 2016.

CAPÍTULO 3 - ESTUDO DO COMPORTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DAS BACTÉRIAS CAUSADORAS DA NECROSE APICAL E SECA DE PONTEIROS EM MINICEPAS DE VIVEIRO DE PRODUÇÃO DE MUDAS DE EUCALIPTO

Autores: Daniella Flávia Said Heid Schettini Silva, Edson Luiz Furtado, Celso Luis Marino, Anderson Bobko, Sharlles Dias e Luciano Flávio Neves

RESUMO

A formação de uma floresta depende, dentre outros fatores, da qualidade das mudas plantadas e essa pode ser avaliada de acordo com parâmetros quantitativos, como altura e diâmetro, bem como, qualitativos, como o aspecto fitossanitário. Dentre as doenças descritas em viveiros, pode-se citar as de origem fungicas, como *Rhizoctonia solani* e *Botrytis cinerea* e as bacterianas, como marchas vasculares causadas por *Ralstonia solanacearum*, manchas foliares atribuídas a *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas* spp. e a bactéria causadora da necrose apical e seca de ponteiros em mudas e minicepas. O controle das doenças bacterianas em viveiro é importante, pois é o ambiente de início da formação das florestas, além da maior facilidade do controle de doenças do que no campo. O estudo em questão desenvolveu escala de atribuição de notas para avaliação de incidência e severidade da bactéria causadora da necrose apical e seca de ponteiros em viveiros, bem como, realizou estudos epidemiológicos, avaliação de danos, perdas e de controle da mesma nesse ambiente. Diante disso, conclui-se que a bacteriose em questão não é de incidência anual, tendo sido relatada nos meses de fevereiro, março, abril, maio e dezembro do ano de estudo. A doença foi capaz de reduzir em 20% a produção de brotos por minicepa infectada, gerando uma perda de cerca de R\$2300,00 por mês de incidência. Temperaturas mais altas foram propícias ao desenvolvimento do patógeno, bem como, a incidência de chuvas. Tal fato pode ser explicado por conta do molhamento foliar, que facilita a disseminação do patógeno de plantas doentes para sadias. Ademais, o controle químico não foi eficiente, o que demonstra a importância dos estudos genéticos.

Palavras-chave: Sazonalidade. Incidência. Severidade. Bactérias. *Eucalyptus* spp.

ABSTRACT

The formation of a forest depends, among other factors, on the quality of the planted seedlings and this can be evaluated according to quantitative parameters, such as height and diameter, as well as qualitative, such as phytosanitary aspect. Among the diseases described in nurseries, there are those of fungal origin, such as *Rhizoctonia solani* and *Botrytis cinerea* and bacterial origin, such as vascular wilt caused by *Ralstonia solanacearum*, leaf spots attributed to *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas* spp. e the bacterium that causes die back. The control of bacterial diseases in the nursery is important, since it is the beginning environment of the forest formation, besides being easier to control diseases in nursery compared to the field. In this study, a rating scale was developed to evaluate the incidence and severity of the bacterium that causes die back in nurseries, and epidemiological studies, damage assessment, loss and disease control were performed. Therefore, it was concluded that this bacteriosis is not of annual incidence and was reported in the months of February, March, April, May and December of the study year. The disease was able to reduce the production of sprouts per infected minicep by 20%, generating a loss of about R\$2300,00 per month of incidence. Higher temperatures were favorable for the pathogen development, as well as the incidence of rainfall. This can be explained by leaf wetness, which facilitates the spread of the pathogen from sick to healthy plants. Moreover, chemical control was not efficient, which demonstrates the importance of genetic studies.

Keywords: Seasonality. Incidence. Severity. Bacteria. *Eucalyptus* spp.

3.1 INTRODUÇÃO

A importância da produção de plantios florestais formados por eucalipto no Brasil pode ser avaliada pela participação do setor florestal na economia do país. Tecnologia e inovação são fatores-chaves para o sucesso da competitividade da cultura (FOEKEL, 2005). Dentre os ganhos obtidos com a eucaliptocultura podemos destacar a relação da produtividade silvicultural do gênero, que dentre outros fatores, pode ser explicada com a utilização da técnica de propagação vegetativa de materiais genéticos selecionados, ou seja, da obtenção de mudas de eucalipto através de práticas de estaqueamento de material genético em viveiros de produção.

A introdução da técnica de propagação vegetativa em viveiros clonais auxiliou a formação de plantios com maior produtividade, uniformidade, a melhoria da qualidade da madeira, controle de fatores de produção e, principalmente, a multiplicação de indivíduos resistentes a pragas e doenças, alinhados ao melhoramento genético. No viveiro florestal é possível produzir mudas que atinjam padrões de qualidade importantes para a formação de florestas em campo.

Além dos padrões estabelecidos tais como altura de parte aérea, rusticidade e diâmetro de coleto, o aspecto fitossanitário constitui uma das características mais importantes, pois doenças bióticas podem comprometer a produção de mudas em todas as suas fases, assim como, o estabelecimento e desenvolvimento dessas no campo. Tal fato torna-se importante pois uma muda de *Eucalyptus* spp. fenotipicamente sadia em viveiro pode demonstrar sintomas e causar perdas significativas em campo, ou seja, ela pode de maneira silenciosa introduzir o patógeno em áreas de plantio, embora no viveiro não apresente perdas significativas.

Sendo assim, existe a necessidade do acompanhamento da evolução das doenças, a fim de servir como tomada de decisão, bem como, prever o aparecimento destes intemperes ao longo do ciclo da eucaliptocultura. Por isso, no manejo integrado de doenças deve-se considerar a premissa de adoção de um sistema preventivo desses patógenos, ou seja, com início na produção das mudas de eucalipto, em viveiro. A detecção dos problemas, principalmente no caso de doenças causadas por bactérias, em sua fase inicial, bem como, uma correta diagnose e a implantação de medidas eficientes de manejo reduzem as perdas e facilita o controle (MAFIA et al., 2013). Para os patógenos bacterianos, o controle das doenças que esses são capazes

de causar ainda em viveiro são de extrema importância, pela facilidade de sua disseminação e pelo seu difícil controle.

A adoção de práticas que resultem na prevenção e eliminação das fontes de inóculo em viveiros são importantes (GONÇALVES, 2014), pois além de serem o início da formação dos plantios florestais, pode-se dizer que as medidas de controle apresentam maior eficiência do que a aplicação de produtos químicos. O estudo comportamental de uma doença é primordial para o entendimento da dinâmica da mesma, podendo assim atuar em medidas de erradicação e controle da mesma.

Dentre essas medidas, cabe-se destacar a efetuação de sistemas de monitoramento das doenças como forma de tomada de decisão, pois o uso de ferramentas epidemiológicas pode indicar os períodos de possíveis surtos da doença, minimizando assim as perdas no viveiro (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 2011). O estudo do ambiente como fator destaque para introdução da doença é de extrema importância, pois sabe-se que as condições climáticas podem afetar o desenvolvimento e a suscetibilidade da planta hospedeira, a multiplicação e a sobrevivência do patógeno e a interação entre ambos (JESUS JUNIOR et al., 2007; VALE et al., 2004).

Sendo assim, o zoneamento de áreas de risco ao estabelecimento de doenças permite explorar o princípio de escape (AGRIOS, 2005), sendo possível definir o risco de ocorrência de uma determinada doença em uma região (VALE et al., 2004). Diante dessa premissa, tem-se por objetivo desenvolver um sistema de obtenção de dados epidemiológicos de temperatura e precipitação anual que influenciam no comportamento da bactéria causadora de seca de ponteiros em eucalipto, bem como, a dinâmica da mesma, para assim subsidiar na tomada de decisão de práticas de manejo fitossanitário no viveiro.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Criação de escala de avaliação para estimativa da severidade do ataque causado pelo complexo de enterobactérias

Através dos históricos de ataque do complexo bacteriano em estudo no viveiro de produção de mudas de *Eucalyptus* spp. localizado na cidade de Andradina, São Paulo, bem como, dos levantamentos realizados durante a coleta de material vegetal, fez-se necessário desenvolver uma escala avaliativa da progressão dos sintomas. Tal escala serviu como base para avaliação da evolução da severidade da doença durante um período de um ano (Figura 1).

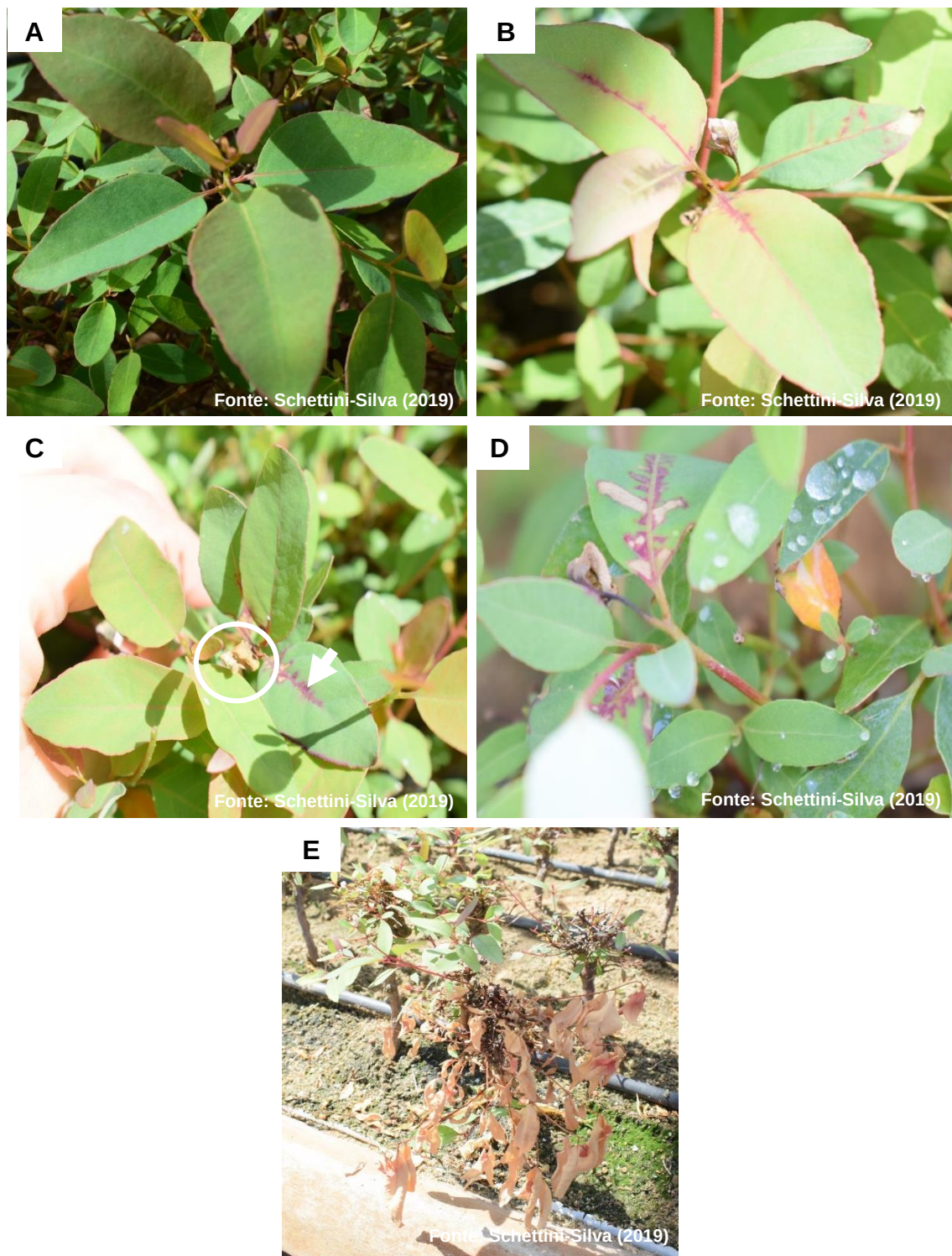
A escala foi desenvolvida com base nos sintomas encontrados em minicepas contaminadas utilizadas para a propagação vegetativa de um clone suscetível à doença (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). Futuramente, essa servirá como ferramenta de tomada de decisão para medidas de controle e manejo do complexo de enterobactérias na eucaliptocultura, em viveiro de produção de mudas.

Os sintomas foram observados nas minicepas plantadas em canaletões. A escolha desse método de avaliação da severidade da bacteriose se deu como base no fato de que o sintoma raramente é encontrado em mudas já em áreas de expedição para o campo. Sendo assim, foram atribuídas as seguintes notas na escala avaliativa (Tabela 1):

Tabela 1 - Escala de notas atribuídas na avaliação da severidade do complexo de enterobactérias em minicepas no viveiro de eucalipto

Nota	Descrição
0	Sem sintomas visuais do complexo bacteriano
1	Arroxamento inicial da nervura principal da estaca
2	Arroxamento da nervura principal seguido da seca dos ponteiros
3	Necrose da nervura principal e seca dos ponteiros
4	Seca total da planta e posterior morte da minicepa

Figura 1 - Escala de avaliação de severidade da bacteriose causadora de necrose apical e seca de ponteiros em minicepas de eucalipto. A) Nota 0; B) Nota 1; C) Nota 2; D) Nota 3 e E) Nota 4



3.2.2 Estudo do comportamento epidemiológico do complexo de enterobactérias em viveiro

De posse da escala para avaliação da severidade da doença, durante o período de fevereiro de 2018 a fevereiro de 2019 foram realizadas avaliações quinzenais da progressão da doença. Tal experimento foi instalado em um canaletão com aproximadamente 2.100 minicepas do clone suscetível a doença, material genético resultante do cruzamento entre *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. O experimento foi realizado no viveiro de mudas na cidade de Andradina, São Paulo e a escolha do canaletão se deu como base em censos anteriores, no ano de 2017, onde a incidência da doença chegou em quase 70% do mesmo.

Ao início das avaliações, o canteiro foi dividido em trinta e cinco parcelas de aproximadamente 60 minicepas por parcelas, com tamanho de 1,20 x 0,80 m². A divisão foi feita a fim de compreender a forma de disseminação da doença de uma minicepa para outra, de acordo com o espaço e também, o tempo. Sendo assim, quinzenalmente, aplicava-se a escala de avaliação para cada minicepa dentro da parcela, atribuindo uma nota média de acordo com as estacas com sintoma do complexo de enterobactérias.

Posteriormente, o avaliador demarcava o material vegetal contaminado, bem como, o número de estacas com sintomas e coletava esse material para análises laboratoriais. A análise laboratorial era feita através do isolamento indireto das estacas, a fim de comprovar a origem do patógeno. O objetivo final então foi, além da atribuição de notas, avaliar a média de estacas prejudicadas pelo ataque da doença e a resposta da planta ao ataque. Portanto, as avaliações auxiliarão do entendimento do modo de infecção, bem como, no estudo da dinâmica da doença.

Ademais, foram coletados durante o mesmo período de avaliação os dados meteorológicos das estações climáticas instaladas no mesmo local, a fim de compreender o efeito de fatores como temperatura e umidade relativa poderiam afetar o desenvolvimento do patógeno.

3.2.3 Avaliação da eficiência de métodos de controle químico para o complexo de enterobactérias em viveiro

O estudo em viveiro buscou avaliar a eficiência de métodos de controle químico do complexo patogênico avaliado em questão. Testou-se a eficácia dos métodos curativos após a instalação da doença em níveis de severidade elevados, bem como, com incidência acima de 30% em canteiros com minicepas utilizadas para propagação vegetativa. Ao todo, foram testados dois produtos químicos, Kasumin - da Arysta LifeScience e o Bion 500WG – da Syngenta.

Sendo assim, para a realização do experimento, foram instaladas quatro parcelas de de 1,20 x 0,80 m² por produto, sendo essas em canteiro de clone anteriormente descrito como suscetível à doença. Das quatro parcelas, três foram utilizadas para aplicação do produto, conforme recomendação dos fornecedores e uma serviu como testemunha das análises visuais de surgimento de sintomas da doença. O experimento proposto teve a duração de aproximadamente dois meses e foram realizadas aplicações quinzenais dos produtos avaliados. Ao final do mesmo, o objetivo era entender a eficácia do controle químico em minicepas contaminadas, com a diminuição da incidência e severidade da doenças nas mesmas.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o decorrer dos doze meses de avaliação, a primeira análise realizada foi com relação ao padrão de distribuição da doença. Através das parcelas, os mapas de distribuição da disseminação do complexo de enterobactérias mostram um padrão de dispersão agregado (Figura 2). O padrão mostra o fato de plantas doentes muito próximas umas das outras, como em forma de reboleira, indicando uma correlação entre plantas sintomáticas da área (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 2011). Possivelmente, a disseminação da doença pode ocorrer através de aberturas naturais e/ou ferimentos na planta.

Assim, no caso de viveiro, confirma a importância das medidas eficazes de manejo fitossanitário serem colocadas em prática, a fim de minimizar as possíveis fonte de inóculo do patógeno. Dentre essas, a esterilização das tesouras de poda, que podem ser portas de entrada do patógeno na planta, através do ferimento causado pelas mesmas (ALFENAS et al., 2009).

Figura 2 - Forma de distribuição da doença em canteiro de minicepas de eucalipto

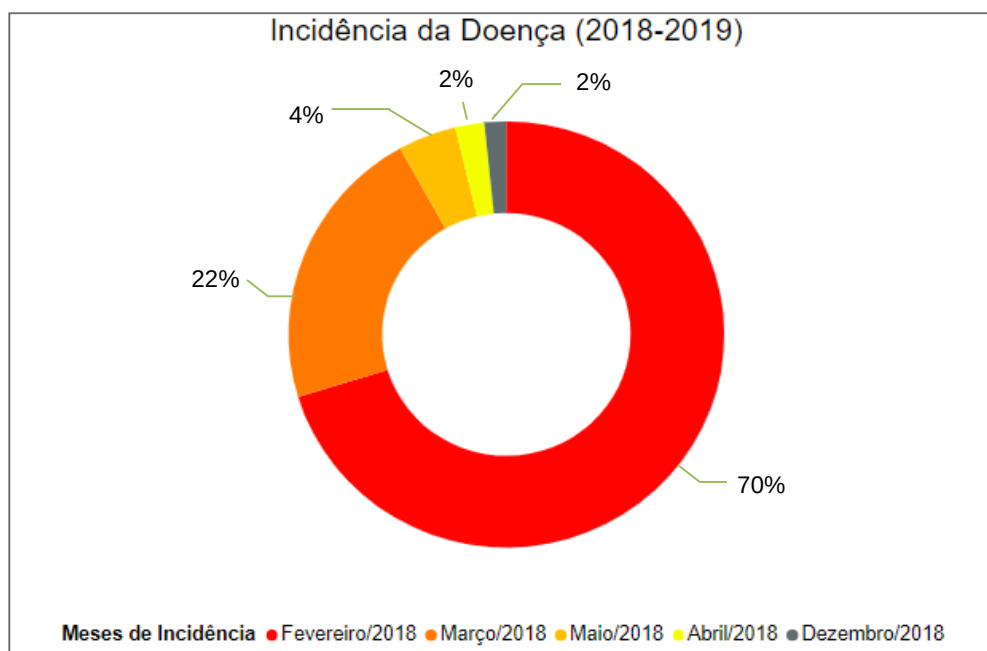


Com relação a incidência da doença no canteiro como um todo, durante o período de doze meses de avaliações foram observados sintomas em 185 minicepas de propagação vegetativa diferentes, totalizando assim aproximadamente 9% do material plantado como um todo. Ademais, também foi contabilizada uma porcentagem de mortalidade de minicepas no canteiro de aproximadamente 2,43%, sendo apenas 1% atribuídos à doença em si.

Além disso, com relação à incidência da doença os sintomas da bacteriose só foram observados nas minicepas durante os meses de fevereiro, março, abril, maio e dezembro do ano de 2018 (Figura 3). Através desses dados percebe-se que o complexo de enterobactérias, em viveiro, não apresenta sintomas constantes ao longo do ano. Porém, é importante destacar que as minicepas demarcadas confirmam o patógeno no material propagativo, ou seja, o patógeno possivelmente encontra-se de forma endofítica, podendo expressar sintomas da doença de acordo com condições favoráveis à doença.

Isso prova a importância da evolução dos estudos com relação a transmissão da doença de mudas sem sintomas visuais da doença para campo, uma vez que observa-se que mesmo sem os sintomas da doença a mesma existe e pode levar a alta mortalidade em campo.

Figura 3 - Incidência da bacteriose causadora de necrose apical e seca de ponteiros em viveiro de produção de mudas de eucalipto

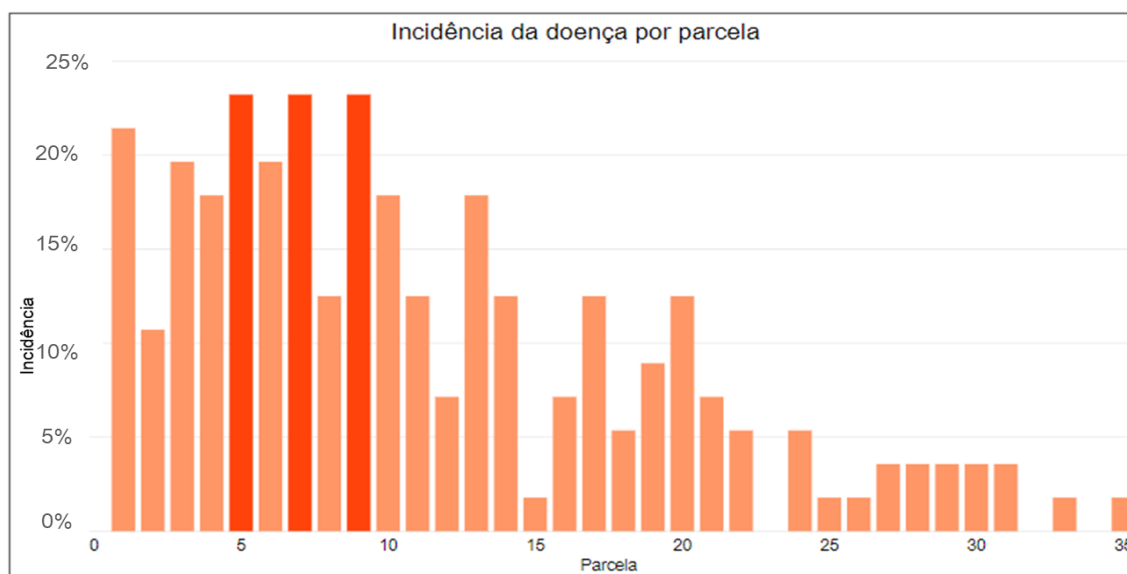


Fonte: Schettini-Silva (2019)

Com relação as parcelas de avaliação, percebe-se que dentro das parcelas as de maior incidência da doença foram as parcelas 5, 7 e 9, com incidência de aproximadamente 23% das minicepas presentes nas mesmas com sintomas evidentes da doença (Figura 4).

Além disso, durante o período de avaliação observou-se também que três parcelas mantiveram-se sem sintomas do mesmo patógeno, sendo essas as parcelas 23, 32 e 34. Tal fato pode ser explicado de acordo com a estrutura do viveiro estudado, principalmente com relação as variações de luminosidade do local. Parcelas em que houveram a menor incidência de luz, possivelmente tiveram a menor quantidade de minicepas contaminadas.

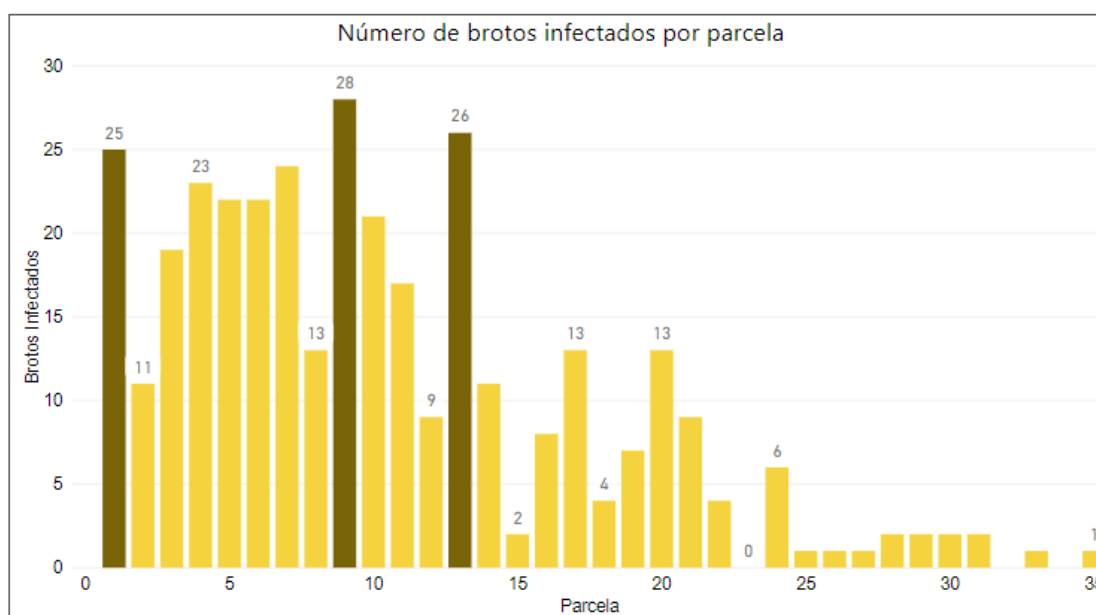
Figura 4 - Porcentagem de minicepas infectadas ao longo do ano por parcela de avaliação



Fonte: Schettini-Silva (2019)

Com relação aos brotos infectados nas trinta e cinco parcelas, de um total de 185 matrizes confirmadas com sintomas da doença, houve um total de 350 brotos doentes (Figura 5).

Figura 5 - Total de brotos das minicepas contaminadas ao longo de um ano



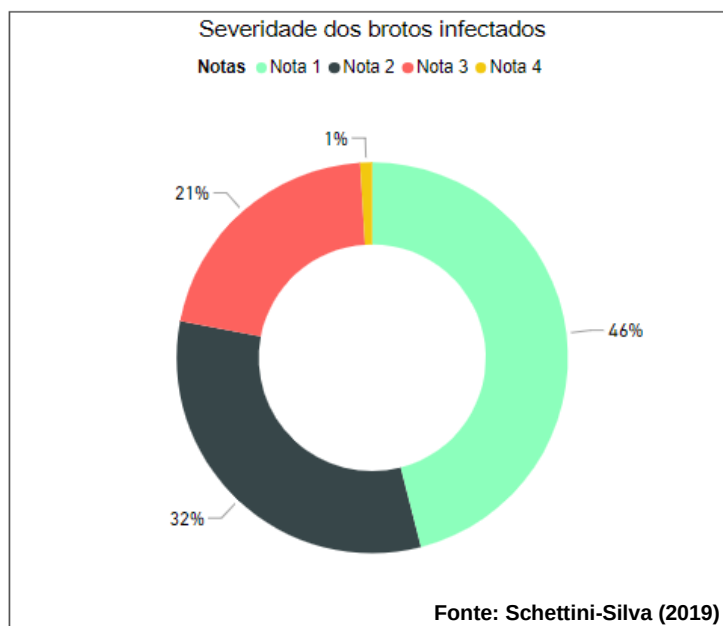
Fonte: Schettini-Silva (2019)

Assim, conclui-se que uma matriz contaminada produz em média dois brotos infectados pela doença, o que futuramente será descartado e não utilizado durante o procedimento de coleta de estaca para produção de muda. Considerando então que em média uma matriz saudável produz 10 brotos mensalmente, há uma perda de 20% em produção de brotos por matriz. Em larga escala, considerando então uma produção de 21.000 brotos/mês em todo o canteiro, temos uma perda de produção de 4.200 brotos mensais, que em média corresponde ao valor de R\$2100,00 com relação à perda de mudas, considerando o valor mínimo da muda de pelo menos R\$0,50 ao final da produção.

Ademais, avaliando a severidade da doença nos brotos infectados através da escala de notas atribuídas, percebeu-se que grande parte dos mesmos encontrava-se em nota 1 da escala, ou seja, no início da expressão de sintomas pelo complexo de enterobactérias (Figura 6). Esse fato pode ser explicado com relação ao tempo de avaliação, ou seja, as mesmas foram quinzenais e logo após a avaliação os brotos contaminados eram retirados e enviadas para avaliação laboratorial.

Além disso, a utilização da escala comprova a necessidade em, após a verificação da doença, acompanhar a evolução da mesma, a fim de permitir a aplicação das medidas de controle e erradicação do patógeno. Por fim percebe-se que a minicepa, embora tenha uma perda considerada, consegue conviver com a doença, uma vez que a porcentagem de mortalidade de causada foi baixa.

Figura 6 - Severidade dos brotos infectados através da avaliação por escala de notas



Legenda:

Nota 1 – Arroxamento inicial da nervura principal da estaca

Nota 2 – Arroxamento da nervura principal seguido da seca de ponteiros

Nota 3 – Necrose da nervura principal e seca dos ponteiros

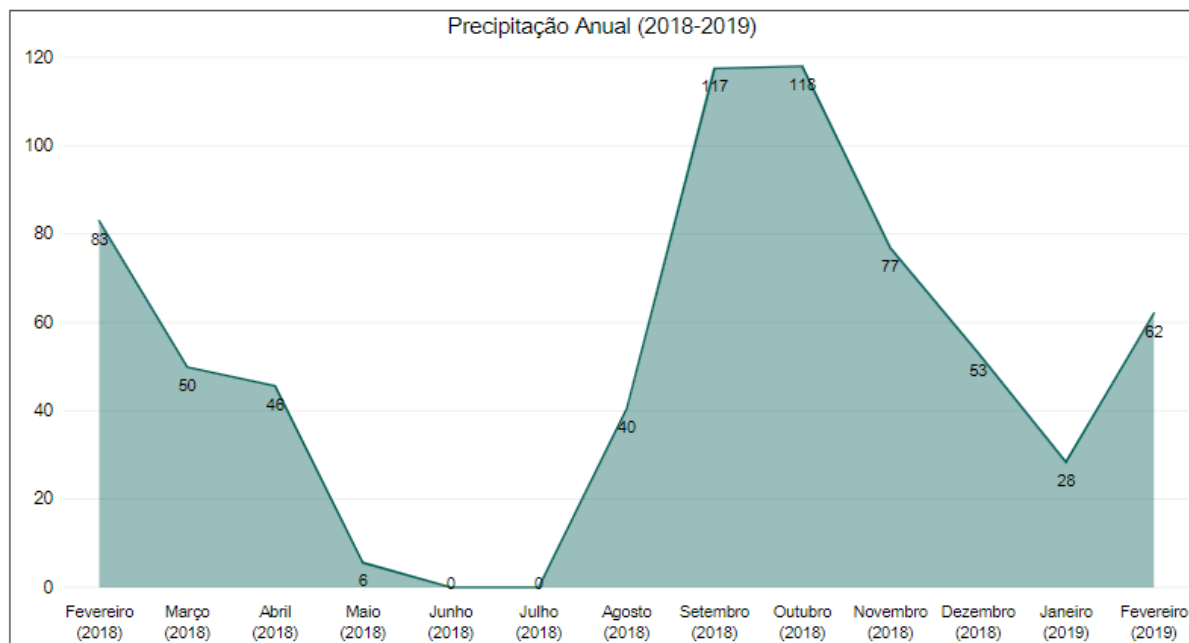
Nota 4 – Seca total da planta e posterior morte da minicepa

Por fim, buscou-se o entendimento da influência das condições meteorológicas no comportamento do patógeno através do uso dos dados obtidos na estação presente no viveiro. Sendo assim, com relação a precipitação anual (mm) observou-se que nos meses de setembro e outubro de 2018 foram os de maior incidência de chuvas na área e que nesse mesmo período não houve incidência da doença (Figura 7).

Ademais, nos períodos de maior incidência da doença, percebeu-se que em fevereiro de 2018 a precipitação foi de aproximadamente 82,90 mm e que nos meses seguintes a mesma foi diminuindo. Porém, em dezembro de 2018 também houve incidência da doença bem próximo ao encontrado em maio do mesmo ano e o valor de precipitação desses mesmos foi bastante distinto.

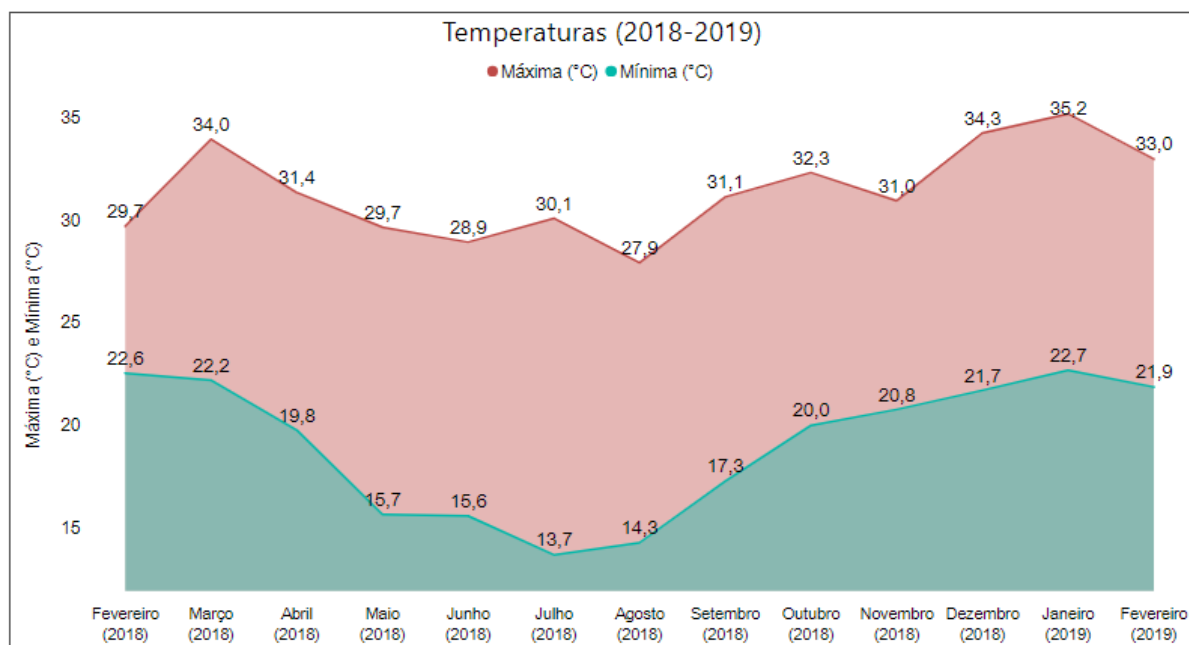
No quesito temperaturas máximo e mínimo, percebeu-se que temperaturas mais altas, próximas à 29°C são mais propícias ao desenvolvimento da doença (Figura 8).

Figura 7 - Precipitação anual no viveiro de produção de mudas de eucalipto



Fonte: Schettini-Silva (2019)

Figura 8 - Temperaturas (°C) máxima e mínima durante o ano em viveiro de produção de mudas de eucalipto



Fonte: Schettini-Silva (2019)

Sendo assim, percebeu-se que o patógeno avaliado incide em períodos em que houve ocorrência de chuva, podendo agir como formas de transmissão do complexo de enterobactérias de matrizes contaminadas para sadias, através do molhamento foliar. Ademais, em ambientes mais quentes, com temperaturas mais altas também leva a propensão de maior incidência da doença.

Diante de todas as informações apresentadas, conclui-se que a necrose apical e a seca de ponteiros causada pelo complexo de enterobactérias em viveiros de eucalipto, embora não seja de ocorrência anual, causa prejuízos consideráveis ao processo de produção.

Além disso, percebe-se que, embora pequena, existe uma correlação principalmente entre os valores de temperatura, ou seja, em ambientes mais quentes há a maior propensão à doença estudada. Assim, confirma a necessidade de se aplicarem medidas eficazes de fitossanidade em viveiro, para não disseminar o patógeno, bem como, a erradicação de brotos doentes e o monitoramento das minicepas que anteriormente apresentaram sintomas.

Ademais, a confirmação do ambiente como principal medida de controle da doença é dada quando, ao serem realizados os experimentos de controle químico da doença, não foi possível perceber eficácia nos mesmos, uma vez que as matrizes contaminadas eram poucas, o que mostra um desperdício de produto e um gasto desnecessária, além dos sintomas não serem anuais e em pequena escala. Portanto, o controle do ambiente, tornando o mesmo desfavorável à doença é mais eficaz do o controle químico.

Além desse controle, a longo prazo, percebe-se a necessidade da utilização das ferramentas voltadas a biotecnologia para realização de estudos mais aprofundados a respeito do mecanismo de defesa do clone estudado, bem como, genes que envolvem a resistência do mesmo a doença estudada, como o caso dos estudos já realizados para *Puccinia psidii*, a fim de que esta seja um resultado importante para a utilização do clone sem causar tantas perdas em viveiro.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 6 ed. San Diego: Academic Press, 2005. P. 489-498.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 442 p. Viçosa, MG: Editora UFV, 2009.
- BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. Manejo integrado de doenças. In: Amorim, L.: Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A. (Eds) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 409-419. 2011.
- FOELKEL, C. E. B., Eucalipto no Brasil: História de pioneirismo. **Visão Agrícola**, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, v. 4, n. 1, p.66-69, dez. 2005. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va04-florestas-plantadas03.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2018.
- GONÇALVES, J. de Lima. **Sazonalidade de ocorrência de mofo cinzento, oídio e manchas bacterianas foliares em dois viveiros de produção de mudas clonais de eucalipto**. 2014. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência Florestal, Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp, Botucatu, 2014. Cap. 1. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/108734>>. Acesso em: 24 set. 2018.
- JESUS JUNIOR, W.C., CECILIO, R.A., VALADARES JUNIOR, R., COSMI, F.C., MORAES W.B., ALVES, F.R., NEVES, C.I. Aquecimento global e o potencial impacto na cultura e doenças do mamoeiro. In: Costa, A.N., Costa, A.F.S. **Congresso Brasileiro de Fruticultura Tropical**. p. 1-36. Vitória: INCAPER, 2007.
- MAFIA, R. G; ABAD, J. I. M.; FERREIRA, M. A. Desafios e perspectivas para o controle de doenças do eucalipto. In: SANTOS, Bárbara Alves dos et al. **Patologia florestal: Desafios e perspectivas**. Lavras: Lavras: Núcleo de Estudos em Fitopatologia, 2013. Cap. 15. p. 119-133. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/324656888_Desafios_e_perspectivas_para_o_controle_de_doencas_do_eucalipto>. Acesso em: 12 mar. 2019.
- MORA A.; GARCIA C. A cultura do Eucalipto no Brasil. 1 ed. São Paulo, **Sociedade Brasileira de Silvicultura**, 2000.
- VALE, F.X.R.; JESUS JUNIOR, W.C.; ZAMBOLIM, L. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil Editora, 532p., 2004.

CAPÍTULO 4 - ESTUDO DO COMPORTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO E QUANTIFICAÇÃO DE DANOS E PERDAS POR BACTÉRIAS CAUSADORAS DE NECROSE APICAL E SECA DE PONTEIROS EM PLANTIOS DE EUCALIPTO

Autores: Daniella Flávia Said Heid Schettini Silva, Edson Luiz Furtado, Celso Luis Marino, Anderson Bobko, Sharlles Dias e Luciano Flávio Neves

RESUMO

Diante da crescente utilização de madeira de eucalipto para diversos fins, faz-se necessário entender os fatores que interferem diretamente na produtividade dos mesmos. Patógenos e insetos são intempéries associados aos plantios de eucalipto, por isso, faz-se necessário a realização de estudos que possam minimizar as perdas causadas por esses. No caso das bactérias, dentre essas a causadora da necrose apical e seca de ponteiros em plantios de eucalipto, buscou-se compreender fatores que interferem na dinâmica da doença, como a sazonalidade do ambiente. A metodologia utilizou-se de escala de notas para avaliação da severidade da doença ao longo de um ano. Foram avaliados também o número de ciclos do patógeno, característico com a tortuosidade da árvore, bem como, a existência de correlação entre o número de bifurcações da árvore e a presença de patógenos secundários com a bacteriose avaliada. Ao final das avaliações também foram realizados inventários parciais de dois anos de plantio. Para isso, foram escolhidas duas áreas experimentais, com o mesmo clone plantado, diferindo entre elas apenas dois meses de plantio em regiões próximas. Ao final do experimento percebeu-se que para ambas as áreas o número de bifurcações na árvore não apresentava associação com a presença do patógeno. Ademais, a primeira área apresentou menor número de ciclos da doença, porém, com severidade alta ao longo do ano e uma mortalidade biótica de aproximadamente 18,20% por conta da doença. Considerando um hectare de floresta, ao todo foram perdidas cerca de 236 árvores. A segunda área, apresentou maior número de ciclos, porém, severidade baixa ao longo do mesmo período e também baixa mortalidade atribuída a doença, totalizando 2,80%. A doença ocorreu em ambos os casos durante todo o ano. Houve diferença nos valores de circunferência a altura do peito (CAP) para árvores com severidade alta da doença, bem como, diminuição do volume das mesmas.

Palavras-chave: Bactérias. Seca de ponteiros. Severidade. Perdas. *Eucalyptus* spp.

ABSTRACT

Given the increasing use of *Eucalyptus* wood for various purposes, it is necessary to understand the factors that directly affect their productivity. Pathogens and insects are problems associated with eucalyptus plantations, so it is necessary to carry out studies that can minimize the losses caused by them. In the case of bacteria, it is necessary to understand factors that interfere with the dynamics of the disease, such as the seasonality of the environment. Therefore, a grade scale was proposed to evaluate the severity of the bacteriosis that cause die back over one year. In addition, in this study, the number of pathogen cycles and the correlation between the number of tree bifurcations and the presence of secondary pathogens were evaluated. Furthermore, at the end of the study, partial inventories of two areas under study were performed. For this, two experimental areas were chosen, with the same clone planted, differing between them only two months of planting. It was observed that the number of bifurcations in the tree was not associated to the presence of the pathogen in both areas. In addition, the first area had a smaller number of disease cycles, but with greater severity throughout the year, reaching a biotic mortality of approximately 18.20% due to the disease. Considering one hectare of forest, a total of 236 trees were lost. The second area had a higher number of cycles, however, with low severity over the same period and also low mortality attributed to the disease, totaling 2.80%. The disease occurred in both areas throughout the whole year. circumference values at chest height were different for trees with high disease severity, as well as decreased volume of the trees.

Keywords: Bacteria. Die Back. Severity. Losses. *Eucalyptus* spp.

4.1 INTRODUÇÃO

Em virtude da demanda crescente de madeira, tornou-se necessário garantir a produção de *Eucalyptus* spp., levando ao constante investimento em processos que aumentem a produtividade das espécies e dos híbridos (TAKAHASHI, 2012), em termos de quantidade, porém, sem perder a qualidade. O principal desafio é desenvolver e aplicar, de forma prática e em larga escala espacial e temporal, tecnologias que evitem as perdas. Nesse caso, é importante destacar as perdas causadas por fatores bióticos e abióticos, ao longo de todo o processo (MAFIA et al., 2011).

As doenças e os insetos são os principais fatores biológicos associados aos plantios de eucalipto, com potencial de causar danos econômicos às plantações. Os insetos normalmente são controlados por intervenções biológicas ou químicas. Já para as doenças, as medidas de controle, na grande maioria dos casos, são feitas de modo preventivo mediante o desenvolvimento, a seleção e a propagação comercial de materiais genéticos resistentes (ASSIS; AGUIAR; ABAD, 2014)

Entretanto, com os esforços imediatos de algumas subáreas florestais, como a silvicultura, o melhoramento, a entomologia e a patologia florestal, têm-se obtido respostas satisfatórias no que se refere à etiologia e ao oferecimento de alternativas de controle, como o caso do monitoramento do ambiente (FERREIRA et al., 2006). Segundo MORAES (2012) o desenvolvimento de doenças de plantas está fortemente ligado ao conhecimento de fatores relacionados ao patógeno, ao hospedeiro e ao ambiente. Cada um desses fatores exerce papel fundamental para o entendimento dos mecanismos que afetam a doença. Entretanto, o ambiente exerce papel preponderante sobre os demais, uma vez que também os influencia.

Por isso, a importância do conjunto de medidas de monitoramento da doença com base em idas a campo, analisando o desenvolvimento dessa, bem como, a adoção de escalas de avaliação em conjunto com os dados epidemiológicos. Tais fatores auxiliam nas práticas de manejo, na prevenção de quando agir em determinadas áreas, podendo assim minimizar perdas e ganhar em produtividade. Os estudos em campo do comportamento dos patógenos são importantes. Dessa forma respondem questões como o comportamento dos materiais genéticos frente a disseminação de um patógeno, em determinada região, bem como, com relação as condições ambientais (ASSIS; AGUIAR; ABAD, 2014).

Segundo ALFENAS E GUIMARÃES (2016) em viveiros de mudas florestais, o controle de doenças é realizado primordialmente por técnicas de manejo que visam erradicar, parcial ou totalmente, as fontes de inóculo fito patogênico, reduzir as condições favoráveis à infecção e favorecer o crescimento das mudas, tornando-as escapes a doenças. No entanto, em caso de incidência de doença, aplicações curativas registrados para a cultura podem fazer parte do manejo integrado, a fim de evitar prejuízos de importância econômica. Já em condições de campo, as medidas de proteção química são menos empregadas na área florestal em função das extensas áreas plantadas e, principalmente, em virtude das dificuldades de aplicação.

Por isso, os estudos do comportamento em campo da doença são importantes, uma vez que servirão como base para tomada de decisões importantes, como no caso da utilização dos princípios de controle de doenças. Dentre esses, destacam-se os que devem ser aplicados para as doenças florestais, os princípios de evasão ou escape, que visam prevenir a doença mediante o estabelecimento da cultura em épocas desfavoráveis ao patógeno ou em áreas onde o inóculo é raro ou inexistente.

Ademais, além de entender as condições ambientais para que a doença ocorra, a compreensão dos danos e perdas causados pelo patógeno também são necessários, uma vez que respondem o potencial do patógeno em causar problemas na cultura. O dano é definido como qualquer redução na quantidade ou na qualidade da produção devido a injúrias causadas pelo patógeno (NUTTER et al., 1991). Posto isso, estimativas confiáveis dos prejuízos causados pelos patógenos são um pré-requisito para o desenvolvimento de qualquer programa bem-sucedido de controle da doença (WALKER, 1983). Os danos silviculturais são avaliados pelos modelos tradicionais, fazendo variar a intensidade de doença em diferentes parcelas e correlacionando estes níveis de severidade com produção e podem ser mensurados pelo percentual de mortalidade de plantas, pela redução volumétrica ou pela qualidade da madeira (FERNANDES, 2012). No caso da bactéria estudada, pouco ainda se sabe a respeito dos verdadeiros danos e perdas causadas pelo ataque do patógeno em plantios de eucalipto.

Diante disso, o zoneamento das áreas, bem como, o entendimento da dinâmica de evolução da doença são passos importantes para o estabelecimento de um plano de manejo integrado para a bacteriose em questão. Sendo assim, a presente etapa do estudo, tem como objetivo desenvolver um sistema de monitoramento e avaliação para a bacteriose causadora de seca de ponteiros e morte em plantios de eucalipto

pré-estabelecido, a fim de auxiliar em tomadas de decisão, bem como, a avaliação das perdas e danos causados por essa ao longo de um dado período.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Avaliação da progressão da doença bacteriana em campo ao longo de um ano

Foram escolhidas duas áreas de plantios do mesmo clone de híbrido entre *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* para realização do presente estudo. As coletas de dados foram realizadas mensalmente durante o período de abril de 2018 a abril de 2019. A primeira área é localizada na cidade de Três Lagoas, no Mato Grosso do Sul, com as coordenadas X=-5777743,61361 e Y=-2272557,18121, com 8 meses de plantio ao início das atividades. A segunda área de avaliação da progressão da doença é localizada na cidade de Inocência, também no estado do Mato Grosso do Sul e a localização do plantio segue as coordenadas X=-5758829,2905 e Y=-2241869,79231. Nesse caso, a área de avaliação possui 10 meses da instalação do plantio, ao início das atividades.

Para a realização da coleta de dados, foram escolhidos em cada uma das áreas de plantio, um talhão que anteriormente apresentou incidência alta da doença avaliada. Dentro desses, foram demarcadas dez parcelas de cinquenta planta em cada, podendo assim no final avaliar a dinâmica da doença no espaço, ao longo do período de um ano. Ou seja, mensalmente foram avaliadas 500 plantas por área experimental. As parcelas seguiam as linhas de plantio do talhão e estavam todas umas próximas as outras. Diante disso, para cada uma das árvores das parcelas, foram avaliados mensalmente os seguintes parâmetros:

a) Número de ciclos da doença: o número de reações formadas na árvore, com o consequente ataque da doença. No caso do complexo bacteriano em questão essa reação é caracterizada pela tortuosidade aparente da árvore, seguida de minicancro no caule da mesma, como uma tentativa da planta já adulta sobreviver ao ataque da doença;

b) Número de bifurcações logo após o ataque: avaliando a existência da correlação entre o número de bifurcações que a árvore possui com o número médio de ciclos da doença;

c) Presença de patógenos secundários: a fim de entender as enterobactérias como uma possível porta de entrada para outras doenças bióticas;

Além disso, foram avaliados também o nível de severidade da doença em campo, acompanhando assim a sua distribuição ao longo do tempo. Para isso, foi criada uma escala de avaliação de severidade, com atribuições de notas, que descritas na abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Escala de notas para avaliação da severidade da doença em campo

Nota	Descrição
0	Árvores saudáveis, livres de ataque aparente do patógeno
1	Ramos laterais com sintomas da doença
2	Ramos e galhos tomados pelo arroxamento da nervura principal
3	Necrose apical e seca de ponteiros da árvore
4	Seca total da planta, devido ao patógeno em questão

É importante destacar que, nesse caso, as notas de 0 a 3 são notas reversíveis, de acordo com a capacidade da planta ao ataque patogênico. Porém, a nota 4 de avaliação vai posteriormente levar a morte da árvore, sendo então um sintoma irreversível na árvore ao patógeno.

4.2.2 Inventário parcial das árvores atacadas pelo complexo de bactérias em campo

Ao final do período de um ano de avaliações, foi realizado o inventário parcial das áreas avaliadas. De posse dos resultados da evolução dos sintomas nas parcelas, foram escolhidas trinta árvores por nível da doença ao longo do ano e foram coletados dados de altura total e circunferência a altura do peito (CAP), para posterior geração de volume. Esses dados tem como objetivo avaliar a interferência da doença na produtividade das florestas, aos dois anos de idade das mesmas.

Foram escolhidas trinta árvores por nível de doença, totalizando 120 árvores por área, avaliadas. A escolha das árvores por nível de reação ao ataque do patógeno levou em consideração a média dessas ao longo do período de um ano, ou seja, estarem pelo menos 80% do ano com o mesmo nível. Ademais, levou-se em consideração o fato das mesmas não estarem próximas de falhas ou árvores mortas,

para que não houvessem análises errôneas a respeito, principalmente com relação ao crescimento dessas.

Para a análise dos dados coletados foi submetida a análise de variância, seguido da análise proposta pelo teste de Scott-Knott. A escolha do teste deu-se como o princípio de que este testa a significância entre tratamentos avaliados (RAMALHO et al., 2000). Diante disso, foi possível entender se o complexo de enterobactérias foi capaz ou não de interferir em valores de produtividade da floresta. Ademais, para o cálculo de volume foi utilizada a equação:

$$V = \frac{(\pi \times (DAP^2))}{40000 * HT * FV}$$

V = volume (m³)

DAP = diâmetro a altura do peito (cm);

HT = altura total (m);

FV = fator de forma (utilizou-se o fator de 0,45, convencional a área de estudo).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi realizada a caracterização das áreas, através da visualização dos sintomas da doença nas árvores, bem como, a coleta de material infectado e realização de isolamento indireto desses, em laboratório. O crescimento de colônias bacterianas foi confirmado, assemelhando-se aos encontrados em amostras com sintomas da doença, em viveiro (Figura 1 e 2).

Além disso, na mesma época, a principal diferença entre as áreas experimentais foi com relação ao número de ciclos de ataque do patógeno às árvores. Na área 1, 94% das plantas estavam com apenas 1 ciclo de ataque da doença, seguidas de 5% dessas com nenhum ataque evidente e apenas 1% com 2 ciclos da mesma. No caso da área 2, 79% das plantas já se encontravam com 2 ciclos da doença, seguidas de 18% com 1 ciclo e apenas 2% com 3 ciclos da doença.

Ademais, a diferença entre as duas áreas de plantio a caracterização de solo, bem como, de tratos silviculturais foi a mesma. Além do número de ciclos, caracterizando a diferença no início do ataque do patógeno, entre as duas áreas

houve uma diferença de dois meses de plantio, sendo a segunda área mais velha do que a primeira.

Figura 1 - Caracterização da área 1 ao início do monitoramento. A) Destruição do lenho medular por conta do ataque bacteriano; B) Arroxamento da nervura principal das folhas e C) Crescimento bacteriano evidente através do isolamento indireto

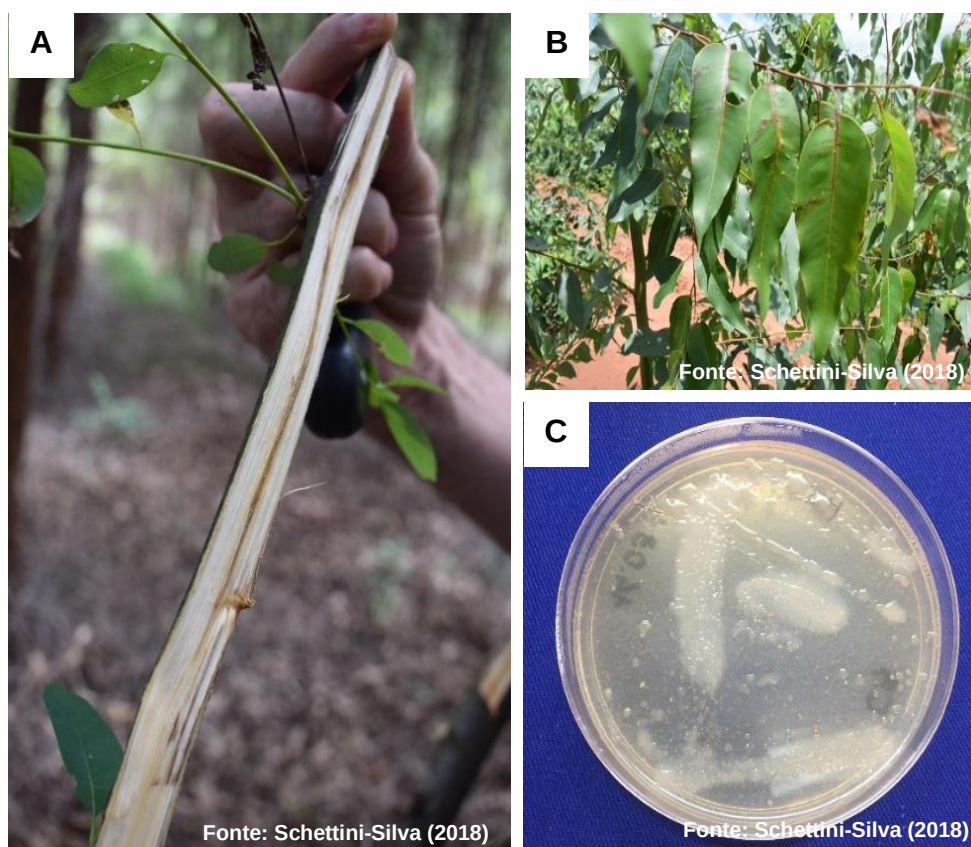
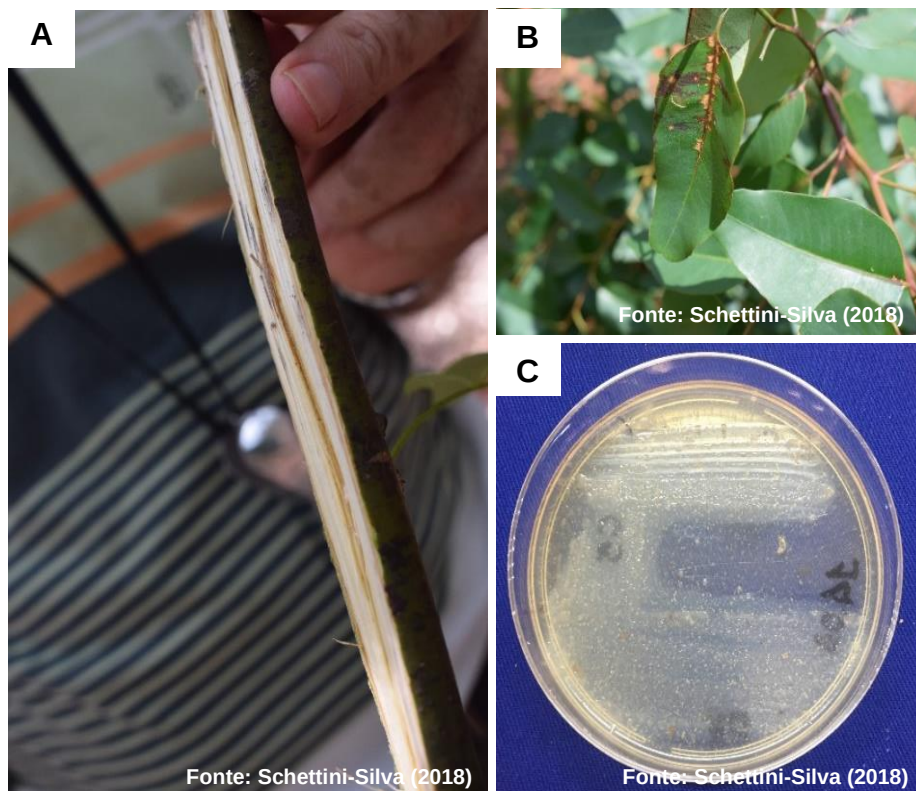


Figura 2 - Caracterização da área 2 ao início do monitoramento. A) Destruição do lenho medular por conta do ataque bacteriano; B) Arroxamento da nervura principal das folhas e C) Crescimento bacteriano evidente através do isolamento indireto



Segundo RESENDE E JÚNIOR (2001), a bifurcação em eucalipto é decorrente do fenômeno fisiológico denominado perda de dominância apical, o que pode ser causado por uma série de fatores, dentre eles os patógenos. No caso das enterobactérias em campo, percebeu-se em ambas as áreas visualmente a emissão de novos galhos e ramos laterais após o ataque da bactéria em altos níveis. Tal fato demonstra possivelmente uma forma da planta em superar o patógeno e sobreviver ao ataque. Porém, no caso da emissão de bifurcações, em ambos os casos, a média encontrada foi de apenas duas bifurcações para um número de apenas 10% das árvores avaliadas.

Com relação à interação de patógenos secundários, durante as avaliações não foi possível estabelecer interação entre esses. Porém, nos meses de junho e julho na área 1 observou-se um intenso ataque causado por psilídeo-de-concha (*Glycaspsis brimblecombei*) (Figura 3). Além disso, no mês de novembro houve ataque de besouro amarelo (*Costalimaita ferruginea*) em ambas as áreas. Tais ataques alteraram a

dinâmica do patógeno avaliado, favorecendo o aumento dos níveis da doença, o que possivelmente mostra uma interação entre patógeno e praga, que pode ser estudado futuramente.

Figura 3 - Ataque de psíldeo-de-concha nas áreas afetadas pelo complexo de enterobactérias



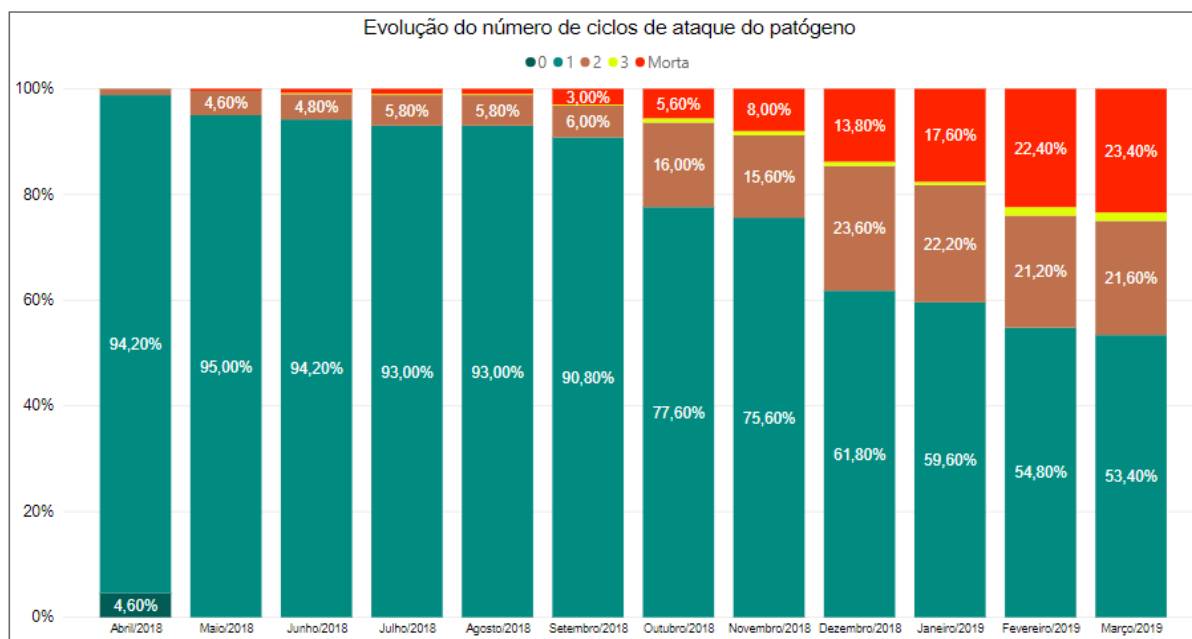
No caso do número de ciclos e notas atribuídas ao longo do processo de avaliação da doença, observou-se uma dinâmica ao longo dos meses. É importante destacar a diferença entre um ciclo e uma nota atribuída. O ciclo refere-se a incidência do patógeno, ou seja, a expressão dele na árvore do plantio. Posteriormente, a nota dada através da escala criada refere-se a severidade da doença, por árvore.

Na primeira área experimental, no mês de outubro percebeu-se uma mudança drástica das plantas com o ataque da doença. Anteriormente, cerca de 90% dessas encontravam-se apenas com um ciclo da doença e nesse mês diminuiu-se para 78% apenas e aumentou-se para 16% para dois ciclos da doença (Figura 4). Ao final do experimento, em março de 2019 percebeu-se que, para a mesma área, as plantas então estariam com cerca de 53% dessas no ciclo 1, 22% no ciclo 2 e apenas 2% no terceiro ciclo de ataque do patógeno.

Os demais valores podem ser explicados com a mortalidade causada por fatores abióticos e também por conta da doença avaliada. Tais valores mostram a

evolução da doença, para essa área, ao longo de um ano de avaliação e podem ser explicados como a tentativa do patógeno em continuar causando doença, mesmo em árvores já mais velhas.

Figura 4 - Número de ciclos de ataque do complexo de enterobactérias ao longo do período de um ano para a Área 1

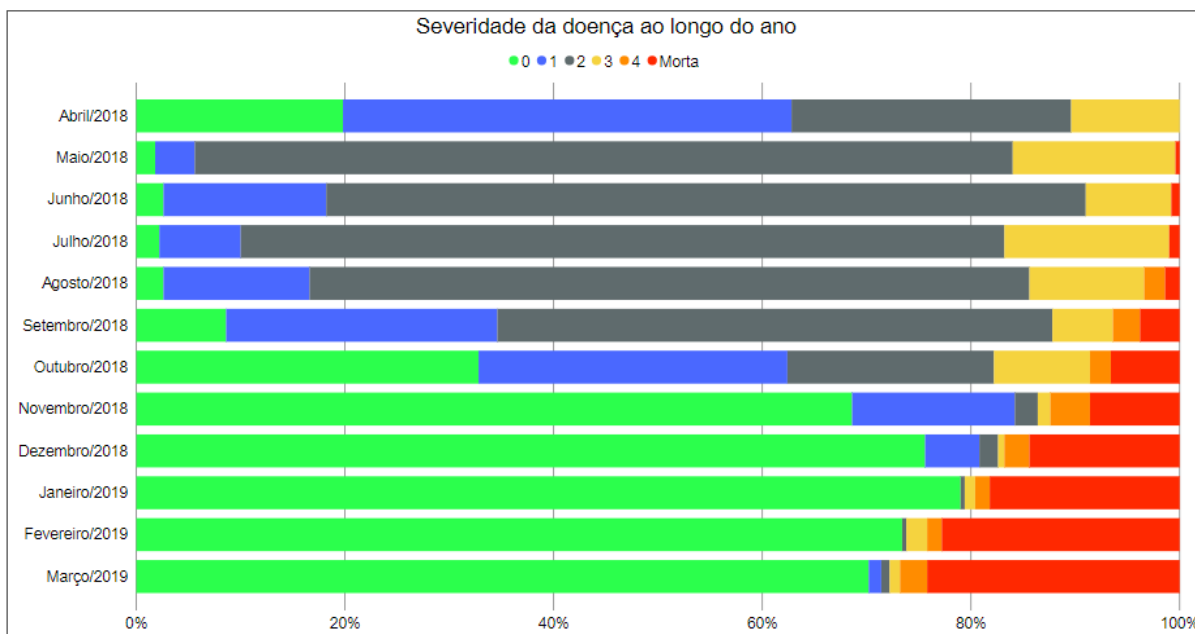


Fonte: Schettini-Silva (2018)

Com relação a severidade da doença, de posse da escala avaliativa, percebeu-se que para a área 1 houve um aumento gradativo do ataque do patógeno a partir de abril de 2018. No primeiro mês de avaliação as plantas apresentavam-se com sintomas iniciais da doença, com cerca de 43% dessas com nível 1 do ataque patogênico, seguidas de 27% em nível 2, 10% em nível 3 e cerca de 20% dessas sem sintoma aparente da doença, ou seja, nível 0.

No próximo mês, observou-se então que tal situação havia evoluído para uma maior severidade. Sendo assim, na mesma área no mês de maio de 2018 apenas 2% das plantas estavam sem sintomas da doença, seguidas de 78% das mesmas com sintomas de ramos e galhos tomados pelo arroxamento da nervura principal, 16% com necrose apical e seca de ponteiros da árvore e 4% dessas com sintomas iniciais da doença (Figura 5).

Figura 5 - Severidade da doença bacteriana ao longo do período de um ano para a Área 1 (2018-2019)



Legenda:

Nota 0 – Árvores saídas, livres de ataque aparente do patógeno;

Nota 1 – Ramos laterais com sintomas da doença;

Nota 2 – Ramos e galhos tomados pelo arroxamento da nervura principal;

Nota 3 – Necrose apical e seca de ponteiros da árvore;

Nota 4 – Seca total da planta, devido ao patógeno em questão.

Fonte: Schettini-Silva (2018)

A partir do mês de agosto de 2018 observou-se então a evidência de mortalidades causadas pela doença, com a seca total das árvores e posteriormente a morte das mesmas (Figura 6). O mês de novembro do mesmo ano, de acordo com as avaliações, foi o que apresentou a maior taxa de árvores secas. Além disso, durante os meses de agosto a novembro de 2018 foram evidentes as consequências causadas por conta do ataque das enterobactérias, com a desfolha das árvores, a quebra dos ponteiros das mesmas e a má formação do caule dessas (Figura 7).

Figura 6 - Seca das árvores causado pelo complexo de enterobactérias. A) Seca total da árvore; B) Seca dos ramos e C) Árvore seca próxima de árvores aparentemente saudáveis

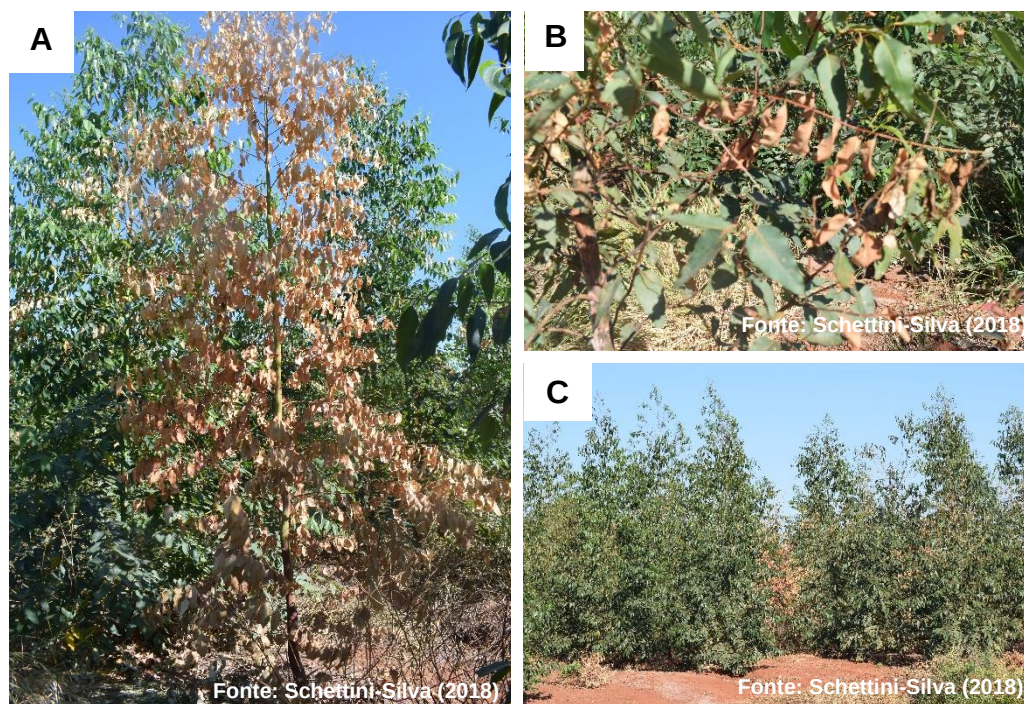
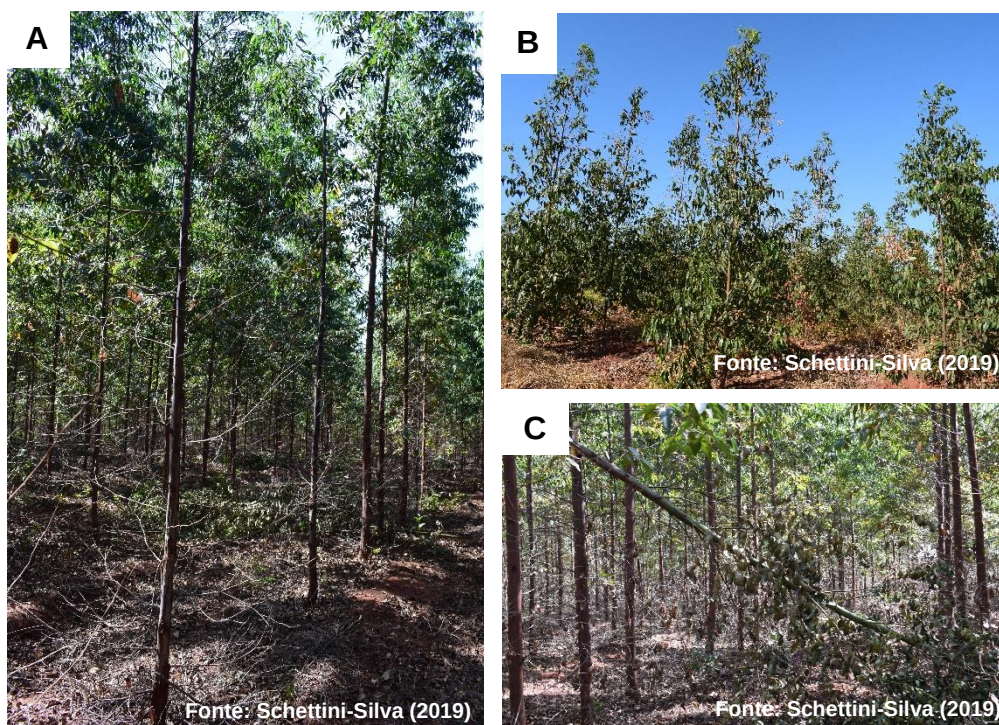


Figura 7 - Situação da área com a evolução da doença bacteriana. A) Árvores mortas ao longo do plantio; B) Desfolhas pelo ataque bacteriano e C) Quebra de árvores

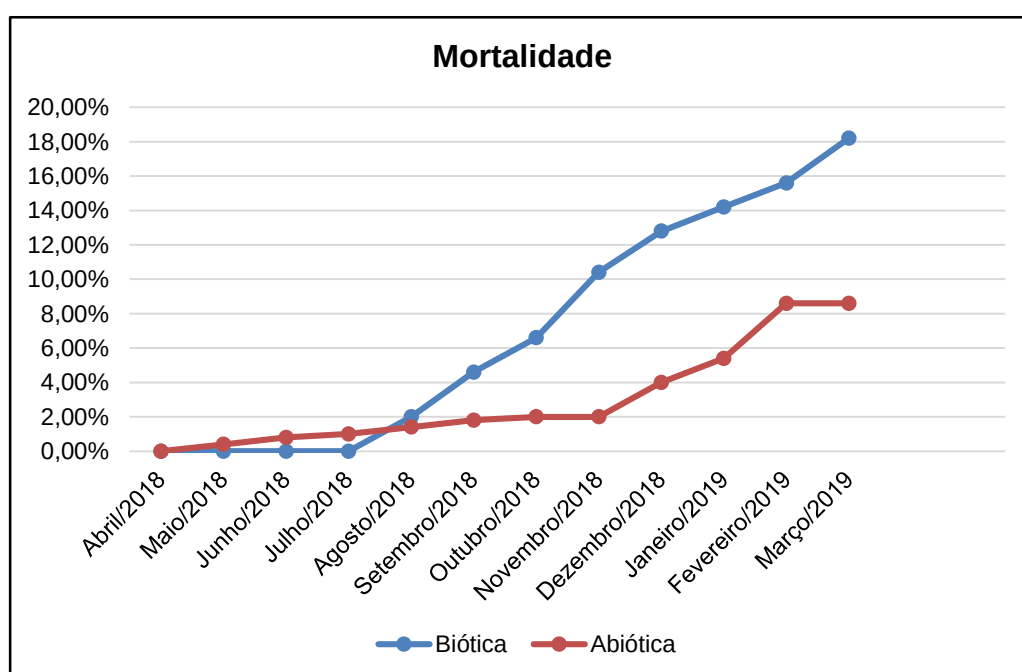


Por fim, com relação a mortalidade da primeira área avaliada, observou-se que no total de 500 plantas, distribuídas em 50 plantas por parcela, totalizaram um valor de 26,80% ao final da coleta de dados, sendo esses valores distribuídos em 18,20% causados pelo complexo de bactérias e 8,60% aos fatores abióticos (Figura 8). Diante disso, em números, podemos atribuir a uma perda de aproximadamente 236 árvores em um plantio de 1 hectare, causados pelo complexo de enterobactérias.

É importante ressaltar que as parcelas instaladas ao longo do experimento seguiam as linhas dos plantios na floresta, o que facilmente pode explicar a disseminação da doença entre plantas, onde foi possível observar que árvores próximas umas das outras possuíam níveis de severidade próximos, muitas das vezes levando a seca das árvores com posterior mortalidade entre elas.

Com relação a mortalidade, observou-se a alta mortalidade também com relação aos fatores abióticos, que pode ser explicado principalmente pela facilidade do clone estudado em causar enovelamento das raízes, o que pode levar ao enfraquecimento da mesma, seguido da morte ou da quebra do fuste dessas. Sugere-se também, futuramente, o estudo da interação entre o enovelamento das raízes com o patógeno em questão.

Figura 8 - Seca e mortalidade das árvores em campo ao longo do período de avaliação da Área 1

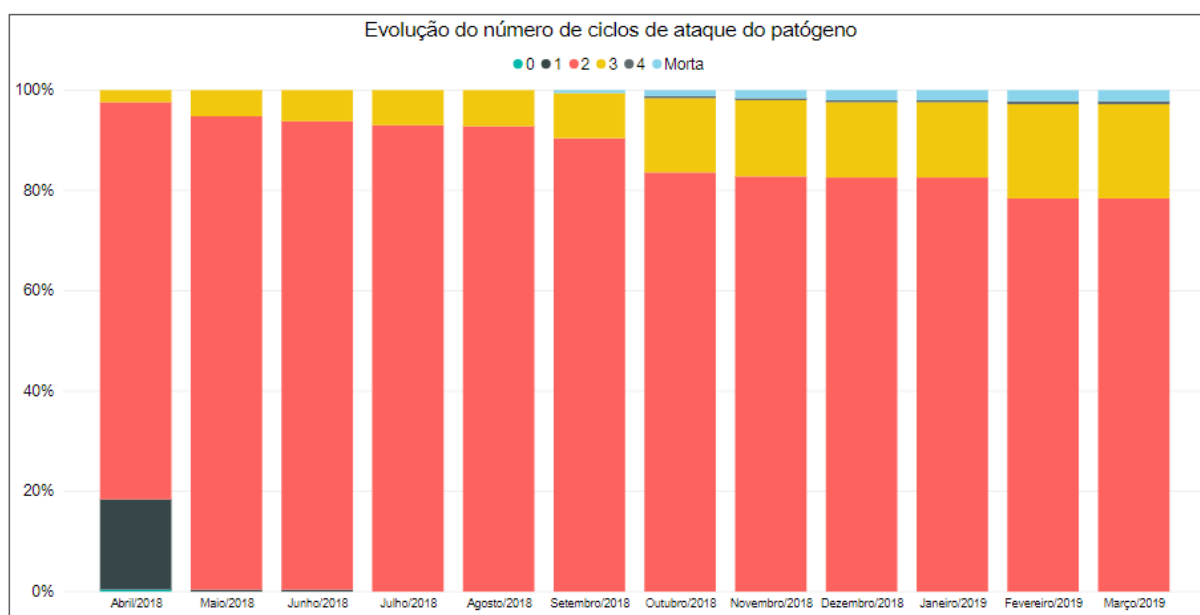


Com relação a segunda área avaliada ao longo do período de um ano, observou-se a diferença com relação ao avanço no ataque da doença, no número de ciclos na árvore (Figura 9). No início das avaliações, cerca de 79% da floresta encontrava-se com evidências de dois ciclos de ataque da doença, bem como, 18% com apenas um ciclo e cerca de 2% com três ciclos do patógeno, na planta. Percebe-se que as mesmas permaneceram grande parte do ano com apenas dois ciclos da doença, porém, no mês de outubro de 2018 o número de ciclos aumentou em uma pequena porcentagem para três ciclos da doença.

No caso da evolução dos níveis de severidade da doença, para a segunda área avaliada, percebemos que embora o nível de ciclos da doença seja maior, a severidade foi bastante diferente com relação a esta área. Tal fato pode ser explicado com relação a época de avaliação, bem como, a capacidade das árvores em se buscarem maneiras de se recuperarem do ataque do patógeno.

Em abril de 2018, cerca 12% da floresta encontrava-se sem sintomas evidentes do patógeno, seguidos de 88% das mesmas com sintomas da doença. Tal porcentagem foi distribuída em 46% das mesmas com nível 1 de severidade, 32% ao nível 2 e cerca de 10% com nível 3, simbolizando assim uma severidade alta.

Figura 9 - Número de ciclos de ataque do complexo de enterobactérias ao longo do período de um ano para a Área 2

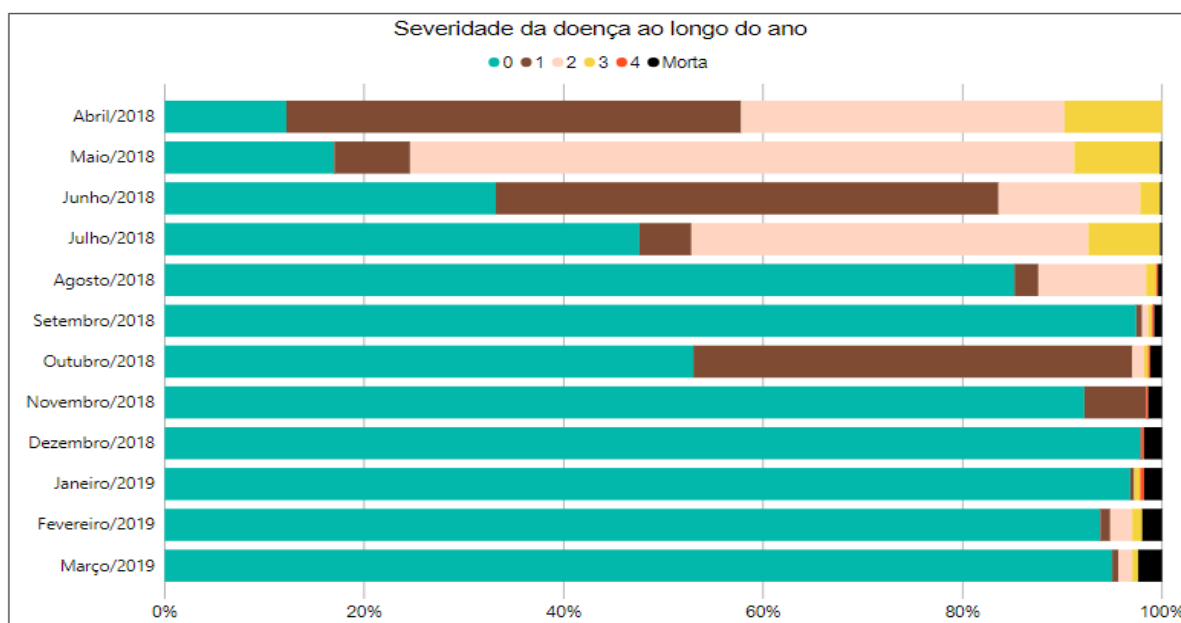


Fonte: Schettini-Silva (2019)

No próximo mês as árvores apresentaram cerca de 67% dessas com comportamento de ramos e galhas tomados pelo arroxamento da nervura principal, o que aumentou com relação ao mês anterior. Nos meses seguintes, o ataque patogênico foi diminuindo gradativamente, tendo apenas um pico da doença no mês de outubro de 2018.

Porém, diferente da área anterior, o nível 4 representado pela seca das árvores e posterior morte das mesmas quase não foi encontrado, levando assim à uma baixa severidade na parcela avaliada (Figura 10). Nesse caso, a mortalidade da área avaliada chegou a 3,80%, sendo distribuídas em 2,80% pela doença e 1,00% para fatores abióticos (Figura 11).

Figura 10 - Severidade da doença bacteriana ao longo do período de um ano para a Área 2 (2018-2019)



Legenda:

Nota 0 – Árvores saídas, livres de ataque aparente do patógeno;

Nota 1 – Ramos laterais com sintomas da doença;

Nota 2 – Ramos e galhos tomados pelo arroxamento da nervura principal;

Nota 3 – Necrose apical e seca de ponteiros da árvore;

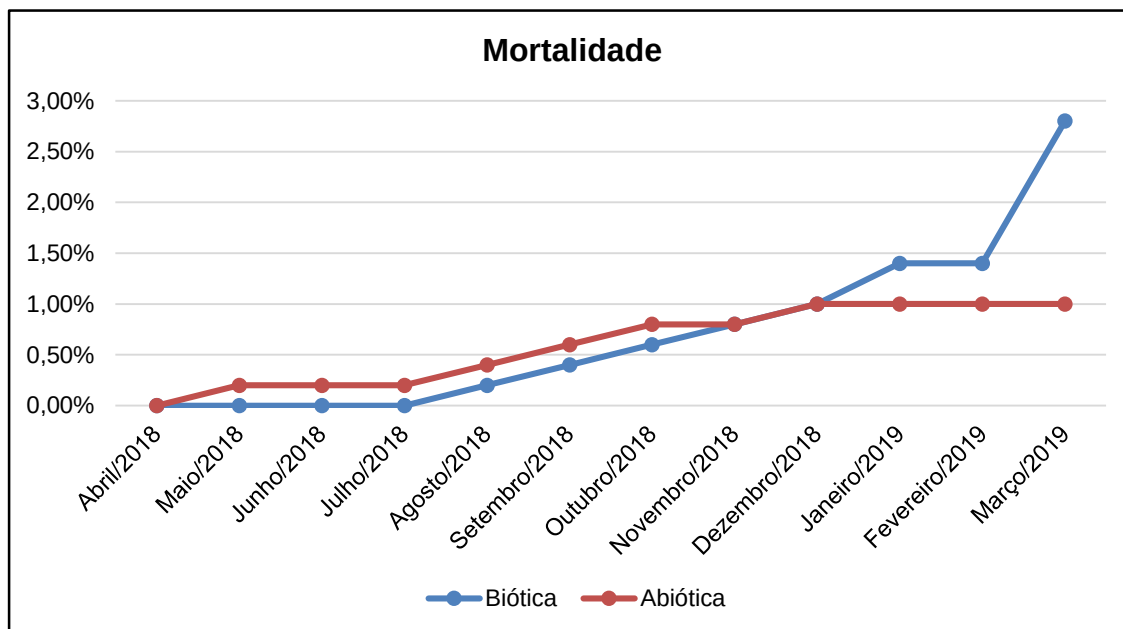
Nota 4 – Seca total da planta, devido ao patógeno em questão.

Fonte: Schettini-Silva (2019)

No caso do aspecto visual da presente área, percebeu-se que a recuperação da floresta avaliada foi maior do que na primeira área, bem como, não apresentavam os mesmos reflexos como a queda das árvores e a má formação dos ponteiros dessas. Porém, foi possível de observar ao final do experimento folhas no solo com sintomas de arroxamento de nervura principal, o que pode representar uma possível fonte de inóculo (Figura 12). A análise comportamental completa do presente estudo

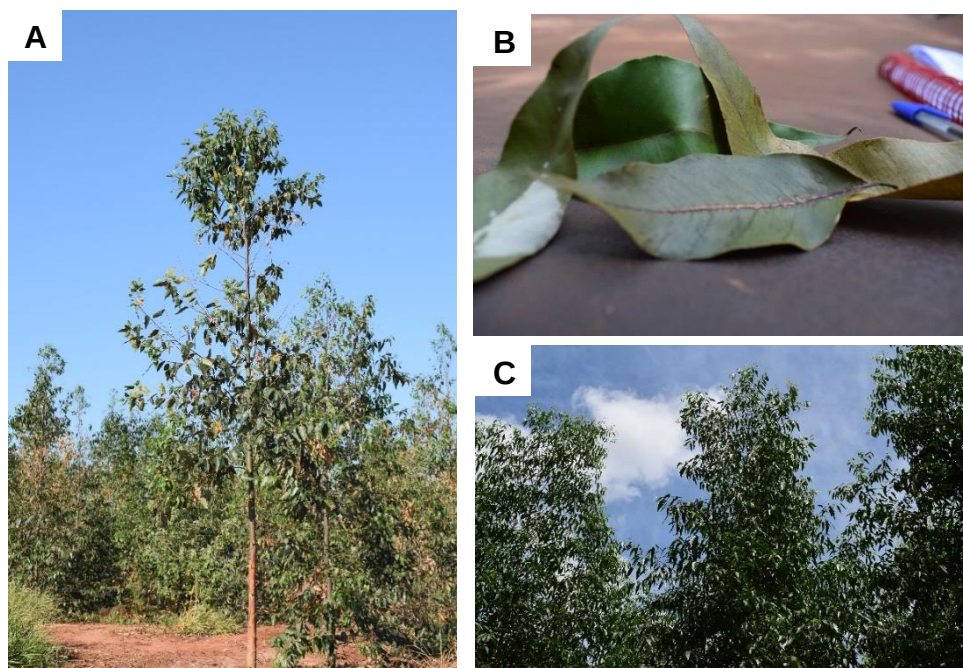
encontra-se no apêndice B do trabalho em questão, intitulado “Base de dados de campo (Área 1 e Área 2)”.

Figura 11 - Seca e mortalidade das árvores em campo ao longo do período de avaliação da Área 2



Fonte: Schettini-Silva (2019)

Figura 11 - Situação da área com a evolução da doença bacteriana. A) Desfolha parcial causada pelo patógeno; B) Fontes de inóculo da doença e C) Desenvolvimento das árvores ao final das avaliações



Com relação ao inventário parcial (Tabela 2), os resultados para a primeira área mostram que no quesito altura não houve diferença significativa estatisticamente entre os níveis da doença, ou seja, independentemente do nível em que as árvores se encontravam a altura dessas era a mesma.

Na mesma área, com relação aos valores de circunferência à altura do peito (CAP) percebeu-se diferença estatística significativa entre as árvores com severidade maior da doença, ou seja, predominantemente em nível 3 com relação as demais. Para determinar a diferença entre médias foi utilizado o teste de média de Scott-Knott.

Tabela 2 - Inventário aos dois anos de plantio da Área 1 afetada pelo complexo de enterobactérias

Nota de severidade	Altura (m)	CAP (cm)
Nota 0	10,87a ¹	26,84a
Nota 1	10,60a	27,31a
Nota 2	10,53a	27,28a
Nota 3	11,15a	21,92b

¹Letras iguais na coluna não diferente entre si ao nível de probabilidade, através das análises do teste de média de Scott-Knott

Para a área 2, utilizando-se da mesma metodologia, os valores de altura e CAP não diferiram significativamente em ambos os casos, ou seja, as médias são iguais (Tabela 3). Nesse caso, percebe-se que para áreas de menor mortalidade da doença, bem como, com menor severidade da doença tem seus valores de produtividade menor afetada após o ataque de complexo de enterobactérias.

Tabela 3 - Inventário aos dois anos de plantio da Área 2 afetada pelo complexo de enterobactérias

Nota de severidade	Altura (m)	CAP (cm)
Nota 0	11,04a	27,01a
Nota 1	11,04a	29,06a
Nota 2	11,48a	27,53a
Nota 3	11,12a	27,12a

¹Letras iguais na coluna não diferente entre si ao nível de probabilidade, através das análises do teste de média de Scott-Knott

Ademais, com relação aos volumes das árvores avaliadas por nível, observou-se que em ambas as áreas experimentais houve variação no volume das árvores, de acordo com os níveis avaliados, sendo a variação maior para a primeira área do que

para a segunda avaliada (Tabela 4). Para a primeira área, observa-se também uma redução no volume das árvores com severidade mais alta, do que as sadias. Porém, o mesmo não ocorre na segunda área, o que comprovam as avaliações realizadas entre as mesmas, onde a primeira área apresentou-se ao longo do ano com uma maior severidade do que a outra avaliada.

Tabela 4 - Volume (m³) observado aos dois anos de idade para áreas com alta e baixa severidade causada pelo complexo de enterobactérias

Nota de Severidade	Área 1 ¹ Volume (m ³)	Área 2 ² Volume (m ³)
Nota 0	0,0280	0,0288
Nota 1	0,0283	0,0334
Nota 2	0,0281	0,0312
Nota 3	0,0192	0,0293

¹Alta severidade

²Baixa severidade

Assim, diante dos dados analisados algumas considerações devem ser feitas a respeito da evolução da doença em ambas as áreas. A primeira delas é que o complexo de enterobactérias age de forma agregada no espaço, ou seja, em forma de reboleira nas linhas. Isso explica, em ambos os casos, a forma de disseminação da doença umas para as outras. Além disso, confirma o que é descrito pela literatura que as doenças causadas por bactérias são de fácil disseminação e de difícil controle (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 2011).

Ademais, com relação a primeira área avaliada, percebe-se que o número de ciclos pode ser menor do que a segunda área, ao início da avaliação, porém, a mesma possuiu uma maior severidade com relação a primeira. Nesse caso, a explicação pode ser dada através do mês de plantio dessas, onde houve uma diferença de dois meses entre elas, sendo a segunda plantada em junho de 2018 e a primeira, em agosto do mesmo ano. Podemos dizer que possivelmente essa diferença interfira no patógeno, uma vez que o solo, o aspecto nutricional, o material genético, dentre outros fatores de ambas as áreas seria o mesmo.

Por fim conclui-se que para a primeira área avaliada, os meses de novembro de 2018 a março de 2019, de maneira geral, foram os mais desfavoráveis para o ataque do patógeno, levando à estabilização dos sintomas da doença. No caso da segunda área, essa estabilização ocorreu, de maneira geral, a partir do mês de

setembro de 2018 até março de 2019. Assim, percebe-se que uma forma de controle da doença são os princípios gerais de controle, com base no período de escape da doença, plantando esse material genético em questão em épocas as quais a suscetibilidade ao patógeno diminui drasticamente.

Para estudos futuros, é importante avaliar uma floresta anualmente sadia com as demais parcelas estudadas, a fim de comprovar os resultados do inventário com áreas sem ataque da doença. Além disso, recomenda-se que os estudos também sejam analisados com relação à colheita dessas áreas, bem como, o processo de transformação do material em polpa branqueada de celulose, aos sete anos de idade do plantio.

Ademais, estudos com relação ao melhoramento genético para resistência à doença em questão também são recomendados, uma vez que possivelmente a área em questão auxiliará na tomada de decisões a longo prazo, bem como, buscarão formas de alinhar a produtividade clonal com a resistência a intempéries que podem levar a grandes prejuízos, como é o caso da doença estudada.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; GUIMARÃES, L. M. da S. Estratégias de manejo integrado de doenças florestais. **Opiniões**, Ribeirão Preto, p.21-22, maio 2016. Trimestral. Disponível em: <<https://florestal.revistaopinioes.com.br/revista/detalhes/7-estrategias-de-manejo-integrado-de-doencas-flore/>>. Acesso em: 02 maio 2019.
- ASSIS, T.F.; AGUIAR, A.; ABAD, J. I. M. Melhoramento genético do Eucalipto. In: VALE, Antônio Bartolomeu do et al. **Eucaliptocultura no Brasil**: Silvicultura, manejo e ambiência. Viçosa: Sif, 2014. Cap. 7. p. 552-28
- BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. Manejo integrado de doenças. In: Amorim, L.: Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A. (Eds) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 409-419. 2011.
- FERNANDES, B. V. **Dinâmica espaço-temporal e quantificação dos danos e perdas causadas por murcha de *Ceratocystis* em eucalipto na produção de carvão vegetal**. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Ciência Florestal, Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp - Campus de Botucatu, Botucatu, 2012. Cap. 1. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/99779/fernandes_bv_me_botfca.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 02 maio 2019.
- FERREIRA et al. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. **Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 2, p.155-162, 10 nov. 2006. Bimestral. Disponível

em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/rarv/v30n2/a01v30n2.pdf>>. Acesso em: 02 maio 2019.

MAFIA, R. G; ABAD, J. I. M.; FERREIRA, M. A. Desafios e perspectivas para o controle de doenças do eucalipto. In: SANTOS, Bárbara Alves dos et al. **Patologia florestal: Desafios e perspectivas**. Lavras: Lavras: Núcleo de Estudos em Fitopatologia, 2013. Cap. 15. p. 119-133. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/324656888_Desafios_e_perspectivas_para_o_controle_de_doencas_do_eucalipto>. Acesso em: 12 mar. 2019.

MORAES, W. B. **Mapeamento de áreas de risco e impactos potenciais das mudanças climáticas globais para a ocorrência da ferrugem do eucalipto**. 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Produção Vegetal, Fitossanidade (fitopatologia), Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2012.

NUTTER, F. W.; TENG, P. S.; SHOKES, F. M. Disease assesment terms and concepts. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 1187-1188, 1991.

RAMALHO, M. A.P.; FERREIRA, D.F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Lavras: UFLA, p-87-134, 2000.

TAKAHASHI, S. S. **Ferrugem do eucalipto: índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionadas à intensidade da doença no campo**. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Agronomia, Proteção de Plantas, Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp, Botucatu, 2012. Cap. 1. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/97249/takahashi_ss_me_bo tfca.pdf?sequence=1>. Acesso em: 25 set. 2018.

RESENDE, M. D. V.; F. J., M. Bifurcação e Quebra de Copa em Eucalipto: Efeitos Genéticos, Ambientais e Silviculturais. **Embrapa Florestais**, Colombo, v. 1, n. 63, p.1-20, nov. 2001. Trimestral. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/17073/1/doc63.pdf>>. Acesso em: 22 maio 2019.

WALKER, P. T. Crop losses: the need to quantify the effects of pests, diseases and weeds on agricultural production. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 9, p.119-58, 1983.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o estudo realizado, uma série de considerações a respeito do tema abordado serão feitas, bem como, sugestões para o aprofundamento desses conhecimentos, a fim de buscar o completo entendimento a respeito das bactérias fitopatogênicas na cultura do eucalipto, principalmente, na realização de medidas efetiva de controle das mesmas.

Através da caracterização dos quarenta e dois isolados obtidos, ou seja, utilizando as metodologias bioquímica, patogênica e molecular conclui-se a existência da interação entre bactérias causadoras da necrose apical e a seca de ponteiros em minicepas, mudas e árvores em plantios de eucalipto. Com os resultados apresentados nos testes bioquímicos, concluiu-se que os isolados estudados tratavam-se de patógenos no grupo das enterobactérias, o principal grupo causador de doenças para a cultura estudada.

Posteriormente, a caracterização patogênica confirmou a patogenicidade de isolados obtidos em viveiro e em campo, através da inoculação em mudas sadias de eucalipto suscetíveis ao patógeno estudado. Por fim, o sequenciamento permitiu a comprovação à nível de gênero e espécie do agente causal. Sendo assim, conclui-se que os danos e perdas observados são causados por *Erwinia psidii* e *Pantoea eucalypti*, formando assim o complexo de enterobactérias.

Além desse complexo formado, percebeu-se a interação do complexo em menor quantidade, com isolados de *Pseudomonas* e *Xanthomonas* spp., podendo então considerar essas como oportunistas, dependendo de distúrbios fisiológicos das plantas, o que levam as mesmas a maior propensão a outros fatores bióticos e abióticos.

Ademais, de posse dos isolados obtidos em eucalipto foi realizada a inoculação em mudas de goiaba (*Psidium guajava*) e jambo (*Syzygium jambos*). Percebeu-se a capacidade patogênica de isolados de eucalipto causarem doenças em outras espécies de mirtáceas. Tal fato pode explicar a inoculação cruzada entre espécies, bem como, ser fonte de inóculo entre esses. De posse dos resultados apresentados, também sugere-se a realização de inoculações em outras espécies da família, a fim de entender a severidade da doença e buscar forma de controle desta.

Para o entendimento da dinâmica do patógeno e na busca por formas de controle da mesma foram realizados estudos em viveiro e em campo, avaliando a

incidência, severidade e a sazonalidade da doença. De acordo com os dados encontrados em viveiro, conclui-se que a incidência do complexo de enterobactérias pode levar uma perda considerável de 20% por minicepa contaminada, até mesmo em baixas severidades, uma vez que uma estaca contaminada não levará a formação de mudas. Sendo assim, a doença leva a uma perda estimada de R\$2100,00 por mês de incidência.

Além disso, concluiu-se que o complexo em questão não é de incidência anual, em viveiro, tendo sido mais frequente nos meses de fevereiro, março, abril, maio e dezembro. Percebeu-se que em épocas com maior concentração de chuva, bem como, com temperaturas mais elevadas favoreceram a disseminação do patógeno. Porém, cabe destacar a necessidade de avaliações mais longas, uma vez que o estudo apresentado foi realizado durante todo o ano de 2018 e de um ano para o outro existem variações climáticas que podem levar ao comportamento diferente da doença estudada.

Diferente do viveiro, a doença foi de incidência anual no campo, o que não correlaciona possivelmente os fatores de sazonalidade com a ocorrência da doença. Em áreas de maior severidade, percebeu-se uma mortalidade de aproximadamente 20% da parcela de estudo atribuídas a doença. Por isso, considerando 1 hectare de floresta plantada, podemos chegar a uma perda de até 236 árvores pelo ataque do complexo de enterobactérias.

Ademais, com o inventário realizado aos dois anos das árvores de eucalipto das mesmas áreas experimentais percebeu-se que houve diminuição do CAP para aquelas que apresentaram durante boa parte do ano alta severidade da doença, o que pode ser explicado com o fato de que a doença leva a destruição do lenho medular das árvores. Os valores de altura não sofreram interferência de acordo com os níveis da doença. Por fim, percebeu-se também redução do volume das mesmas árvores. Conclui-se então que, plantios com alta severidade tem perda em produtividade causada pelo ataque do patógeno.

Compreendeu-se também uma possível relação de endofitismo entre os isolados bacterianos, ou seja, a existência dos mesmos principalmente em matrizes e mudas de *Eucalyptus* spp. porém sem a presença de sintomas da doença. Tal fato explica a existência dos sintomas em campo, o que possivelmente pode vir a ser considerado como a muda contaminada indo para áreas de campo e, com as condições necessárias para a expressão dos sintomas causa danos na floresta.

Considera-se então a necessidade de estudos futuros que expliquem essa interação e como resolve-la, a fim de eliminar os inóculos da doença.

Por fim, compreende-se a necessidade da evolução dos estudos com relação ao controle da doença, principalmente focando na utilização de ferramentas biotecnológicas, uma vez que a utilização de produtos químicos não foi eficiente, bem como, o entendimento do comportamento dos clones suscetíveis. Indica-se então a realização de estudos de genômica funcional, principalmente na área de proteômica, a fim de compreender o comportamento da ativação de proteínas e suas rotas.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS A. C. et al., *Ralstonia solanacearum* on *Eucalyptus* clonal nurseries in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**. 31 (4): 357-366. 2006.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 442 p. Viçosa, MG: Editora UFV, 2009.
- ALFENAS, A. C. Murchas Vasculares e seus impactos na produção florestal. **Opiniões**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 46, p.5-8, 14 dez. 2016. Trimestral. Disponível em: <<http://florestal.revistaopinioes.com.br/revista/detalhes/1-murchas-vasculares-e-seus-impactos-na-producao-f/>>. Acesso em: 03 jun. 2018.
- ARRIEL, D. A. A. et al., Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. **Forest Pathology**. 44: 255-265. 2014.
- BERGAMIN FILHO A., AMORIM L., **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo SP. Ceres. 1996.
- BERGAMIN FILHO et al., Avaliação de danos causados por doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 3:133-184. 1995.
- BORGES JUNIOR, N. **Manejo de pragas e doenças na CMPC**: Belo Horizonte: Sociedade de Investigações Florestais, 32 slides. 2017.
- COUTINHO T.A. et al., A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. **Australasian Plant Pathology**. 40:55-60. 2011.
- EUZÉBY, J. P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. France, 2009. Available at: www.bacterior.cict.fr/classifphyla.htm. Acesso em: 21 jul. 2018.
- FAO 2000. **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/017/x4400e/x4400e.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2018.
- FARIA, J. M. R. **Severidade e controle da bacteriose foliar em mudas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em função do nível tecnológico do viveiro**, Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrônômicas Câmpus de Botucatu. 2013.
- FERRARI, M. Propagação vegetativa de espécies florestais. **Embrapa Florestas**, 22p. 2004.
- FONSECA, S. M. et al. **Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto**. Editora UFV. 200p. 2010.
- FURTADO, E. L. et al. **Doenças do eucalipto no Brasil**. Botucatu: O autor, 2009. 74 p

GILLIGAN, C. A. Modeling of soilborne pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, 21:45-64, 1983.

GONÇALVES, J. L. **Sazonalidade de ocorrência de mofo cinzento, oídio e manchas bacterianas foliares em dois viveiros de produção de mudas de clonais de eucalipto**. 2014. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado, Ciência Florestal, Unesp - Campus de Botucatu, Botucatu, Cap. 2. 2014.

HUGHES, G. et al. Validating mathematical models of plant-disease progress in space and time. **IMA Journal of Mathematics Applied in Medicine and Biology** 14:85-112, 1997.

IBÁ. 2016. **Relatório Indústria Brasileira de Árvores**. Disponível em: <http://iba.org/images/shared/iba_2016.pdf> Acesso em: 20 ago. 2018.

IBÁ. 2017. **Relatório Indústria Brasileira de Árvores**. Disponível em: <http://iba.org/images/shared/iba_2017.pdf> Acesso em: 19 mar. 2019.

JULIATTI, F. C. & SANTOS, M. A. Métodos de avaliação de doenças de plantas induzidas por fungos e por nematóides. Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo, **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, V. 7. p. 407-54. 1999.

LOPES, C. A.; TAKATSU, A. Controle da murcha bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.1, p.224-225, 1997.

MADDEN L.V. et al. Spatial pattern analysis of the incidence of aster yellows disease in lettuce. **Res. Popul. Ecol.** 37:279-89., 1995.

MAFIA, R. G; ABAD, J. I. M.; FERREIRA, M. A. Desafios e perspectivas para o controle de doenças do eucalipto. In: SANTOS, Bárbara Alves dos et al. **Patologia florestal: Desafios e perspectivas**. Lavras: Lavras: Núcleo de Estudos em Fitopatologia, 2013. Cap. 15. p. 119-133. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/324656888_Desafios_e_perspectivas_para_o_controle_de_doencas_do_eucalipto>. Acesso em: 12 mar. 2019.

MORA A.; GARCIA C. A cultura do Eucalipto no Brasil. 1 ed. São Paulo, **Sociedade Brasileira de Silvicultura**, 2000.

NEVES, D.A. **Condições favoráveis à mancha foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* em eucalipto**. 2007. 22f. Dissertação. UFV, Viçosa/MG, 2007.

PIRES, I. E. et al. Genética e Melhoramento do Eucalipto. In: **Eucaliptocultura no Brasil. Silvicultura, Manejo e Ambiência**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2014.

REIS, A.V. et al. Uma nova bacteriose em mudas de eucalipto incitada por *Xanthomonas campestris*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.342, 1996.

RESENDE, A. A. et al. **Proteção de Cultivares**. 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Livro_Protecao_Cultivares.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2018

RODRIGUES NETO J., ROBBS C. F, YAMASHIRO T.A. A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. **Fitopatologia Brasileira**. 12:345-350. 1987.

ROMEIRO, S. R. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2011. 417 p.

SANTOS, A. F. et al. Ocorrência de mancha foliar bacteriana em plantios de eucalipto no Estado de Mato Grosso e de Santa Catarina. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, p. 232, 2010.

SCHAAD, N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Pau-Minnesota. **APS Press** (The American Phytopathological Society). 2001.

SUDO S., OLIVEIRA G.H.N., PEREIRA A.C., Eucalipto (*Eucalyptus* sp) e Bracatinga (*Mimosa escabrela*), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**. 8:631.1983.

TAKAHASHI, S. S. **Ferrugem do Eucalipto**: Índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionados a intensidade no campo. 2002. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação, Proteção de Plantas, Unesp, Botucatu, Cap. 1. 2002.

TEIXEIRA A. C. O. et al., Low genetic diversity among pathogenic strains of *Erwinia psidii* from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. 40:678-694. 2009

TEODORO et al., *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* species associated with leaf diseases on *Eucalyptus globulus* in southern Brazil. **Phytopathol Mediterr** 51(2):355–364. 2012.

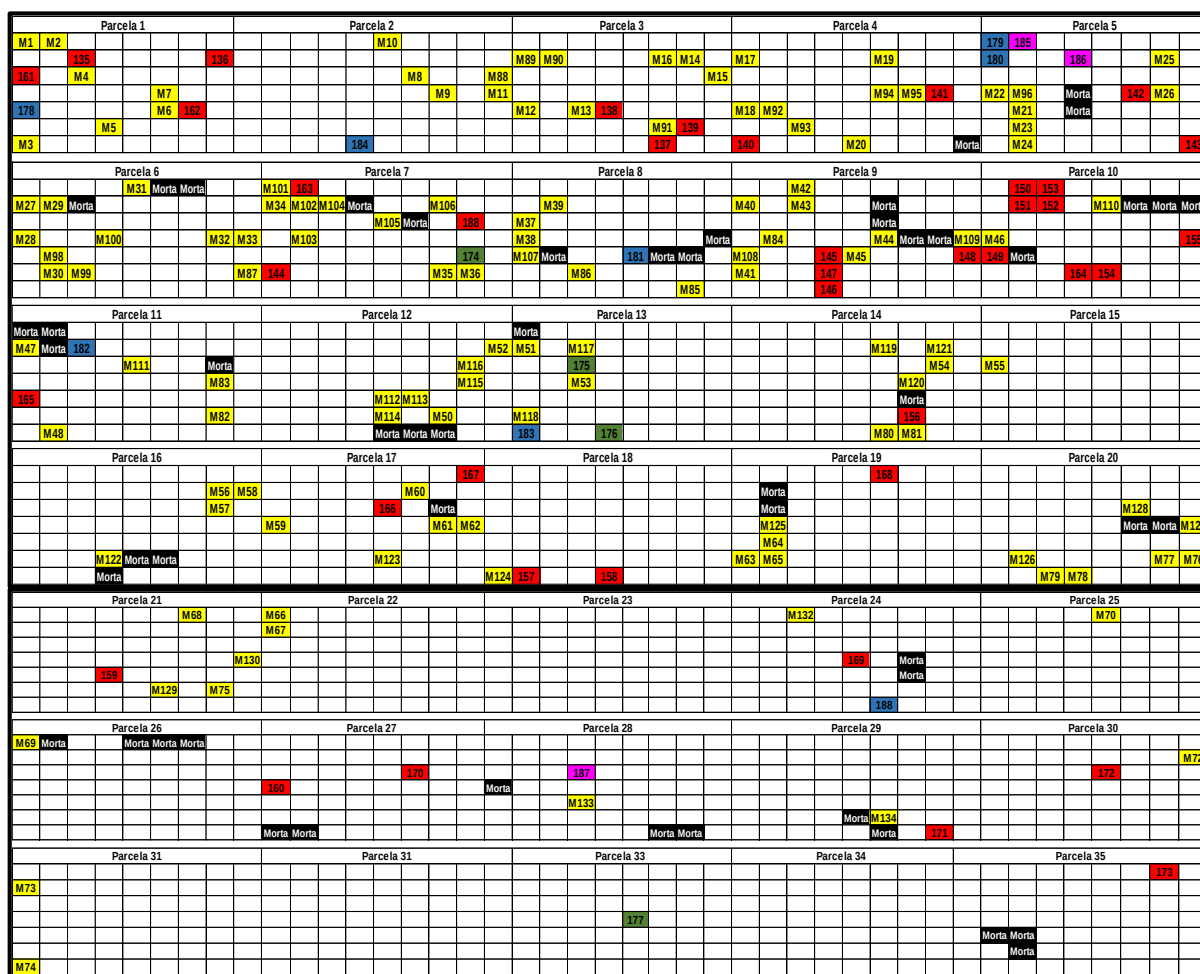
TUMURA, K.G. **Dinâmica espaço-temporal, quantificação de danos e perdas e influência do cancro (*Chrysosporthe cubensis*) no acúmulo de biomassa e fixação de carbono em seis genótipos de *Eucalyptus* spp.** 2015. 85 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Florestal, Engenharia Florestal, Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp - Botucatu, Botucatu, 2015. Cap. 1. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/145519>>. Acesso em: 12 mar. 2019.

USEGUI, C. H et al., Ocorrência de *Erwinia psidii* em goiabeira no Distrito Federal. **Summa Phytopathologica**. 27: 188. 2001

VANDERPLANK, J.E. **Plant Diseases: Epidemics and Control**. New York. Academic. 1963.

VALE, F.X.R. & ZAMBOLIM, L. Influência da temperatura e da umidade nas epidemias de doenças de plantas. **Revisão anual de patologia de plantas**. v. 4, p. 149-207, 1996.

ZAMPROGNO, K. et al. Utilização de análise de segregantes agrupados na identificação de marcadores ligados a genes que controlam resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus* spp. **Summa Phytopathologica**. 34:253-255. 2008.



APÊNDICE B - Base de dados de campo

Área 1 – Evolução das Notas (2018/2019)

(Continua)

Parcela	Planta	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março
1	1	1	3	3	3	3	3	2	0	2	0	0	0
1	2	3	3	2	3	2	2	2	0	0	2	0	0
1	3	1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
1	4	1	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
1	5	1	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
1	6	2	2	2	2	2	2	1	0	2	0	0	0
1	7	2	2	3	2	2	2	1	0	1	0	0	0
1	8	1	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
1	9	0	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
1	10	1	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
1	11	1	2	3	2	2	2	1	0	4	Morta	Morta	Morta
1	12	1	3	3	2	3	3	3	0	0	0	0	0
1	13	3	2	0	2	2	2	1	0	0	0	0	0
1	14	1	0	2	3	0	0	1	0	0	0	0	0
1	15	0	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
1	16	1	2	2	0	2	2	2	0	0	0	0	1
1	17	1	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0
1	18	1	2	2	2	2	1	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta
1	19	1	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
1	20	1	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
1	21	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
1	22	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
1	23	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	4	Morta
1	24	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	4	Morta
1	25	1	3	2	2	3	1	1	0	0	0	0	0
1	26	3	3	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0
1	27	2	2	1	3	2	2	1	0	0	0	0	0
1	28	1	2	2	3	2	1	2	1	2	0	0	0
1	29	1	2	2	2	2	1	2	0	0	0	0	0
1	30	0	2	1	2	2	1	2	1	1	0	0	0
1	31	0	2	2	2	2	1	2	0	0	0	0	0
1	32	0	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
1	33	0	1	3	2	2	1	1	3	3	0	0	0
1	34	0	3	1	2	3	2	2	0	0	0	0	0
1	35	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0
1	36	1	3	2	3	2	2	2	0	0	0	0	0
1	37	2	2	3	2	2	2	1	1	0	3	2	3
1	38	2	2	0	3	3	2	2	0	0	0	0	4
1	39	1	2	1	2	0	2	2	1	2	0	0	0
1	40	2	3	2	2	2	3	3	0	1	0	0	0
1	41	3	1	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0
1	42	3	2	2	3	2	1	1	0	0	0	0	2
1	43	3	2	2	1	3	2	1	0	0	0	0	0

(Continuação)

1	44	3	2	1	2	2	2	3	0	0	0	0	0
1	45	3	3	3	2	2	2	1	0	0	0	0	0
1	46	3	3	2	2	2	1	0	1	0	0	3	3
1	47	3	2	3	2	2	0	2	0	1	0	3	4
1	48	3	3	2	1	2	2	0	0	0	0	0	2
1	49	2	2	2	2	2	3	2	0	0	0	0	0
1	50	3	3	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
2	1	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
2	2	1	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0
2	3	1	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
2	4	0	2	2	2	2	2	1	1	0	4	Morta	Morta
2	5	1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
2	6	1	2	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0
2	7	1	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0
2	8	0	1	2	1	1	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
2	9	2	3	1	3	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
2	10	1	2	2	1	1	1	1	0	4	Morta	Morta	Morta
2	11	1	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0
2	12	1	1	2	2	1	1	3	0	0	0	0	4
2	13	1	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
2	14	1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
2	15	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4
2	16	0	2	0	2	2	1	2	2	0	4	Morta	Morta
2	17	1	2	2	2	1	1	2	0	0	4	Morta	Morta
2	18	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	Morta	Morta
2	19	0	2	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0
2	20	1	3	1	3	3	2	2	0	0	0	0	0
2	21	0	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
2	22	1	2	2	3	2	1	2	0	0	0	0	0
2	23	1	2	2	2	0	1	2	0	1	0	0	0
2	24	0	2	2	2	2	1	2	0	0	0	0	0
2	25	0	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
2	26	1	2	1	2	2	2	2	0	0	0	0	0
2	27	1	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0
2	28	1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
2	29	1	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0
2	30	0	2	2	2	2	1	0	0	1	0	0	4
2	31	1	2	3	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
2	32	3	3	2	3	2	3	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta
2	33	3	2	2	3	2	2	2	0	0	0	0	0
2	34	3	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	3
2	35	1	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	4
2	36	1	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
2	37	0	2	2	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta
2	38	1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
2	39	0	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
2	40	3	2	2	2	1	2	2	1	0	0	0	0
2	41	0	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	3

2	42	2	3	2	2	2	2	2	3	0	0	3	3
2	43	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	3	0
2	44	0	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
2	45	0	2	2	2	2	1	2	0	0	0	0	0
2	46	1	2	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0
2	47	0	2	3	2	2	2	0	1	0	0	0	0
2	48	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
2	49	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
2	50	0	2	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0
3	1	2	2	2	2	2	3	2	0	0	0	0	0
3	2	2	3	3	3	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
3	3	1	2	2	2	3	1	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
3	4	1	2	1	2	2	1	0	3	4	Morta	Morta	Morta
3	5	0	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
3	6	2	2	2	2	2	0	0	1	4	Morta	Morta	Morta
3	7	1	0	2	0	0	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
3	8	0	2	0	2	1	1	1	0	0	0	0	2
3	9	0	2	2	1	1	1	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
3	10	1	2	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0
3	11	1	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0
3	12	1	2	2	2	2	2	1	0	0	0	Morta	Morta
3	13	1	2	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0
3	14	1	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
3	15	1	2	2	2	2	1	0	0	0	0	Morta	Morta
3	16	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
3	17	1	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
3	18	1	2	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
3	19	1	2	1	2	2	1	1	0	4	Morta	Morta	Morta
3	20	0	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
3	21	0	2	2	2	1	1	0	0	3	3	3	0
3	22	0	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
3	23	0	2	2	2	2	2	0	1	0	0	0	4
3	24	2	2	3	2	2	2	0	0	0	0	Morta	Morta
3	25	1	2	3	3	2	1	0	0	0	0	Morta	Morta
3	26	2	3	2	3	1	2	1	1	0	0	0	0
3	27	3	3	2	2	3	2	1	0	0	0	0	0
3	28	2	2	1	3	2	1	1	0	0	0	0	0
3	29	1	2	2	0	2	1	0	0	0	0	0	1
3	30	0	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
3	31	0	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
3	32	1	2	2	3	2	2	0	0	0	0	0	0
3	33	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
3	34	1	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
3	35	1	2	2	3	2	2	0	2	0	0	0	0
3	36	2	3	3	3	2	1	2	0	0	0	0	0
3	37	1	3	2	2	3	2	0	0	0	0	0	0
3	38	1	2	1	3	2	2	1	0	0	0	0	0
3	39	3	3	3	3	3	2	3	0	0	0	0	0

(Continuação)

3	40	3	2	2	1	2	3	3	0	2	3	3	4
3	41	0	2	1	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
3	42	1	2	2	2	2	2	0	4	Morta	Morta	Morta	Morta
3	43	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	1
3	44	2	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
3	45	1	2	2	2	2	2	1	0	0	Morta	Morta	Morta
3	46	1	2	2	2	2	1	0	1	0	0	0	0
3	47	1	2	2	2	1	1	0	1	1	0	0	0
3	48	1	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
3	49	0	2	2	2	2	2	1	0	0	Morta	Morta	Morta
3	50	1	2	2	2	2	2	0	0	2	0	0	0
4	1	2	2	2	2	2	2	1	0	1	0	0	0
4	2	0	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	1
4	3	0	2	1	1	1	1	0	4	Morta	Morta	Morta	Morta
4	4	1	2	2	2	2	0	1	1	0	0	0	4
4	5	1	2	1	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
4	6	1	2	2	2	2	2	0	0	1	0	0	0
4	7	1	2	2	3	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
4	8	2	2	2	1	3	2	0	0	4	Morta	Morta	Morta
4	9	1	2	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
4	10	1	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
4	11	2	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
4	12	2	2	2	2	2	2	3	1	Morta	Morta	Morta	Morta
4	13	2	2	2	2	1	1	1	1	Morta	Morta	Morta	Morta
4	14	1	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0
4	15	1	2	2	2	2	2	3	0	0	0	0	0
4	16	1	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0
4	17	1	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
4	18	1	2	2	2	3	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
4	19	3	3	2	2	1	2	0	4	Morta	Morta	Morta	Morta
4	20	0	2	1	2	2	2	0	0	4	Morta	Morta	Morta
4	21	1	2	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0
4	22	0	2	2	2	2	2	0	0	Morta	Morta	Morta	Morta
4	23	1	2	2	2	2	1	3	0	0	Morta	Morta	Morta
4	24	1	2	2	2	2	1	0	0	0	0	Morta	Morta
4	25	2	2	1	2	2	2	1	0	0	0	0	0
4	26	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
4	27	2	0	2	2	0	2	0	0	0	0	0	1
4	28	3	2	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
4	29	0	2	0	0	2	2	1	0	0	0	0	0
4	30	1	2	2	2	2	2	2	1	Morta	Morta	Morta	Morta
4	31	2	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0
4	32	1	2	1	2	2	1	0	1	0	0	0	0
4	33	1	2	1	2	2	2	0	1	0	0	4	Morta
4	34	1	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
4	35	1	2	2	2	2	2	2	0	0	Morta	Morta	Morta
4	36	1	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
4	37	1	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0

4	38	0	2	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0
4	39	1	3	1	2	2	2	1	1	0	0	0	0
4	40	1	2	2	2	1	2	0	1	0	0	0	0
4	41	3	0	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0
4	42	2	2	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0
4	43	0	2	0	2	2	2	1	0	0	0	0	0
4	44	1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
4	45	1	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
4	46	1	2	2	2	3	0	2	0	0	0	0	0
4	47	0	2	1	1	2	2	2	0	0	0	0	0
4	48	1	2	1	2	3	2	2	0	Morta	Morta	Morta	Morta
4	49	1	3	2	2	3	2	0	0	0	0	0	0
4	50	2	3	2	2	1	2	1	0	0	0	0	0
5	1	0	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
5	2	1	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0
5	3	1	2	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0
5	4	1	3	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
5	5	1	2	2	2	2	2	2	1	1	0	0	0
5	6	1	3	2	2	1	2	2	1	Morta	Morta	Morta	Morta
5	7	1	2	3	3	1	2	2	1	1	0	0	0
5	8	1	2	1	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
5	9	1	2	1	2	2	2	2	0	0	0	0	0
5	10	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
5	11	1	2	2	2	1	2	2	0	0	0	0	0
5	12	1	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	1
5	13	0	2	1	2	3	2	2	0	0	0	Morta	Morta
5	14	1	2	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0
5	15	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	Morta
5	16	1	2	2	2	3	1	1	0	0	0	2	2
5	17	2	2	2	3	1	1	1	0	0	0	0	0
5	18	1	2	2	3	2	3	3	0	0	0	0	0
5	19	1	2	1	2	2	2	2	0	0	0	0	4
5	20	3	2	1	2	2	0	0	1	0	0	4	Morta
5	21	1	3	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0
5	22	3	3	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
5	23	1	2	2	3	2	2	2	0	0	0	0	0
5	24	2	2	2	3	2	2	2	0	0	0	0	0
5	25	2	2	2	2	1	2	2	0	0	0	0	0
5	26	2	2	2	2	1	2	2	0	0	0	0	0
5	27	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
5	28	0	2	2	2	1	2	2	1	4	Morta	Morta	Morta
5	29	1	1	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0
5	30	1	2	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0
5	31	2	2	1	2	2	1	1	1	0	0	0	0
5	32	1	1	2	1	0	2	2	0	0	0	0	0
5	33	0	3	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0
5	34	3	2	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0
5	35	0	0	2	1	3	2	2	0	0	0	0	0

(Continuação)

5	36	0	1	2	2	2	1	1	1	0	0	Morta	Morta
5	37	0	3	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0
5	38	2	2	1	0	2	0	0	0	0	Morta	Morta	Morta
5	39	1	2	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
5	40	1	2	2	2	1	2	2	0	0	0	0	0
5	41	1	2	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0
5	42	1	1	3	2	2	2	2	0	0	0	0	0
5	43	0	2	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0
5	44	0	2	1	2	1	1	1	4	Morta	Morta	Morta	Morta
5	45	0	2	1	1	1	1	1	0	2	0	0	0
5	46	0	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
5	47	0	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
5	48	0	3	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
5	49	0	3	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0
5	50	3	2	2	2	2	3	3	0	0	0	0	0
6	1	2	2	2	3	2	2	3	1	1	0	Morta	Morta
6	2	1	3	3	3	2	3	0	0	0	0	0	0
6	3	1	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0
6	4	1	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0
6	5	2	2	2	2	2	2	0	1	1	0	0	0
6	6	1	2	2	2	2	2	0	4	Morta	Morta	Morta	Morta
6	7	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
6	8	1	1	2	2	2	2	0	3	0	0	0	0
6	9	2	2	2	2	3	2	1	2	0	0	0	0
6	10	0	3	2	2	2	2	3	1	0	0	0	0
6	11	2	2	2	2	2	1	3	2	0	0	0	0
6	12	0	2	2	2	2	2	1	0	0	3	0	0
6	13	2	2	2	2	1	2	1	2	0	0	0	0
6	14	1	2	2	2	3	2	0	0	0	0	0	0
6	15	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
6	16	2	2	2	2	2	2	1	0	0	2	3	4
6	17	2	3	2	2	3	2	3	0	0	0	0	0
6	18	2	3	2	3	3	2	0	0	0	0	0	0
6	19	2	3	2	2	2	2	3	0	1	0	0	0
6	20	2	2	2	2	3	2	3	0	0	0	0	0
6	21	2	2	2	3	2	2	3	1	0	0	0	0
6	22	2	2	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0
6	23	2	2	2	2	2	2	1	0	1	0	0	0
6	24	1	2	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0
6	25	2	2	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0
6	26	1	2	2	3	2	2	3	0	0	0	Morta	Morta
6	27	1	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
6	28	1	2	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
6	29	0	2	2	3	2	2	3	1	0	4	Morta	Morta
6	30	0	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
6	31	1	2	2	2	2	2	3	0	0	0	0	0
6	32	1	2	2	2	2	0	3	0	0	0	0	0
6	33	0	2	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0

(Continuação)

6	34	3	2	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0
6	35	2	3	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0
6	36	1	2	3	2	2	1	1	1	1	0	0	0
6	37	1	2	2	2	2	2	1	0	0	0	3	4
6	38	1	2	1	2	2	1	0	0	0	0	0	0
6	39	1	1	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0
6	40	1	2	2	2	2	2	1	1	4	Morta	Morta	Morta
6	41	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
6	42	0	2	2	1	1	2	1	4	Morta	Morta	Morta	Morta
6	43	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
6	44	0	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
6	45	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
6	46	0	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
6	47	1	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0
6	48	1	2	1	2	2	0	1	0	1	0	0	0
6	49	1	1	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0
6	50	0	2	1	1	2	1	2	0	0	0	0	0
7	1	1	2	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0
7	2	1	2	2	2	2	1	1	2	0	0	0	0
7	3	2	2	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0
7	4	1	2	2	2	1	1	0	0	1	0	0	0
7	5	3	3	2	3	3	2	3	0	0	0	0	0
7	6	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
7	7	1	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0
7	8	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
7	9	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
7	10	1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
7	11	2	2	2	2	2	1	2	0	0	0	0	0
7	12	1	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0
7	13	0	2	1	2	1	3	0	0	0	0	0	0
7	14	0	2	1	3	2	3	0	0	0	0	0	0
7	15	1	3	3	3	3	1	3	0	0	0	0	0
7	16	3	3	3	2	3	1	3	0	0	0	0	0
7	17	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
7	18	1	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
7	19	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
7	20	2	2	2	2	2	0	0	4	Morta	Morta	Morta	Morta
7	21	1	3	2	2	3	0	1	0	0	0	0	0
7	22	1	2	2	0	2	2	1	0	0	0	0	0
7	23	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0
7	24	0	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
7	25	1	2	2	2	2	2	0	0	4	Morta	Morta	Morta
7	26	2	2	1	2	2	2	1	0	0	0	4	Morta
7	27	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
7	28	2	2	1	3	2	2	0	0	4	Morta	Morta	Morta
7	29	1	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0
7	30	1	3	1	1	1	2	0	1	0	0	0	0
7	31	3	2	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0

(Continuação)

7	32	2	2	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0
7	33	1	2	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
7	34	0	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
7	35	0	3	3	2	0	2	0	0	0	0	0	0
7	36	1	1	2	2	2	2	0	0	Morta	Morta	Morta	Morta
7	37	1	2	2	2	2	2	3	0	0	0	0	0
7	38	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
7	39	1	2	2	2	2	2	2	0	0	Morta	Morta	Morta
7	40	1	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0
7	41	2	2	1	2	2	3	1	0	0	0	4	Morta
7	42	2	2	3	3	2	2	0	1	0	0	0	0
7	43	2	2	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0
7	44	1	3	2	3	2	3	2	0	0	0	0	0
7	45	3	2	2	3	3	2	0	4	Morta	Morta	Morta	Morta
7	46	2	3	2	3	3	3	3	0	1	0	0	0
7	47	2	3	3	3	3	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
7	48	3	3	1	2	2	2	1	0	0	0	0	0
7	49	3	2	2	2	2	2	3	1	0	0	0	0
7	50	3	3	2	3	2	3	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
8	1	2	2	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0
8	2	2	2	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0
8	3	1	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
8	4	1	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
8	5	2	3	3	3	2	1	2	2	0	0	0	0
8	6	1	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
8	7	2	2	2	2	2	2	1	4	Morta	Morta	Morta	Morta
8	8	0	2	3	3	2	2	3	0	0	0	0	0
8	9	2	2	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0
8	10	2	3	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
8	11	3	2	3	3	2	3	0	0	0	0	0	0
8	12	3	2	2	2	3	2	0	0	0	0	0	0
8	13	3	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
8	14	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
8	15	2	3	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
8	16	2	3	2	2	2	1	0	0	1	3	3	4
8	17	2	3	2	3	1	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
8	18	3	3	2	3	3	2	0	0	1	0	0	0
8	19	3	3	3	2	3	2	0	0	2	0	0	0
8	20	2	2	2	3	3	3	1	0	0	0	0	0
8	21	0	2	2	2	3	3	2	0	0	0	0	0
8	22	0	3	3	2	3	2	1	0	0	0	0	0
8	23	0	3	2	3	2	1	0	0	0	0	3	0
8	24	0	3	3	2	3	3	0	4	Morta	Morta	Morta	Morta
8	25	3	3	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
8	26	2	3	2	1	2	2	0	0	0	0	0	0
8	27	2	2	3	2	2	1	3	3	0	0	0	0
8	28	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
8	29	1	3	2	2	1	1	1	1	1	0	0	0

8	30	2	2	2	3	2	2	1	1	0	0	0	0
8	31	1	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
8	32	1	2	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0
8	33	1	2	1	2	2	0	0	0	0	0	Morta	Morta
8	34	0	2	2	3	2	0	3	0	0	0	0	0
8	35	0	2	2	3	2	1	0	0	0	0	0	0
8	36	0	2	1	3	1	2	3	0	0	0	0	0
8	37	0	2	1	1	3	1	3	0	0	0	0	0
8	38	2	3	3	3	2	3	0	0	0	0	0	0
8	39	3	2	2	3	2	2	0	0	0	0	0	0
8	40	2	2	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0
8	41	2	2	1	1	1	0	2	1	0	0	0	0
8	42	1	2	1	1	2	2	1	0	0	0	0	0
8	43	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
8	44	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
8	45	2	3	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
8	46	1	2	2	3	2	2	1	0	0	0	0	0
8	47	2	2	2	3	2	2	0	0	0	0	0	0
8	48	1	2	1	2	3	2	0	0	0	0	0	0
8	49	1	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0
8	50	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
9	1	2	3	2	3	2	2	0	4	Morta	Morta	Morta	Morta
9	2	3	2	2	2	2	1	0	4	Morta	Morta	Morta	Morta
9	3	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
9	4	2	2	2	3	2	2	0	0	0	0	0	0
9	5	2	2	2	3	3	2	3	0	0	0	0	0
9	6	3	3	2	2	2	3	3	0	0	0	0	0
9	7	2	3	3	3	2	2	3	0	0	0	0	0
9	8	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
9	9	3	3	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
9	10	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
9	11	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	Morta	Morta
9	12	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
9	13	1	2	2	2	2	1	0	0	0	0	Morta	Morta
9	14	1	2	1	2	2	2	3	0	0	0	0	0
9	15	2	2	2	2	2	3	0	0	0	0	0	0
9	16	1	2	2	2	2	2	0	0	0	0	Morta	Morta
9	17	3	2	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0
9	18	1	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
9	19	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
9	20	2	2	2	2	2	2	0	0	4	Morta	Morta	Morta
9	21	0	2	2	2	2	1	3	4	Morta	Morta	Morta	Morta
9	22	2	2	1	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
9	23	0	2	2	2	3	1	0	0	0	Morta	Morta	Morta
9	24	2	2	1	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
9	25	3	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
9	26	3	2	2	2	3	3	0	0	0	0	0	0
9	27	1	2	2	2	2	2	3	4	Morta	Morta	Morta	Morta

(Continuação)

9	28	1	2	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
9	29	3	2	2	3	2	2	0	0	0	0	4	Morta
9	30	2	1	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0
9	31	2	3	2	3	2	2	0	0	0	0	0	0
9	32	3	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
9	33	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
9	34	1	2	2	2	2	0	3	0	0	0	0	0
9	35	1	2	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0
9	36	2	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0
9	37	1	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
9	38	2	2	2	3	2	1	1	0	Morta	Morta	Morta	Morta
9	39	1	2	2	2	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
9	40	2	2	2	2	1	2	1	0	0	0	0	0
9	41	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
9	42	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0
9	43	1	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
9	44	1	2	2	1	3	1	3	0	0	0	0	0
9	45	0	2	2	3	2	1	1	0	0	0	0	0
9	46	1	2	2	1	2	2	1	0	0	0	0	0
9	47	0	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0
9	48	1	2	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0
9	49	0	2	3	3	3	1	0	0	0	4	Morta	Morta
9	50	1	3	1	3	2	1	0	0	0	0	Morta	Morta
10	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10	2	2	2	0	2	2	2	2	1	0	4	Morta	Morta
10	3	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
10	4	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
10	5	2	2	2	2	2	2	2	3	3	0	0	0
10	6	3	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0
10	7	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
10	8	1	1	2	1	2	1	1	0	0	0	0	0
10	9	1	2	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0
10	10	1	2	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0
10	11	1	2	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0
10	12	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
10	13	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
10	14	0	2	0	2	0	2	2	0	0	0	0	0
10	15	0	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
10	16	1	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
10	17	0	3	3	2	3	3	3	1	0	0	0	0
10	18	0	2	2	3	2	2	2	1	0	0	0	0
10	19	0	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0
10	20	1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
10	21	2	2	2	2	3	3	3	0	0	0	0	0
10	22	2	3	3	2	2	2	2	0	0	0	0	0
10	23	2	2	2	3	2	2	2	0	0	0	0	0
10	24	2	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
10	25	1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0

		(Conclusão)											
10	26	2	2	2	2	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
10	27	1	2	2	2	2	1	1	0	Morta	Morta	Morta	Morta
10	28	0	2	2	1	1	4	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
10	29	0	2	2	2	1	1	1	0	0	4	Morta	Morta
10	30	1	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0
10	31	1	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
10	32	0	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
10	33	1	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0	0
10	34	0	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
10	35	2	2	2	3	2	2	2	0	0	0	0	0
10	36	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
10	37	2	3	2	2	3	2	2	0	1	0	0	0
10	38	3	2	2	3	2	2	2	1	1	0	0	0
10	39	3	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
10	40	2	3	3	2	3	2	2	0	0	0	0	0
10	41	1	2	3	2	2	2	2	0	Morta	Morta	Morta	Morta
10	42	2	2	2	3	2	2	2	1	0	0	0	0
10	43	0	2	2	3	2	1	1	0	0	0	0	0
10	44	1	2	2	2	3	3	3	0	0	0	0	0
10	45	1	3	3	3	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta
10	46	1	2	2	2	2	2	2	4	Morta	Morta	Morta	Morta
10	47	1	2	2	2	3	3	3	0	0	Morta	Morta	Morta
10	48	0	2	2	3	3	2	2	1	0	0	0	0
10	49	1	2	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0
10	50	1	3	2	3	3	2	2	0	0	0	0	0

Área 2 – Evolução das Notas (2018/2019)

(Continua)

Parcela	Planta	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março
1	1	2	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
1	2	3	2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
1	3	2	2	1	1	2	0	0	1	0	0	0	0
1	4	3	2	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
1	5	3	2	2	2	2	0	1	1	0	0	0	0
1	6	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	7	3	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
1	8	2	2	1	0	0	0	1	0	0	1	2	2
1	9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	10	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
1	11	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1	12	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	13	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1	14	1	1	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0
1	15	3	2	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0
1	16	1	2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
1	17	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	18	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	19	1	1	0	2	2	0	2	0	0	0	0	0
1	20	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1	21	3	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
1	22	1	2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
1	23	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	24	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3
1	25	1	1	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0
1	26	2	2	1	1	1	0	1	0	0	0	0	2
1	27	2	2	1	2	2	0	0	0	0	0	0	2
1	28	0	2	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0
1	29	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	30	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
1	31	2	1	1	2	0	0	3	0	0	0	0	0
1	32	1	3	2	0	1	0	1	0	0	0	3	3
1	33	3	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
1	34	2	2	1	0	0	0	1	0	0	3	0	0
1	35	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1	36	2	2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
1	37	2	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
1	38	2	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1	39	0	2	2	3	2	0	0	0	0	3	2	2
1	40	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	41	3	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
1	42	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2
1	43	2	3	1	2	2	0	0	0	0	0	0	1
1	44	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	45	0	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0

1	46	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	47	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1	48	3	2	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0
1	49	1	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1
1	50	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	1	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	3	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
2	4	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	5	2	2	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0
2	6	2	2	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
2	7	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
2	8	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	9	3	2	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0
2	10	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	11	1	2	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0
2	12	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
2	13	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	14	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	17	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	18	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0
2	19	3	2	1	3	2	0	0	1	0	0	3	0
2	20	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	21	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	22	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	23	2	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
2	24	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	25	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	26	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	27	1	2	2	2	1	0	1	0	0	0	0	0
2	28	3	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	29	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
2	30	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
2	31	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
2	32	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
2	33	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	34	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	35	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4	Morta	Morta
2	36	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
2	37	3	3	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
2	38	2	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
2	39	2	3	1	3	0	0	1	1	0	0	0	0
2	40	2	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
2	41	2	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
2	42	1	2	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0
2	43	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	2	0

2	44	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	45	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	46	1	2	1	3	0	0	0	0	0	0	3	0
2	47	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	48	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	49	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	2	2
3	2	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
3	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	4	2	1	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
3	5	2	2	1	2	2	0	1	0	0	0	3	0
3	6	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
3	7	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	8	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	9	3	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	10	3	3	2	3	0	0	1	0	0	0	0	0
3	11	0	2	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
3	12	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	13	3	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	14	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	16	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	17	2	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3	18	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	20	0	0	3	3	0	0	1	0	0	0	0	0
3	21	1	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	22	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	24	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	25	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
3	30	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3	31	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	32	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	33	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
3	34	2	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
3	35	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	36	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	37	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	38	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	39	1	2	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0
3	40	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	41	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3	42	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	43	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
3	44	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	46	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	47	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	48	2	2	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	49	2	2	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	50	0	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	2	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	2	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	3	3	3	3	3	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	6	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	7	1	2	1	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	8	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	10	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	12	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	13	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	14	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	15	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	16	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	17	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	18	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	19	1	2	1	0	0	0	2	0	Morta	Morta	Morta	Morta			
4	20	2	2	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	21	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	22	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	23	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	24	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	25	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	26	1	2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	27	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	28	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	29	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	30	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	31	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	32	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	33	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	34	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	35	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	36	1	0	0	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4	37	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	38	2	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	39	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(Continuação)

4	40	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	41	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
4	42	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	43	1	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	44	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	46	2	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4	47	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	48	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	49	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
4	50	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
5	1	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	2	1	2	1	2	0	0	1	1	0	0	0	0
5	3	2	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
5	4	3	3	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
5	5	1	2	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
5	6	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	7	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	8	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	9	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	10	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	11	2	2	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
5	12	2	2	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0
5	13	3	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	14	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	15	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	16	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	17	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5	18	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	19	2	3	0	0	3	2	1	0	0	0	0	0
5	20	1	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0
5	21	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	22	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	23	1	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
5	24	2	2	2	2	2	0	0	1	0	0	0	0
5	25	3	3	2	2	0	0	1	1	0	0	0	0
5	26	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	27	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	28	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	29	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	30	2	2	1	2	0	0	1	1	0	0	0	0
5	31	2	2	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0
5	32	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	33	2	3	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
5	34	3	2	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0
5	35	2	2	2	2	0	3	1	0	0	0	0	0
5	36	2	2	2	3	0	0	1	0	0	0	0	0
5	37	2	1	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0

5	38	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	39	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	40	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
5	41	2	2	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
5	42	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	43	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	44	3	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
5	45	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	46	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	47	2	2	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
5	48	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5	49	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	50	1	2	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	1	2	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	2	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6	3	1	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0
6	4	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	6	2	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	7	2	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0
6	8	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
6	9	1	0	1	2	0	0	0	0	0	3	0	0
6	10	3	2	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0
6	11	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6	12	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6	13	1	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	14	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6	15	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	16	2	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	17	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	18	3	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0
6	19	2	2	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	20	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6	21	1	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	22	3	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
6	23	2	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	24	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
6	25	1	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	26	1	0	1	2	0	0	1	0	0	0	2	2
6	27	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
6	28	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	29	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	30	2	2	1	2	0	0	1	0	0	0	2	0
6	31	2	2	3	3	0	0	1	0	0	0	2	0
6	32	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6	33	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	34	0	2	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	35	2	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0

(Continuação)

6	36	2	2	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	37	3	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
6	38	2	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6	39	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
6	40	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
6	41	1	2	1	2	2	0	1	0	0	0	0	0
6	42	1	2	1	1	2	0	1	0	0	0	0	0
6	43	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	2	0
6	44	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	45	1	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0
6	46	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	47	3	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6	48	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
6	49	2	2	1	3	0	0	1	0	0	0	0	0
6	50	3	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
7	2	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
7	3	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
7	4	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	5	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	6	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
7	7	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
7	8	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	9	2	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
7	10	2	3	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
7	11	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	12	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	13	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
7	14	2	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
7	15	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	16	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
7	17	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	18	1	1	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0
7	19	3	2	3	3	0	0	1	0	0	0	0	0
7	20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	21	1	3	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0
7	22	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	23	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
7	24	1	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
7	25	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	26	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	27	2	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
7	28	1	3	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0
7	29	3	2	2	2	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
7	30	2	2	3	2	0	0	1	0	0	0	0	0
7	31	1	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
7	32	1	2	1	2	2	0	1	0	0	0	0	0
7	33	2	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0

7	34	2	1	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0
7	35	2	3	2	3	2	0	1	0	0	0	0	0
7	36	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
7	37	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
7	38	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
7	39	0	2	1	3	0	0	1	0	0	0	0	0
7	40	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
7	41	1	2	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0
7	42	1	2	2	1	2	0	1	0	0	0	0	0
7	43	1	2	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0
7	44	1	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
7	45	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
7	46	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
7	47	2	2	2	2	0	0	1	1	1	1	0	0
7	48	2	2	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0
7	49	3	3	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0
7	50	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
8	1	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
8	2	1	2	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
8	3	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8	4	2	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
8	5	2	2	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0
8	6	1	2	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
8	7	2	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
8	8	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
8	9	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	10	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
8	11	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
8	12	1	2	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
8	13	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8	14	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
8	15	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
8	16	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
8	17	2	2	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
8	18	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
8	19	1	2	1	2	0	0	2	0	0	0	0	0
8	20	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	21	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
8	22	1	2	0	2	2	0	0	1	0	0	0	0
8	23	1	2	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0
8	24	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
8	25	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8	26	1	2	1	2	0	0	2	0	0	0	0	0
8	27	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	28	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
8	29	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	30	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
8	31	1	1	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0

(Continuação)

8	32	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8	33	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8	34	3	3	2	2	3	0	0	0	0	0	0	0
8	35	1	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
8	36	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8	37	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8	38	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8	39	2	3	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
8	40	1	2	2	3	0	0	1	0	0	0	0	0
8	41	3	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0
8	42	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	2	0
8	43	3	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
8	44	2	2	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
8	45	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	2	0
8	46	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	47	2	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0
8	48	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
8	49	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	50	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
9	2	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	3	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
9	4	3	3	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
9	5	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	6	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	7	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	8	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	9	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	10	0	2	0	2	0	0	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
9	11	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
9	12	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
9	13	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
9	14	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
9	15	0	3	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0
9	16	3	2	2	0	0	0	0	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
9	17	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
9	18	2	2	3	3	2	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
9	19	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	20	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
9	21	1	2	1	2	4	4	4	4	4	4	Morta	Morta
9	22	1	2	1	3	0	0	1	0	0	0	0	0
9	23	3	3	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
9	24	1	2	1	3	0	0	1	0	0	0	1	0
9	25	3	3	1	2	2	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
9	26	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
9	27	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	28	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
9	29	1	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0

(Continuação)

9	30	1	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0
9	31	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	32	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
9	33	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	34	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	35	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
9	36	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
9	37	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
9	38	2	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
9	39	2	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	40	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
9	41	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
9	42	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	43	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	44	2	1	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
9	45	2	1	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0
9	46	2	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
9	47	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
9	48	2	2	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
9	49	2	3	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
9	50	2	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	1	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
10	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	4	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
10	5	3	1	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0
10	6	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	7	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
10	8	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	9	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	10	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10	11	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10	12	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
10	13	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	14	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	15	2	2	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0
10	16	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
10	17	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
10	18	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
10	19	3	2	1	2	2	0	0	0	Morta	Morta	Morta	Morta
10	20	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	21	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	22	2	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
10	23	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
10	24	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	Morta
10	25	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	26	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	27	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(Conclusão)

10	28	3	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta
10	29	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	30	2	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
10	31	2	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	32	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
10	33	1	2	1	3	0	0	1	0	0	0	0	0
10	34	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	35	3	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
10	36	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	37	1	2	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0
10	38	1	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
10	39	0	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
10	40	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	41	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	42	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	43	1	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
10	44	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	45	3	3	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
10	46	2	2	3	2	3	2	1	0	0	0	0	0
10	47	3	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0
10	48	0	2	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
10	49	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	50	1	3	1	3	0	0	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta	Morta

ANEXO A - Protocolo utilizados para a realização da caracterização bioquímica

Todos os protocolos foram propostos segundo Schaad (2001) para diferenciação de grupos bacterianos.

ANEXO A1 - Teste de Gram de Ryu

O teste é utilizado para distinguir se o isolado bacteriano a serem avaliado é gram-positivo ou gram-negativo. Para a realização do procedimento utiliza-se água destilada esterilizada e hidróxido de potássio (KOH) na concentração de 3%. Portanto, com o auxílio de uma alça de platina deve ser coletado uma ou mais colônias do isolado avaliado crescido em meio de cultura sólido e faz-se a deposição do mesmo em uma lâmina de vidro. Após isso, deve ser feito o acréscimo da solução de KOH e espera-se por 5 a 10 segundos para que seja feita a revelação do teste em questão.

Caso a solução de massa bacteriana e KOH se torne viscosa, de modo que pode ser observado a formação de um fio de material viscoso ao ser puxado com a alça da lamina, o teste é positivo, indicando assim que o isolado avaliado é de uma bactéria gram-negativo. Ao contrário, a reação é negativa e a bactéria é gram-positiva.

ANEXO A2 - Reação de Hipersensibilidade (HR) em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum*)

O teste avalia a capacidade do isolado em promover uma resposta de defesa da planta após o reconhecimento do patógeno através da explosão oxidativa e formação de lesões necróticas. Para realiza-lo é necessário a utilização de folhas novas com crescimento vigoroso de *Nicotiana tabacum*, popularmente conhecida como fumo. Além disso, o isolado avaliado deve estar suspenso em solução aquosa com concentração de 3×10^8 UFC, crescidos anteriormente em placa de Petri com meio de cultura em BOD com temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

Sendo assim, injeta-se no mesófilo foliar com auxílio de uma seringa hipodérmica a solução bacteriana em questão. Uma reação de hipersensibilidade deve ser dada com o colapso e o encharcamento do tecido inoculado após 24-48 horas, seguidos de uma necrose seca e amarronzada do tecido encharcado em até 3 dias posteriores a aplicação da solução.

ANEXO A3 - Teste de oxidação e fermentação (O/F)

O teste é utilizado para separar bactérias aeróbicas restritas daquelas que são anaeróbicas facultativas. Para a realização, utilizam-se dois tubos com meio de cultura básico para crescimento bacteriano, sendo que um dos tubos deve haver contato com o oxigênio e o outro é selado com óleo mineral esterilizado. Os dois devem ser fechados e colocados para a realização do crescimento bacteriano por até 24 horas em BOD com temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

Como resultado, se a bactéria crescer em ambos os tubos, ou seja, se houver mudança de coloração do tubo de verde para o amarelado significa que existiu fermentação e a bactéria é aeróbica facultativa. Se a bactéria crescer apenas no tubo não selado, ela é aeróbica restrita. Para a obtenção do meio de cultura básico, o mesmo segue as seguintes proporções, completando com 1000 mL de água destilada:

Tabela Anexo A.1 - Meio de cultura para realização do teste de Oxidação e Fermentação (O/F)

Reagente	Quantidade (g)
Glicose ¹	10,00 (em 50 mL)
Peptona	2,00
Cloreto de sódio (NaCl)	5,00
Fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄)	0,30
Ágar	3,00
Azul de bromotimol	0,03

Fonte: Schaad (2001)

pH 7,1 – Autoclavar a 121°C por 20 minutos

¹O carboidrato deve ser esterilizado por filtração e acrescentado ao meio esterilizado e resfriado a 50°C para dar uma concentração final de 1%.

ANEXO A4 - Teste de produção de fosfatase

O teste em questão mede a capacidade do microrganismo para produzir a fosfatase suficiente para quebrar o difosfato de fenoltaleína.

Deve-se fundir 100 mL do meio de cultura nutriente ágar e esfria-lo a 50°C , feito isso, deverá ser adicionado uma solução previamente esterilizada de fenoltaleína a 5%, de forma a obter uma concentração final de 0,05% e distribuir em placas de Petri esterilizadas. Após a solidificação do meio, as bactérias a serem avaliadas devem ser

inoculadas no mesmo e incubadas para que os isolados cresçam em 24 horas em BOD com temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

Após o crescimento em placa de Petri, é necessário expor as mesmas ao vapor de amônia (solução de amônia), através da adição de algumas gotas de hidróxido de amônia em papel filtro, inserido na borda da placa ou na própria massa bacteriana. A reação positiva é indicada pela coloração vermelha ou rósea das colônias e a reação negativa pela não mudança de cor do isolado.

ANEXO A5 - Teste de produção de enzima catalase

Para realizar o teste é necessário inicialmente ter os isolados bacterianos crescidos em meio de cultura nutriente ágar. Após isso, deve ser feito um esfregaço sobre uma lâmina de vidro com uma alça de platina carregada de massa bacteriana a ser testada. Ademais, sobre este material deve ser adicionada uma gota de água oxigenada a 20 volumes. O desprendimento de bolhas de oxigênio sobre ele indicam uma reação positiva, provando assim que a bactéria é capaz de produzir a enzima catalase.

ANEXO A6 - Teste de redução de nitrato a nitrito

O teste propõe a diferenciação entre as bactérias capazes de reduzir nitrato a nitrito das que não possuem esta capacidade. Para realiza-lo é necessário ter as colônias bacterianas dos isolados a serem avaliados crescidos por até 24 horas em BOD com temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas em meio de cultura nutriente ágar. O meio líquido de nitrato deverá ser feito nas seguintes proporções, que deverão ser distribuídos em tubos, contendo 5 mL em cada e autoclavados a aproximadamente 121°C por 20 minutos:

Tabela Anexo A.2 - Meio de cultura para realização do teste de redução de nitrato a nitrito

Reagente	Quantidade
Água destilada	1000 mL
Peptona	1,00 g
Nitrato de Potássio (KNO_3)	0,20 g

Fonte: Schaad (2001)

Os reativos que deverão ser utilizados são:

- a) 30 mg de ácido sulfanílico dissolvido em 10 mL de ácido acético 30% (v/v de ácido acético glacial);
- b) 50 mg de alfa naftilamina dissolvida em 10 mL de ácido acético 30%.

Para a realização do teste deve-se inocular e incubar a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 2 a 3 dias os isolados, após isso adicionar 0,50 mL de cada um dos reativos, para 5 mL do meio e fazer um processo de agitação do material. O aparecimento da cor vermelha indica a presença do nitrato, o não aparecimento da cor vermelha pode indicar que o nitrato não foi reduzido ou que foi reduzido além do nitrato, para isso, basta colocar um pouco de zinco. Caso apareça a cor vermelha é porque a bactéria não reduziu o nitrato. Em caso contrário comprova-se a segunda hipótese.

ANEXO A7 - Teste de produção de ácidos a partir de carboidratos

Tal teste avaliará a capacidade do isolado bacteriano a ser testado de produzir ácidos a partir de carboidratos importantes como manitol e rafinose. Para a realização do mesmo necessitam-se de isolados a serem testados crescidos por até 24 horas em BOD com temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ em meio de cultura nutriente ágar.

Para a obtenção do meio básico é necessário, para um volume final de 900 mL, completar com água destilada:

Tabela Anexo A.3 - Meio de cultura para realização do teste de produção de ácidos a partir de carboidratos

Reagente	Quantidade
Fosfato de Amônio ($(\text{NH}_4(\text{H}_2\text{PO}_4))$)	500 mg
Fosfato de Potássio (K_2HPO_4)	500 mg
Sulfato de Magnésio ($\text{MgSo}_4.7\text{H}_2\text{O}$)	200 mg
Cloreto de Sódio (NaCl)	500 mg
Extrato de levedura	500 mg
Azul de bromotimol a 1%	5 mL

Fonte: Schaad (2001)

Corrigir o pH em ponto neutro (pH 7,0): para isto basta deixar o meio na cor verde claro.

Para preparar o meio semi-sólido, adicionar 3g de ágar/litro. Neste caso, deve ser aquecido até a fervura para homogeneizar o teor de ágar. Os carboidratos são

preparados na concentração de 15%, exceto aqueles menos solúveis em água e autoclavados ou filtrados em filtros de membrana e para cada frasco contendo 5mL de meio básico deverão ser acrescentados 166,6 µL de Manitol ou Rafinose 15%. A mudança da coloração indica que o teste é positivo, ou seja, existe a produção de ácidos a partir de carboidratos.