

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE ELABORAÇÃO E
VALIDAÇÃO DE ESCALA DIAGRAMÁTICA DE BACTERIOSE
FOLIAR EM DIFERENTES CLONES DE *Eucalyptus urophylla* X
*Eucalyptus grandis***

VÍTOR FLÁVIO FURTADO DAMASCENO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP - *campus*
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Ciência Florestal.

BOTUCATU – SP
Agosto - 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE ELABORAÇÃO E
VALIDAÇÃO DE ESCALA DIAGRAMÁTICA DE BACTERIOSE
FOLIAR EM DIFERENTES CLONES DE *Eucalyptus urophylla* X
*Eucalyptus grandis***

VÍTOR FLÁVIO FURTADO DAMASCENO

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo de Souza Passos

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP - *campus*
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Ciência Florestal.

BOTUCATU – SP
Agosto - 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

D155c Damasceno, Vítor Flávio Furtado, 1986-
Comparação entre métodos de elaboração e validação de escala diagramática de bacteriose foliar em diferentes clones de *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus grandis* / Vítor Flávio Furtado Damasceno. - Botucatu : [s.n.], 2016
ix, 49 f. : fots. color., ils. color., grafs. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016
Orientador: José Raimundo de Souza Passos
Coorientador: Edson Luiz Furtado
Inclui bibliografia

1. Eucalipto - Doenças e pragas. 2. Pseudomonas. 3. Xanthomonas. 4. Weber-Fechner, Lei de. 5. Bactérias fitopatogênicas - Concentração. 6. Viveiros florestais. I. Passos, José Raimundo de Souza. II. Furtado, Edson Luiz. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE ELABORAÇÃO E DE VALIDAÇÃO DE ESCALA DIAGRAMÁTICA DE BACTERIOSE FOLIAR EM DIFERENTES CLONES DE *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus grandis*

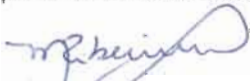
AUTOR: VÍTOR FLÁVIO FURTADO DAMASCENO

ORIENTADOR: JOSÉ RAIMUNDO DE SOUZA PASSOS

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



Prof. Dr. JOSÉ RAIMUNDO DE SOUZA PASSOS
Departamento de Bioestatística / Instituto de Biociências de Botucatu



Profa. Dra. MAGALI RIBEIRO DA SILVA
Dep de Ciencia Florestal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu



Profa. Dra. LIDIA RAQUEL DE CARVALHO
Departamento de Bioestatística / Faculdade de Ciências Agrônoma - UNESP

Botucatu, 08 de setembro de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo amor e apoio diário que tornaram possíveis conclusões como esta. À minha mãe Edna, minha irmã Andréia, meus irmãos Deoclécio e Mário, pela presença e todo o incentivo e ajuda de toda e qualquer natureza, sempre que foi necessário. À Bibiana e Ísis por todo amor e carinho que me deram força.

Ao professor Edson Luiz Furtado por esta grande oportunidade que foi oferecida, que, sem sombra de dúvidas, foi uma etapa que contribuiu para minha evolução mental e espiritual, além de todos os ensinamentos e dicas com seu otimismo característico.

Ao professor José Raimundo de Souza Passos pela orientação, por todos os momentos dedicados à atenção deste trabalho, paciência, ensinamentos técnicos, além de sua contribuição com idéias, budistas ou não, que serviram para formação de novos pontos de vista.

Ao grupo de orientados do Prof. Raimundo que me acompanhou desde o início desta jornada acadêmica, do qual fazem parte André Stefanini Jim e João Ricardo Favan, pela troca de ótimas idéias e experiências.

Aos orientados do Prof. Furtado, Cristiane (Cris) e José Carlos (Buri), e às estagiárias, Mirian e Carol, pela disponibilidade e toda ajuda acadêmica durante estes anos.

À ZAF Agroflorestral e Juliana Rosa pela abertura e pelo fornecimento de amostras e mudas.

Aos amigos que estiveram presentes desde a graduação, Lucas Viégas (Macarrão), Rafael Pinheiro (Soneca), Raoni Melo (Cabeça), Victória Pires (Pirikita), fortalecendo ainda mais os laços de anos de amizade.

Aos companheiros de república, Gilmar Picoli, José Bentivenha (Cuti), Felipe Góes (Véia), Rafael Barroca (Sr. Barroca), Gabriel Gasparoto (Jabá) e Leonardo Sanchez, pela convivência construtiva.

A todos que de alguma maneira fizeram parte deste percurso.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa de estudos.

DEDICO

“Para minha mãe Edna, que me ensinou o que é ser uma pessoa forte, mesmo nas maiores adversidades que uma vida pode proporcionar”

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
RESUMO	1
SUMMARY	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 Eucalipto	6
2.2 Bacteriose foliar do eucalipto	7
2.3 Escala diagramática	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Local	12
3.2 Métodos de elaboração e validação de escalas diagramáticas em diferentes clones de eucalipto	13
3.3 Efeito da concentração de inóculo de diferentes espécies de bactérias na validação de escalas diagramáticas	16
3.4 Utilização de tons de cinza de imagens digitais foliares de clones com bacteriose no estudo da severidade	18
3.5 Efeito da dispersão de área lesionada na utilização de escalas diagramáticas	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Métodos de elaboração e validação de escalas diagramáticas em diferentes clones de eucalipto	21
4.2 Efeito da concentração de inóculo de diferentes espécies de bactérias na validação de escalas diagramáticas.	30
4.3 Utilização de tons de cinza de imagens digitais foliares de clones com bacteriose no estudo da severidade	36
4.4 Efeito da dispersão de área lesionada na utilização de escalas diagramáticas	41
5 CONCLUSÃO	44
6 BIBLIOGRAFIA	45

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Diferença absoluta média e seus intervalos de confiança para cada avaliador da escala diagramática de mancha foliar bacteriana em <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> – clone H13	24
Tabela 2. Médias da diferença absoluta das estimativas dos avaliadores com e sem auxílio das escalas diagramáticas de mancha bacteriana foliar em <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> – clone I144 elaboradas pelo método de quartis e Weber-Fechner, e intervalos de confiança	27
Tabela 3. Diferença absoluta média para as avaliações de diferentes concentrações de inóculo de bactérias (mix) e seus respectivos intervalos de confiança à 95%	32
Tabela 4. Diferença entre os avaliadores da escala diagramática de mancha bacteriana foliar causada por <i>Pseudomonas</i> sp. em eucalipto, com respectivas médias da diferença absoluta e intervalos de confiança à 95%	34
Tabela 5. Correlação de Spearman entre severidade e tons de cinza (médio, modal, mínimo e máximo), seguidos dos respectivos valores p, considerando todos os clones como um único grupo	36
Tabela 6. Correlação de Spearman entre severidade e tons de cinza (médio, modal, mínimo e máximo), seguidos dos respectivos valores p, considerando clone a clone	36
Tabela 7. Médias e desvio padrão para as severidades dos clones AEC 1528, H13 e I144 de <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i>	37
Tabela 8. Médias e desvio padrão dos valores de tom de cinza médio obtidos dos clones H13, I144 e AEC 1528 de <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i>	38
Tabela 9. Médias e desvio padrão dos valores de tom de cinza modal obtidos dos clones H13, I144 e AEC 1528 de <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i>	38
Tabela 10. Médias e desvio padrão dos valores de tom de cinza máximo obtidos dos clones H13, I144 e AEC 1528 de <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i>	39
Tabela 11. Diferenças na interação entre os 6 níveis da escala e as 5 dispersões da doença utilizando diferença absoluta média	42

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Folhas sintomáticas infectadas com bacteriose apresentando: A) lesões ressecadas, B) deformação no limbo foliar e C) perfurações.	8
Figura 2. Quadro demonstrativo indicando o hospedeiro, número de clones e os métodos utilizados para elaboração das escalas diagramáticas, totalizando de seis escalas.	14
Figura 3. Exemplos de folhas amostradas de <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> infectadas com bacteriose (H13, I144 e AEC 1528, respectivamente).	15
Figura 4. A) Colônia de bactérias da espécie <i>Xanthomonas</i> sp.; B) Colônia de bactérias da espécie <i>Pseudomonas</i> sp.	16
Figura 5. Folha de <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> infectada com bacteriose isolada no modo RGB (A) e sua conversão para tons de cinza (B) no programa ImageJ.	18
Figura 6. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana em <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> – clone AEC 1528.	19
Figura 7. Folha do nível 1 (N1) da escala diagramática de mancha bacteriana foliar em <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> clone AEC 1528 e suas 4 reproduções com mesma severidade e diferentes dispersões.	20
Figura 8. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana em <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> – clone H13 elaborada pelo método da lei de acuidade visual Weber-Fechner.	22
Figura 9. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana em <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> – clone H13 elaborada pelo método de quartis.	22
Figura 10. Resíduos em função das observações para os efeitos principais significativos (método, escala e avaliador) presentes nas avaliações das escalas diagramáticas, elaboradas em quartis e Weber-Fechner, de mancha foliar bacteriana em <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> – clone H13.	23
Figura 11. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana em <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> – clone I144 elaborada pelo método da lei de acuidade visual Weber-Fechner.	25
Figura 12. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana em <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> – clone I144 elaborada pelo método de quartis.	25
Figura 13. Resíduos em função das observações para os efeitos principais significativos (método, escala e avaliador) presentes nas avaliações das escalas diagramáticas, elaboradas em quartis e Weber-Fechner, de mancha foliar bacteriana em <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> – clone I144.	26

- Figura 14.** Escala diagramática de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone AEC 1528 elaborada pelo método da lei de acuidade visual Weber-Fechner. 27
- Figura 15.** Escala diagramática de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone AEC 1528 elaborada pelo método de quartis. 28
- Figura 16.** Resíduos em função das observações para os efeitos principais significativos (método, escala e avaliador) presentes nas avaliações das escalas diagramáticas, elaboradas em quartis e Weber-Fechner, de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone AEC 1528. 29
- Figura 17.** Escala diagramática de mancha foliar bacteriana (variedade mix) para análise de severidade de tecidos lesionados em eucalipto..... 30
- Figura 18.** Resíduos das observações para os efeitos principais significativos (escala e concentração) presentes nas avaliações das escalas diagramáticas de mancha foliar bacteriana (variedade mix) em eucalipto..... 31
- Figura 19.** Escala diagramática de mancha foliar bacteriana (*Pseudomonas* sp.) para análise de severidade de tecidos lesionados em eucalipto..... 32
- Figura 20.** Resíduos das observações para os efeitos principais significativos (escala e avaliador) presentes nas avaliações das escalas diagramáticas de mancha foliar bacteriana (*Pseudomonas* sp.) em eucalipto. 33
- Figura 21.** Escala diagramática de mancha foliar bacteriana (*Xanthomonas* sp.) para análise de severidade de tecidos lesionados em eucalipto..... 34
- Figura 22.** Resíduos das observações para os efeitos principais significativos (escala e avaliador) presentes nas avaliações das escalas diagramáticas de mancha foliar bacteriana (*Xanthomonas* sp.) em eucalipto. 35
- Figura 23.** Resíduos do efeito de diferentes clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (H13, I144 e AEC 1528) na severidade de lesões causadas por mancha foliar bacteriana..... 37
- Figura 24.** Resíduos do efeito de diferentes clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (H13, I144 e AEC 1528) em tons de cinza médio das imagens das folhas digitalizadas. 39
- Figura 25.** Resíduos do efeito de diferentes clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (H13, I144 e AEC 1528) em tons de cinza modal das imagens das folhas digitalizadas..... 40
- Figura 26.** Resíduos do efeito de diferentes clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (H13, I144 e AEC 1528) em tons de cinza mínimo das imagens das folhas digitalizadas. 40

- Figura 27.** Resíduos do efeito de diferentes clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (H13, I144 e AEC 1528) em tons de cinza máximo das imagens das folhas digitalizadas. 41
- Figura 28.** Resíduos dos efeitos principais significativos (nível de escala e dispersão de lesão) presentes nas avaliações de mancha foliar bacteriana em folhas geradas artificialmente de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. 42
- Figura 29.** Resíduos do modelo ajustado pelo modelo linear generalizado de regressão baseado nas avaliações de mancha foliar bacteriana em folhas geradas artificialmente de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. 43

COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE ELABORAÇÃO E VALIDAÇÃO DE ESCALA DIAGRAMÁTICA DE BACTERIOSE FOLIAR EM DIFERENTES CLONES DE *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus grandis*. Botucatu, 2016, 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autor: VÍTOR FLÁVIO FURTADO DAMASCENO

Orientador: PROF. DR. JOSÉ RAIMUNDO DE SOUZA PASSOS

Co-Orientador: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

RESUMO

A avaliação da severidade - porcentagem da área lesionada em relação à área total - pode ser feita com auxílio de escalas diagramáticas, que são elaboradas com base na Lei Weber-Fechner e utilizam regressão linear simples em seu processo de validação, porém apresentam erros na metodologia estatística. O objetivo desta pesquisa foi propor um método de elaboração e validação de escalas de bacteriose em um híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, avaliar a influência de concentrações de diferentes espécies de bactérias na validação de escalas, verificar a possibilidade de avaliações utilizando tons de cinza, e a influência da dispersão de lesões nas estimativas dos avaliadores no uso desta ferramenta. Foram conduzidos quatro experimentos com amostras das cidades de Bofete-SP e Botucatu-SP. No primeiro experimento, foram utilizadas 100 folhas de três clones (H13, I144 e AEC 1528) de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* infectadas naturalmente com bacteriose, que tiveram sua severidade medida para elaboração, por quartis e Weber-Fechner, e validação das seis escalas diagramáticas. No segundo, mudas de eucalipto com três concentrações diferentes (10^5 , 10^7 e 10^9 indivíduos/mL) de inóculo de três bactérias (*Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp. e mix) tiveram folhas coletadas para construção de três escalas diagramáticas. No terceiro, imagens digitais das amostras de folhas dos três clones de eucalipto infectados com bacteriose foram analisadas em tons de cinza. Houve estudo de correlação entre as variáveis considerando os três clones como um único grupo e separadamente. No quarto, a escala diagramática construída para o clone AEC 1528 foi repetida em diferentes níveis de dispersão, com a mesma severidade das folhas representativas dos níveis da escala, seguidas de avaliação. No primeiro experimento, o método de quartis apresentou melhoras nas leituras quando comparado ao método Weber-Fechner, houve diferença entre os clones segundo as avaliações e o uso de escalas foi favorável. No segundo, houve melhoras nas estimativas com o uso das escalas. No terceiro, os tons de cinza podem diferenciar a severidade dos clones como um único grupo e há separação de clones por severidade. No quarto, foi detectada influência direta da dispersão das lesões da doença nas estimativas dos avaliadores. Conclui-se que o método de quartis obteve melhores resultados que o método Weber-Fechner; escalas levando em consideração a concentração de inóculo podem resultar em diferenças nas avaliações; tons de cinza podem avaliar severidade e diferenciar clones; variações na dispersão de uma mesma severidade influenciam diretamente as estimativas de um avaliador.

Palavras-chave: *Pseudomonas* sp.; *Xanthomonas* sp.; quartis; Weber-Fechner; concentração de inóculo; tons de cinza; dispersão de lesões; doença, viveiros.

COMPARISON OF ELABORATION AND VALIDATION METHODS FOR DIAGRAMMATIC SCALE OF BACTERIAL LEAF BLIGHT ON DIFFERENT *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus grandis* CLONES. Botucatu, 2016, 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: VÍTOR FLÁVIO FURTADO DAMASCENO

Adviser: PROF. DR. JOSÉ RAIMUNDO DE SOUZA PASSOS

Co-Adviser: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

SUMMARY

The severity evaluation – percentage of the injured leaf area relative to its total – could be done with the assistance of diagrammatic scales, which are elaborated based on the Weber-Fechner law and uses simple linear regression for its validation process. However, errors can be found in statistical methodology. The objective of this research was to propose methods of elaboration and validation for diagrammatic scales of bacterial leaf blight on the hybrid *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, evaluate the influence of concentrations and different species of bacteria on scales validation, verify the possibilities of evaluations using gray scale, and the influence of leaf injuries dispersion on the estimates done by evaluators using this tool. Four experiments were conducted with samples from Bofete-SP and Botucatu-SP. In the first experiment, 100 leaves were used from three different clones (H13, I144 e AEC 1528) of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* naturally infected with bacterial leaf blight, which had the severity measured for the elaboration, by quartiles and Weber-Fechner law, and the validation of the six resultant diagrammatic scales. In the second one, eucalypt leaves with three different concentrations (10^5 , 10^7 e 10^9 individuals/mL) of three bacterial inoculums (*Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp. and mix), had their leaves collected for the construction of three diagrammatic scales. In the third, the digital images of the sampled leaves of the three eucalypt clones were analyzed using gray scale values. There was made a correlation among the variables considering the three clones as one single group and separately. In the fourth, the diagrammatic scale built for the clone AEC 1528 was replicated into different levels of dispersion with the same severity of the levels present in the scale, followed by evaluation. In the first experiment, the quartiles method presented reading improvements in comparison with the Weber-Fechner method. There was difference among the clones and the use of the scale was favorable. In the second, there were estimates improvements using the scales. In the third, the gray scale can detect the difference of severity of the clones as a single group and there is clone differentiation by severity. In the fourth, it was detected direct influence of the injuries dispersion in the evaluations. It concludes that the quartiles method had better results than the Weber-Fechner method; scales considering the concentration of the inoculum could result into evaluation differences; gray scale can be used for severity evaluation and clone differentiation; variations of the same dispersion of severity can influence directly the estimates of and evaluator.

Keywords: *Pseudomonas* sp.; *Xanthomonas* sp.; quartiles; Weber-Fechner; inoculum concentration; gray scale; injuries dispersion; disease; nursery.

1 INTRODUÇÃO

A área de plantios florestais para fins industriais no Brasil no ano base 2015 foi de 7,8 milhões de hectares, apresentando 0,8% de aumento em relação ao ano anterior, atingindo 0,9% do território. Os principais destinos são empresas de papel e celulose (34%), comércio de madeira *in natura* por pequenos e médios produtores (29%), seguido pelos setores de siderurgia a carvão vegetal, painéis de madeira reconstituída e pisos laminados. O setor de árvores plantadas tem participação de 1,2% no produto interno bruto (PIB) brasileiro, além de representar 6% do PIB industrial. Da área total plantada, 5,63 milhões de hectares são representados por eucalipto, 1,58 milhões de hectares representados por pinus e 590 mil hectares por outras espécies. As áreas de árvores do gênero *Eucalyptus* correspondem a 72% do total, localizadas principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul (IBÁ, 2016). Estes dados mostram a importância do eucalipto no Brasil, fazendo com que o gênero seja tema obrigatório de estudo e pesquisa nas diversas áreas que compõe suas linhas de produção.

O crescente aumento da produção de eucalipto ao longo dos anos, gerou maior área de hospedeiros para agentes fitopatogênicos, fazendo com que uma maior atenção seja necessária para doenças que atingem espécies deste gênero. O eucalipto é alvo de diversas doenças provocadas por agentes causais de origem fúngica e alguns de origem bacteriana. A principal doença causada por bactérias é a mancha foliar bacteriana, popularmente conhecida como bacteriose, causada por espécies de *Pseudomonas* sp. e *Xanthomonas* sp. Os danos causados pela doença chegam a atingir 3 milhões de mudas anualmente, provocando perdas estimadas de até 2,4 milhões de reais por ano (FURTADO

e WILKEN, 2011). Vista a importância das espécies de eucalipto para a economia nacional, e o impacto causado pela mancha foliar bacteriana, torna-se necessário o investimento em controle e prevenção desta doença.

Existem diversos meios de se combater ou prevenir que uma doença atinja uma dada cultura. A detecção e comprovação de um ataque fitopatogênico permite ao produtor avaliar a incidência ou severidade do ataque, funcionando como diretriz para uma tomada de decisão, e consequentemente, a escolha do método a ser utilizado. A avaliação da severidade, que é a porcentagem da área lesionada pela doença em relação a área total da folha ou parte da planta analisada (KIMATI *et al.*, 2005), pode ser feita com auxílio de escalas diagramáticas. Escalas diagramáticas são ferramentas visuais que funcionam como guias para diminuir o erro nas estimativas de severidade feitas pelo responsável por analisar a doença na cultura. A elaboração das escalas é baseada, praticamente em sua totalidade na lei de Weber-Fechner (acuidade visual é proporcional ao logaritmo da intensidade do estímulo recebido). As escalas podem ser elaboradas mais de uma vez para a mesma doença, já que o ataque patogênico ocorre em diferentes situações (variando o ambiente, hospedeiro, clone utilizado). Para cada elaboração da escala diagramática, é necessária uma validação para viabilizar o uso da mesma e permitir comparações

A maneira pela qual as escalas têm sido validadas apresenta alguns detalhes passíveis de revisão, quanto a sua abordagem estatística (ANDRADE *et al.*, 2005; PASSADOR *et al.*, 2013). A validação consiste no ajuste de um modelo de regressão linear simples considerando os valores da área lesionada sem o uso da escala como variável independente (x) e os valores de área lesionada real (y), e uma regressão linear simples utilizando valores com o uso da escala como variável dependente (x) e valores reais de área lesionada (y). Os valores sem e com uso de escala são obtidos por estimativas de avaliadores, já os valores reais são obtidos através de imagens digitais das folhas (ou partes) amostradas. Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos em cada uma das regressões citadas são comparados matematicamente. Primeiramente, o modelo de regressão linear simples normal tem como uma das predisposições de que a variável independente (x) seja pré-fixada, não podem ser mensuradas (CASELLA e BERGER, 2002). Outro ponto importante, é que os valores do coeficiente de determinação (R^2) obtidos podem ser diferentes matematicamente, porém isso pode não acarretar em diferença estatística, já que os valores obtidos para o coeficiente de determinação podem

fazer parte de uma mesma população. Portanto, outras possibilidades devem ser exploradas, como métodos comparativos, como o cálculo da diferença absoluta média e de coeficientes mais apropriados como coeficiente de correlação de Spearman e o coeficiente de concordância de Lin (LIN, 1989). Existem trabalhos que já experimentaram os coeficientes citados, porém a regressão linear simples presente não foi aplicada de forma adequada (NICOLI et al., 2015). A diferença absoluta média é a medida calculada da diferença entre avaliações com e sem escala em relação à severidade verdadeira (estimativa – severidade real). Como proposto neste trabalho, além da diferença absoluta média e a correlação de Spearman, foram utilizados modelos lineares generalizados, pois permitem uma análise combinada dos fatores presentes no experimento.

Com base nas idéias apresentadas, este estudo teve por objetivos sugerir um novo método de validação de escalas diagramáticas, onde foram estabelecidos corretamente os conceitos estatísticos: a) comparar o método tradicional (Weber-Fechner) e um método de quartis na elaboração de escalas diagramáticas, e, conseqüentemente, obter novas escalas para bacteriose foliar em eucalipto; b) verificar o efeito da concentração de inóculo com diferentes espécies de bactérias no processo de validação de escalas diagramáticas; c) analisar a viabilidade de diferenciação de severidade e diferentes clones de eucalipto por tons de cinza de fotografias digitais; e d) verificar a subjetividade nas avaliações causada pela variação no padrão de dispersão da doença na folha.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Eucalipto

O *Eucalyptus*, pertencente a ordem *Myrtaceae*, é um gênero originário da Austrália, famoso pelo seu rápido crescimento e possuidor de um grande leque de utilidades, dentre os quais podemos citar principalmente a produção de painéis, papel e celulose e carvão para produção de ferro. Além destes, são encontrados usos nas mais diversas áreas como serraria, movelaria, construção civil, óleos essenciais, entre outras (BARRICHELO e QUEIROZ, 2007).

A demanda de lenha requisitada pelas ferrovias brasileiras, no início do século XX, fez com que a Companhia Paulista de Estradas de Ferro requisitasse uma pesquisa que consistia em determinar quais espécies poderiam preencher esta necessidade, ao agrônomo Edmundo Navarro de Andrade, da cidade de Lisboa. As provas de campo foram conduzidas na cidade de Jundiaí, onde foram testadas 95 espécies separadas entre nativas e exóticas, dentre as quais apresentavam várias espécies de eucalipto. Até então, o eucalipto presente em território nacional tinha apenas função ornamental, chegando ao Brasil através de mudas vindas do Chile e de Portugal. O resultado da pesquisa sugeriu que o eucalipto era a resposta para a demanda de lenha necessária no menor tempo possível, fazendo com que a companhia adquirisse terras em Rio Claro para testar quais seriam as melhores espécies para o fim requisitado, estabelecendo o eucalipto em plantios produtivos no Brasil. Outro fato que permitiu a expansão da eucaliptocultura brasileira foi um sistema de incentivos fiscais para o cultivo

de florestas, devido ao risco decorrente dos desmatamentos que corriam as florestas nativas, facilitando a implantação de plantios produtivos (BARRICHELO e QUEIROZ, 2007).

Estabelecidos os plantios produtivos, os métodos de produção foram intensamente trabalhados com a finalidade de aperfeiçoar o tempo de expedição e a qualidade das mudas com relação a sua resistência e produtividade, sendo a clonagem, por meio da introdução das técnicas de miniestaquia e microestaquia, ferramenta fundamental para que esses objetivos fossem atingidos (WALKER *et al.*, 2011).

Vista a importância deste gênero com relação ao seu amplo uso e alta produtividade, torna-se necessário o estudo de fatores que viabilizem a redução dos prejuízos de qualquer que seja a natureza, inclusive os causados por patógenos, dentre os quais deve-se considerar a revisão de metodologias já empregadas na avaliação de doenças visando a implementação de melhorias e propostas de correções em busca de melhores resultados na avaliação e consequentes tomadas de decisões.

2.2 Bacteriose foliar do eucalipto

A bacteriose foliar é considerada uma das principais doenças do eucalipto, uma vez que pode causar prejuízos aos plantios de forma que acabe comprometendo a produtividade e ocasione em danos e perdas para os viveiros. Além disso, é uma doença que transcende fronteiras, uma vez que já foi detectada em vários países. O primeiro relato feito para manchas bacterianas em eucalipto ocorreu em Sydney, Austrália, em 1974, onde foi detectada uma doença bacteriana em *Eucalyptus citriodora* Hook causada por *Xanthomonas campestris* pv. *eucalypti* (Truman) Dye 1978, apresentando sintomas como a seca de ponteiros e, em casos mais severos, a desfolha completa (TRUMAN, 1974). No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez em 1995, em um viveiro na região de Itapetininga, Estado de São Paulo, com causa atribuída ao agente causal *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp em mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill (GONÇALVES *et al.*, 2008 apud POMELLA *et al.*, 1995). Depois destes, foram relatadas outras ocorrências em território brasileiro e, também, em outros países vizinhos como na Argentina, Paraguai e Uruguai (GONÇALVES *et al.*, 2008). Estes relatos

mostram a grande abrangência territorial da ocorrência de casos de incidência desta mancha foliar bacteriana, atingindo dimensões continentais.

Em 2008, foi conduzido um estudo sobre a etiologia da mancha foliar bacteriana no Brasil (GONÇALVES *et al.*, 2008) onde foram utilizados 25 isolados provenientes de vários estados brasileiros como Amapá, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Pará, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul, demonstrando a amplitude territorial destes patógenos.

As manchas foliares causadas por bactérias em eucalipto ocorrem em viveiro e campo, apresentando sintomatologia composta por manchas foliares úmidas e translúcidas (anasarca), decorrente do extravasamento de água pelos espaços celulares; desfolha intensa; anelamento e morte das partes apicais quando a infecção ocorre em materiais altamente suscetíveis; as lesões tornam-se necróticas e ressecadas, com perfurações e deformações na área do limbo foliar (Figura 1). No geral, estes sintomas são decorrentes da infecção patogênica causada por bactérias dos gêneros *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp., sendo o *X. Axonopodis* considerado o principal agente etiológico presente em manchas bacterianas no Brasil (GONÇALVES *et al.*, 2008). Alguns sintomas permitem a confusão com outras manchas, como as causadas por *Kirramyces epicoccoides* e *Cylindrocladium* spp., tornando necessário testes de exsudação nas gotas de pus bacteriano provenientes de novas lesões, testes bioquímicos, de inoculação e moleculares, auxiliando também na diferenciação entre as espécies de bactérias. A época que apresenta maior incidência desta doença tem sido observada no período de outubro a abril, nos meses mais quentes do ano (KRUGNER e AUER, 2005; FURTADO *et al.*, 2009).

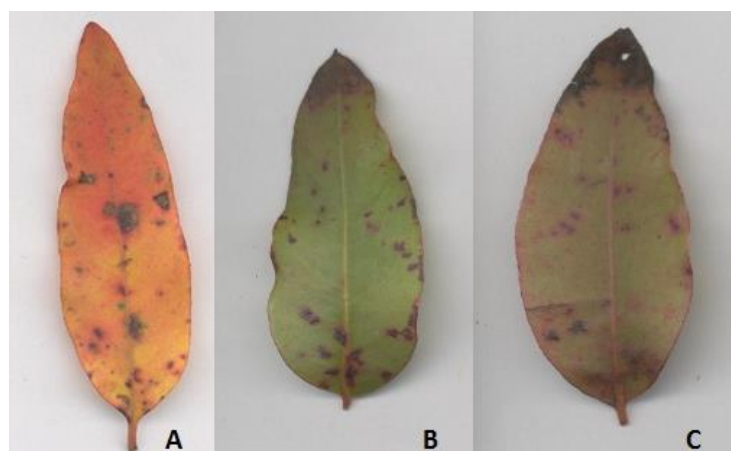


Figura 1. Folhas sintomáticas infectadas com bacteriose apresentando: A) lesões ressecadas, B) deformação no limbo foliar e C) perfurações.

As espécies de eucalipto registradas como hospedeiros são o *E. cloeziana*, *E. grandis*, *E. globulus*, *E. maidenii*, *E. pellita*, *E. regnans*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. urophylla* e *E. viminalis* (ALFENAS *et al.*, 2009). Foi registrada também a ocorrência no híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (AUER *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010).

As condições favoráveis para a disseminação e infecção bacteriana geralmente estão relacionadas com altas temperaturas e umidade elevada. A irrigação por aspersão no viveiro e nas casas de sombra, vegetação e aclimação, promove o molhamento da parte aérea das mudas. A penetração bacteriana ocorre de forma passiva, fazendo com que seja necessário um filme de água na superfície das plantas, ferimentos ou aberturas naturais, como estômatos e hidatódios, por exemplo. A falta de planejamento na construção de minijardins, pode ter como consequência as condições favoráveis ao desenvolvimento bacteriano, uma vez que a altura baixa da estrutura, a presença de cobertura plástica e ausência de escape para o ar, como uma janela zenital, favorecem o aumento da temperatura interna (ALFENAS *et al.*, 2009).

Com relação ao controle no viveiro, torna-se necessário a remoção de folhas infectadas e a higienização do local, promovendo a remoção de resíduos que sirvam como fonte de inóculo das bandejas. Deve-se evitar o plantio de mudas com sintomas severos em campo, além de disseminação de clones suscetíveis em épocas favoráveis, aplicando o conceito de escape pela época (ALFENAS *et al.*, 2009). Atualmente, através do IPEF / Programa de Proteção Florestal e empresas de defensivos, o produto BION® 500 WG foi registrado para o controle de bacteriose através da indução de resistência promovida pelo ingrediente ativo acibenzolar-S-metílico.

Os danos causados pela doença são de 3 milhões de mudas por ano, o que acarreta em perdas estimadas de 2,4 milhões de reais por ano (FURTADO e WILKEN, 2011), sugerindo que sua detecção e quantificação de severidade sejam tratadas como atividades importantes dentro da proteção florestal, atividades que, atualmente, são feitas com auxílio de escalas diagramáticas.

2.3 Escala Diagramática

A área da Patologia Florestal, na qual são realizadas tarefas de avaliação de doenças de plantas também conhecida por fitopatometria, termo que remete a idéia de medida da doença na planta (do grego: *phyto*=planta; *pathos*=doença, *metron*=medida) (BOCK *et al.*, 2010). A detecção e quantificação de doenças pode ser feita através de diferentes métodos, sendo estes diretos ou indiretos, ou seja, através de contato direto com o objeto em análise ou não, respectivamente. Dentro das metodologias diretas podemos encontrar métodos sorológicos e moleculares, já nas metodologias indiretas encontramos métodos baseados em biomarcadores e métodos baseados em propriedades e stress das plantas, no qual estão inclusos as técnicas espectroscópicas e técnicas de imageamento, abrangendo a análise multi e hiperspectral da planta (SANKARAN *et al.*, 2010). Dentro das técnicas de imageamento, está o imageamento RGB (vermelho, verde e azul), nos qual estão inclusos sensores como câmeras digitais, que permitem a análise de imagens, utilizadas em escalas diagramáticas (BOCK *et al.*, 2010; MAHLEIN, 2016).

A obtenção de uma escala diagramática consiste em dois estágios: elaboração e validação. As escalas diagramáticas são elaboradas através de imagens de uma unidade da planta (geralmente são utilizadas as folhas) contendo sintomas da doença em diferentes níveis de intensidade, sendo esse o método mais utilizado para avaliar a severidade. A severidade é expressa através da percentagem da área lesionada em relação a área saudável (ALFENAS *et al.*, 2009). Escalas diagramáticas apresentam diversos usos podendo auxiliar na detecção da doença em campo, quantificação dos danos causados a cultura, classificação da severidade do ataque, testes de resistência varietal e testes de controle da doença, permitindo verificar a eficiência do controle (VALE *et al.*, 2004).

De acordo com a lei de Weber-Fechner, a acuidade visual do olho humano é proporcional ao logaritmo da intensidade do estímulo recebido, de maneira que a resposta ao estímulo cresce linearmente à medida que o estímulo cresce logaritmicamente (HERBERT, 1982), e o fato de que a melhor visualização para tecidos sadios ocorre acima de 50% e para tecidos lesionados abaixo de 50%, foram fatores que levaram a proposta de escala não-linear para quantificação de severidade de doenças em plantas (HORSFALL e BARRATT, 1945; VALE *et al.*, 2004). Esta proposta foi sugerida no formato de incrementos logarítmicos sucessivos (HORSFALL e BARRATT, 1945), de maneira que

quanto maior for o estímulo recebido pelo olho do avaliador, maior a sua chance de detectar e diferenciar sintomas e severidades dentro de uma amostragem. A maneira de se elaborar uma escala sugerida por Horsfall e Barratt é uma diretriz e não necessariamente uma regra, permitindo a inclusão de intervalos que o autor julgue necessário para melhor orientação do avaliador (AMORIM *et al.*, 1993).

Como citado acima, a segunda fase de obtenção de uma escala diagramática é sua validação. A validação é o que determina se a escala é viável para suas finalidades, sendo realizada por meio da análise de avaliadores em um teste de estimativas com uso e sem auxílio da escala elaborada. O desempenho do avaliador está atribuído à precisão das estimativas, que é obtida por um coeficiente de determinação, pela acurácia e variância dos erros absolutos (severidade estimada menos severidade real) (NUTTER e SCHULTZ, 1995; GODOY *et al.*, 1997).

Escalas para diferentes doenças em diferentes espécies de eucalipto podem ser encontradas como: mancha de micosferela em *Eucalyptus globulus* (PASSADOR *et al.*, 2013); mancha de *Quambalaria eucalypti* em eucalipto (ANDRADE *et al.*, 2005); ferrugem do eucalipto *Puccinia psidii* (JUNGHANS *et al.*, 2003; ZAMPROGNO *et al.*, 2008).

Apesar de amplo uso, existem escalas que não atendem seu propósito uma vez que estimativas com seu auxílio não superam as estimativas diretas sem o uso da escala (NITA *et al.*, 2003; BARDSLEY e NGUGI, 2013). Dentre os possíveis fatores, o número de lesões pode influenciar a precisão e acurácia de estimativas utilizando escalas diagramáticas, geralmente resultando em superestimativas por parte dos avaliadores (SHERWOOD *et al.*, 1983; NITA *et al.*, 2003; BOCK *et al.*, 2010).

Como citado, escalas são frutos de imagens digitais que podem nos dar informações que geralmente não detectamos, como os tons de cinza. Tons de cinza variam de 0 a 255, sendo as tonalidades expressas em uma tela (monitor de computador, por exemplo), e podem ser utilizados para diferenciar tonalidades que variam sob influência de diversos fatores, como variação de determinada estrutura no tempo (MONTINI *et al.*, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi dividido em quatro experimentos, onde cada experimento está relacionado a cada objetivo proposto citado anteriormente, na sua respectiva ordem.

3.1 Local

Folhas das mudas e touças de eucalipto infectadas naturalmente com sintomas da mancha foliar bacteriana, utilizadas nos experimentos de comparação de métodos de elaboração de escalas, efeitos de tons de cinza de imagens digitais e severidade e efeitos de dispersão em validações, foram coletadas no pátio de aclimação (rustificação) e expedição do viveiro da ZAF Agroflorestral, empresa atuante no mercado de produção de mudas clonais de eucalipto, localizada no município de Bofete, Estado de São Paulo (23°5'54" S, 48°15'32" O, 570 m de altitude). O clima local tem classificação Cwa (Köppen), caracterizado por um clima quente e úmido com inverno seco, onde a temperatura média máxima chega a 24,5°C e a média mínima a 17,7°C. A pluviosidade anual pode chegar a 1490mm.

As mudas de *Eucalyptus* sp. inoculadas com diferentes concentrações de inóculos e diferentes espécies de bactérias causadoras da mancha foliar bacteriana estavam em uma casa de vegetação localizada no Departamento de Proteção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agrônômicas, no município de Botucatu, Estado de São

Paulo (22°53'09" S, 48°26'42" O, 840 m de altitude). O clima local tem classificação Cwa (Köppen), caracterizado por um clima quente e úmido com inverno seco, onde a temperatura média máxima chega a 24°C e a média mínima a 18°C. A pluviosidade anual pode chegar a 1358,6 mm.

3.2 Métodos de elaboração e validação de escalas diagramáticas em diferentes clones de eucalipto

A construção das escalas diagramáticas para quantificação de severidade de manchas foliares bacterianas em diferentes clones do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (I144, H13 e AEC 1528) foi feita em duas etapas: elaboração e validação. Além da elaboração tradicional, embasada na progressão geométrica da percentagem de área lesionada ou teoria de acuidade visual de Weber-Fechner (HORSFALL e BARRATT, 1945), foi realizada a elaboração baseada em quartis, totalizando seis escalas diagramáticas (Figura 2). Na validação, foram testados o coeficiente de correlação de Spearman e a diferença absoluta média, uma vez que a validação por regressão linear simples possui equívocos estatísticos, como a medição dos valores do eixo X quando deveriam ser valores pré-fixados e a comparação matemática de valores do coeficiente de determinação, que estatisticamente podem não ser diferentes.

3.2.1 Elaboração

Foram coletadas folhas infectadas por bacteriose a partir de três diferentes clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (I144, H13 e AEC 1528) presentes no pátio de aclimatação do viveiro da empresa ZAF Agroflorestral, em condições de epidemia aberta (Figura 3). Foram coletadas 100 folhas sintomáticas para cada clone de diferentes indivíduos infectados, totalizando em uma amostragem de 300 folhas. Após a coleta, as folhas foram digitalizadas com auxílio de um escâner de mesa em resolução de 300 dpi. As fotos geradas foram abertas no programa imageJ, onde foi feita a mensuração da quantidade de tecidos foliares lesionados pela doença e sua respectiva proporção em relação a área total foliar (severidade). O processo seguinte foi a classificação dos níveis de severidade presentes nas escalas, expressos em porcentagem, começando em um primeiro

nível de menor severidade encontrada até o maior nível de severidade encontrado, intercalados por níveis crescentes em progressão geométrica nas escalas (baseadas na lei Weber-Fechner). Para as escalas baseadas em percentis, os intervalos foram baseados nos quartis da amostragem: severidade mínima; severidade abrangendo 25% da amostragem; severidade abrangendo 50% da amostragem; severidade abrangendo 75% da amostragem; e severidade máxima. Foram utilizadas as fotos das folhas selecionadas para representar os níveis definidos para as escalas foram as que apresentaram melhor característica visual da doença perante as opções presentes na amostragem. Elaboradas as escalas, ocorreu a etapa de validação.

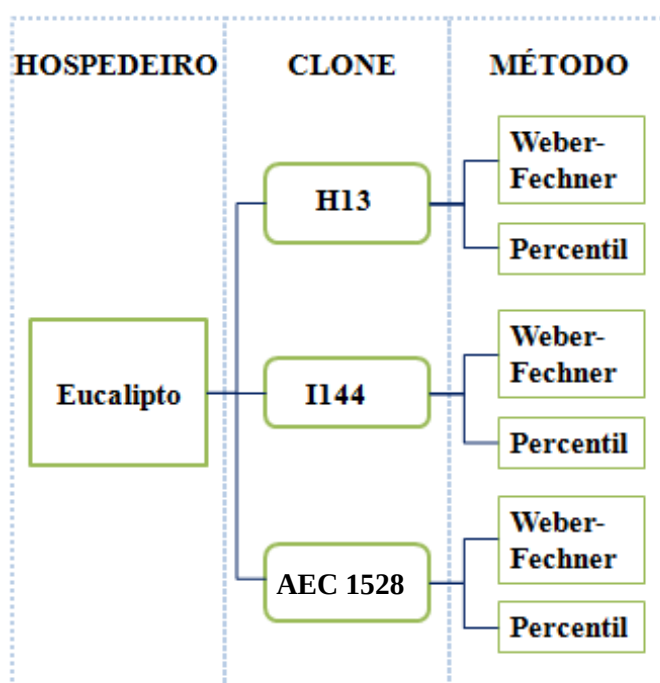


Figura 2. Quadro demonstrativo indicando o hospedeiro, número de clones e os métodos utilizados para elaboração das escalas diagramáticas, totalizando de seis escalas.



Figura 3. Exemplos de folhas amostradas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* infectadas com bacteriose (H13, I144 e AEC 1528, respectivamente).

3.2.2 Validação

A validação das escalas elaboradas ocorreu pela análise de 5 avaliadores sem experiência para cada escala, onde cada um realizou duas estimativas de severidade sobre a amostragem inicial, sendo a primeira sem o auxílio da escala diagramática e a segunda com auxílio da escala. As estimativas obtidas foram analisadas junto aos valores reais de severidade por diferença absoluta média (diferença absoluta entre a estimativa e o valor real da severidade).

Nesta etapa foram ajustados, para cada clone, modelos lineares generalizados com distribuição normal e função de ligação identidade (considerando uma estrutura de medida repetidas pelo método de Equações de Estimação Generalizadas (NELDER&WEDDERBURN, 1972; DIGGLE *et al.*, 2002; GBUR, *et al.*, 2012) para a diferença absoluta entre a medida de severidade real (obtida pelo programa de processamento de imagens) e os valores de severidade com e sem escala, considerando os fatores: método das classes de severidade (Weber-Fechner e quartis), uso da escala (sim e não), e avaliadores (1 a 5). A qualidade dos ajustes foi feita através da análise resíduo. Para comparações entre os fatores foi utilizado o teste de Tukey-Kramer (WESTFALL *et al.*, 1999), com 95% de confiança, do procedimento Genmod do programa estatístico SAS

– Statistical Analysis System (SAS, 2012), versão 9.2, licenciado para a Universidade Estadual Paulista, UNESP.

3.3 Efeito da concentração de inóculo de diferentes espécies de bactérias na validação de escalas diagramáticas

Foram coletadas folhas de *Eucalyptus* spp. com sintomas de bacteriose causados pelas espécies *Xanthomonas* sp. e *Pseudomonas* sp. para isolamento destas bactérias. Foi realizada assepsia das folhas com álcool 70%, hipoclorito 2% e água destilada autoclavada à 120°C. Pequenas amostras destas folhas foram colocadas em meio NSA e depois colocados na BOD à 25°C. Com observações diárias, observou-se o aparecimento de colônias das bactérias no meio de cultura (Figura 4).

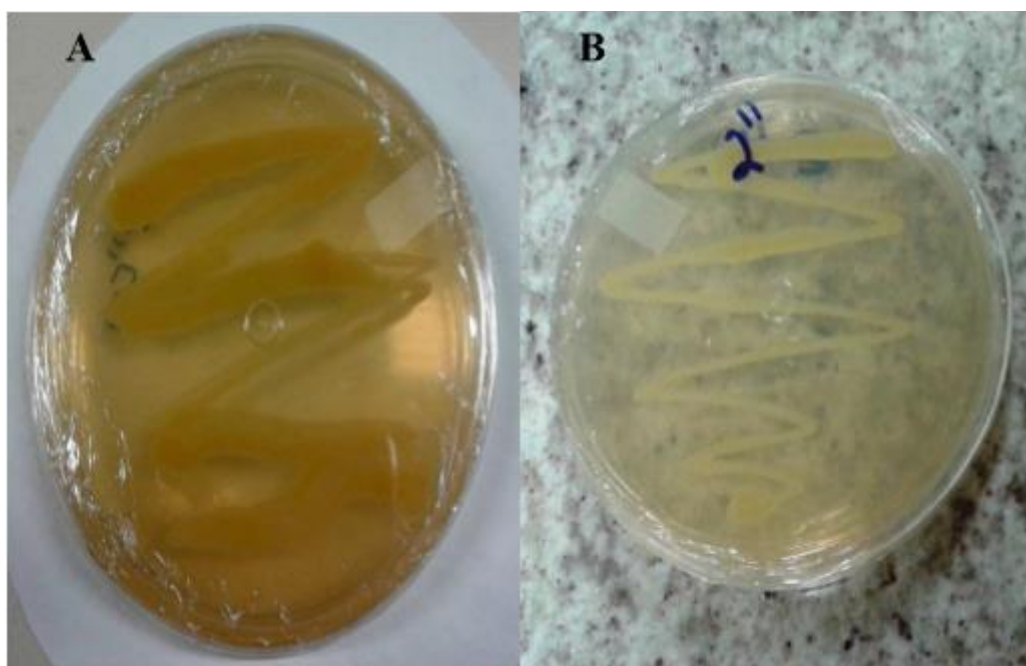


Figura 4. A) Colônia de bactérias da espécie *Xanthomonas* sp.; B) Colônia de bactérias da espécie *Pseudomonas* sp.

Foi feita a observação das características físicas das colônias com o uso de microscópios e com a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), possibilitando a diferenciação das bactérias. Foi realizado o teste de patogenicidade para cada gênero de bactérias, para *Xanthomonas* sp. utilizou-se meio de degradação de amido e para

Pseudomonas sp., usou-se meio B king. Após a separação, as bactérias foram cultivadas em meio líquido NSA, que ficou em um agitador por 3 dias. Com os meios preparados, foram realizados 3 tratamentos, sendo 3 concentrações por bactéria, sendo meio de cultivo com a bactéria *Pseudomonas* sp., meio de cultivo com *Xanthomonas* sp. e meio de cultivo com ambas as bactérias. Para cada bactéria foram considerados 3 tratamentos (diluições): primeira com 10^9 indivíduos/mL (mais concentrada), 10^7 indivíduos/mL e 10^5 indivíduos/mL (menos concentrada). As diluições foram borrifadas nas mudas com auxílio de um pulverizador manual. Foram inoculadas 300 mudas em um clone suscetível de *Eucalyptus* sp., com 20 repetições para cada diluição, totalizando 60 mudas por tratamento. Em sequência, as mudas ficaram em câmaras úmidas por 48 horas. Para análise do experimento, foram construídas escalas baseadas na lei Weber-Fechner, utilizando amostragem do próprio experimento, que tiveram severidade medida com uso do programa ImageJ. As escalas foram validadas por 5 avaliadores que estimaram valores da amostragem com e sem o auxílio desta escala. Estes valores, junto com os valores reais, foram analisados estatisticamente com uso de diferença absoluta média, para verificar a influência dos fatores do experimento.

Nesta etapa foram ajustados, para cada variedade de bactéria, modelos lineares generalizados com distribuição normal e função de ligação identidade (NELDER&WEDDERBURN, 1972; DIGGLE *et al.*, 2002) considerando uma estrutura de medida repetidas pelo método de Equações de Estimação Generalizadas (NELDER&WEDDERBURN, 1972; DIGGLE *et al.*, 2002; GBUR, *et al.*, 2012) para a diferença absoluta entre a medida de severidade real (obtida pelo programa de processamento de imagem) e os valores de severidade com e sem escala, considerando os fatores: concentração (10^5 , 10^7 e 10^9 bactérias/L), uso da escala (sim e não) e avaliadores (1 a 5). A qualidade dos ajustes foi feita através da análise resíduos. Para comparações entre os fatores foi utilizado o teste de Tukey-Kramer (WESTFALL *et al.*, 1999), com 95% de confiança, do procedimento Genmod do programa estatístico SAS – Statistical Analysis System (SAS, 2012), versão 9.2, licenciado para a Universidade Estadual Paulista, UNESP.

3.4 Utilização de tons de cinza de imagens digitais foliares de clones com bacteriose no estudo da severidade

Foram selecionadas 50 folhas dos três clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (I144, H13 e AEC 1528) infectadas por bacteriose. Estas folhas foram escaneadas em 300 dpi, e as imagens geradas foram convertidas do modo RGB (colorido) para tons de cinza (Figura 5), e em sequência foi realizada a mensuração da severidade e dos tons de cinza médio, modal, mínimo e máximo, valores que variam sua intensidade de 0 a 255 em imagens digitais.

Foi feito um estudo de correlação entre as variáveis severidade e os tons de cinza (médio, modal, máximo e mínimo), segundo duas abordagens: considerando-se todos os clones como um único grupo e com separação de clones. Na análise estatística do efeito dos clones na severidade, como também na análise do efeito dos clones nos tons de cinza (médio, modal, máximo e mínimo), foram utilizados modelos lineares generalizados com distribuição de probabilidade gama e função de ligação logarítmica (NELDER&WEDDERBURN, 1972; DIGGLE *et al.*, 2002). A qualidade do ajuste dos modelos foi feita através da análise de desvios (deviance). Para comparações entre os clones foi utilizado o teste LSMeans do procedimento genmod do programa SAS (SAS, 2012).

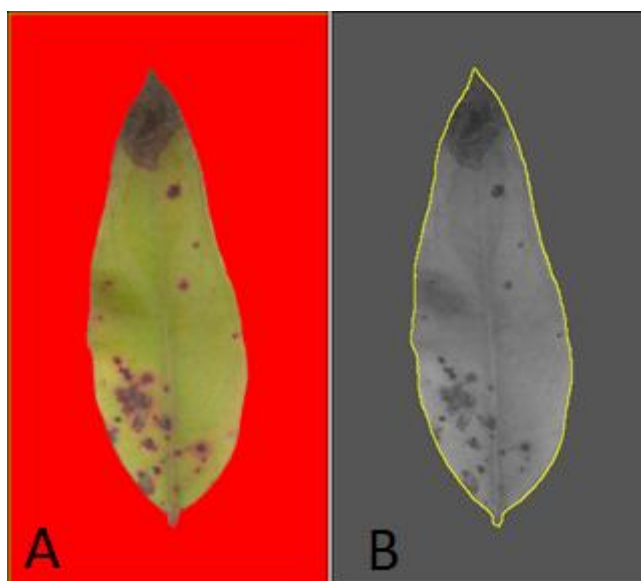


Figura 5. Folha de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* infectada com bacteriose isolada no modo RGB (A) e sua conversão para tons de cinza (B) no programa ImageJ.

3.5 Efeito da dispersão de área lesionada na utilização de escalas diagramáticas

Foram utilizadas as seis folhas representativas de cada nível (N1 ao N6) da escala diagramática de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* do clone AEC 1528 (Figura 6) para testar o efeito de diferentes padrões de área lesionada nas estimativas de avaliadores, já que avaliações visuais podem ser imprecisas e não confiáveis (BOCK et al., 2010, 2015). Cada uma das folhas utilizadas teve o padrão de lesões modificadas com auxílio do programa editor de imagens Photoshop, replicando a mesma folha com quatro versões de dispersão espacial (Figura 7). O formato da folha foi padronizado para toda amostragem, de maneira que o avaliador não percebesse a diferença entre as folhas originais e as folhas geradas artificialmente. O tecido lesionado foi substituído por outros padrões característicos da doença, de maneira que cada folha apresentasse a mesma severidade em padrões que variavam em diferentes formas de agregações de lesões, gerando 24 novas folhas, que somadas às originais, totalizaram 30 folhas de amostragem. Foram utilizadas as ferramentas de seleção, preenchimento, corte e redimensionamento para realocar lesões de outro padrão proveniente de outra folha para dentro da forma da folha original a ser utilizada. Após o preparo das folhas, estas foram aleatorizadas e submetidas a análises de 5 avaliadores, que estimaram os valores de severidade para cada folha com uso da escala diagramática de bacteriose no clone AEC 1528 de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

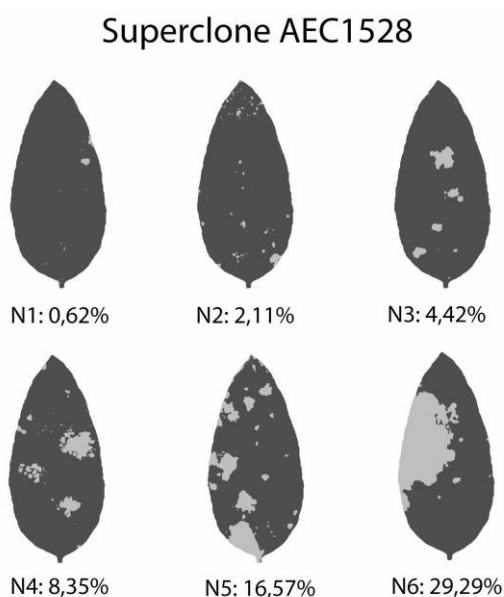


Figura 6. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone AEC 1528.

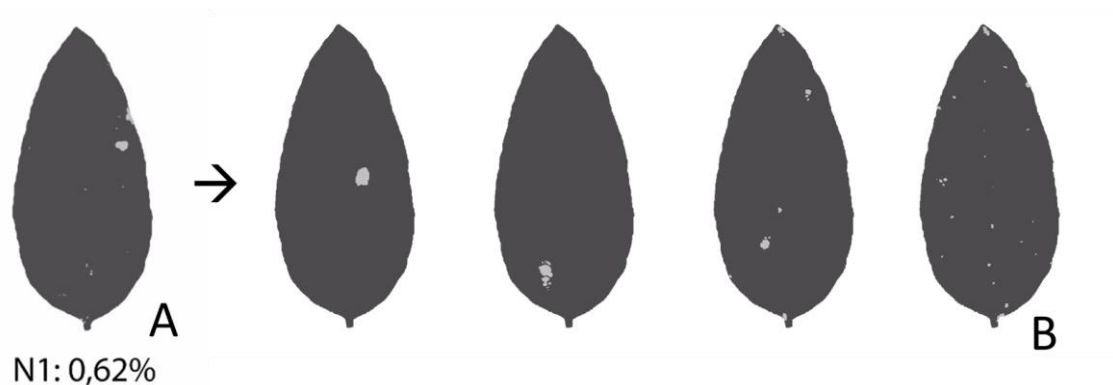


Figura 7. Folha do nível 1 (N1) da escala diagramática de mancha bacteriana foliar em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* clone AEC 1528 e suas 4 reproduções com mesma severidade e diferentes dispersões.

Numa primeira abordagem, foi ajustado um modelo linear generalizado com distribuição normal e função de ligação identidade (NELDER&WEDDERBURN, 1972; DIGGLE *et al.*, 2002) para a diferença absoluta entre a medida de severidade real (obtida pelo programa de processamento de imagem) e os valores com e sem escala e os fatores: classes da doença (1, 2, 3, 4, 5 e 6), dispersão da lesão (1, 2, 3, 4 e 5) e avaliador. A qualidade dos ajustes foi feita através da análise resíduo a análise de desvios (deviance). Para comparações entre tratamentos foi utilizado o teste de Tukey-Kramer (WESTFALL *et al.*, 1999), com 95% de confiança, do procedimento Genmod do programa estatístico SAS – Statistical Analysis System (SAS, 2012), versão 9.2, licenciado para a Universidade Estadual Paulista, UNESP. Numa segunda abordagem, foi ajustado um modelo linear generalizado de regressão múltipla com resposta normal e função de ligação identidade para o logaritmo neperiano da diferença absoluta em função dos níveis de dispersão de lesão e classe de severidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Métodos de elaboração e validação de escalas diagramáticas em diferentes clones de eucalipto

Foram obtidas duas escalas diagramáticas para mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone H13: uma elaborada utilizando o método baseado na progressão geométrica de percentagem de tecidos lesionados ou lei de acuidade visual Weber-Fechner (Figura 8) e outra baseada em quartis (Figura 9).

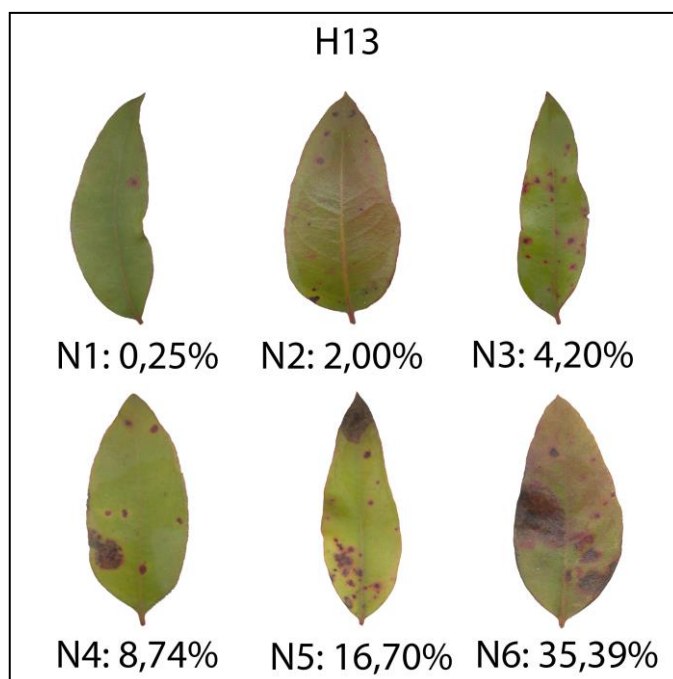


Figura 8. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone H13 elaborada pelo método da lei de acuidade visual Weber-Fechner.

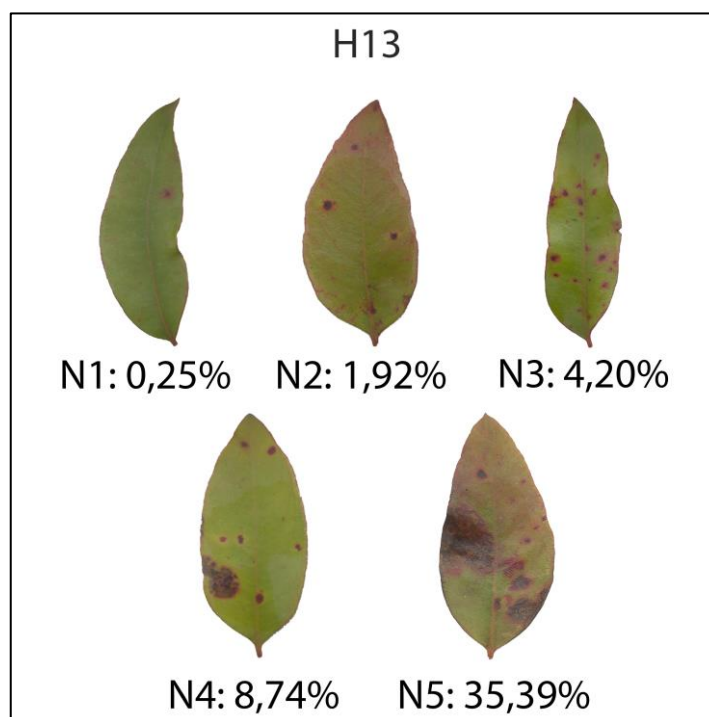


Figura 9. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone H13 elaborada pelo método de quartis.

Para o clone H13, houve efeito principal significativo à 95% de confiança de: método ($p < 0,0200$), escala ($p < 0,0001$), e avaliador ($p < 0,0022$), não apresentando interações significativas. O modelo ajustado considerando os efeitos principais apresenta bom ajuste (Figura 10).

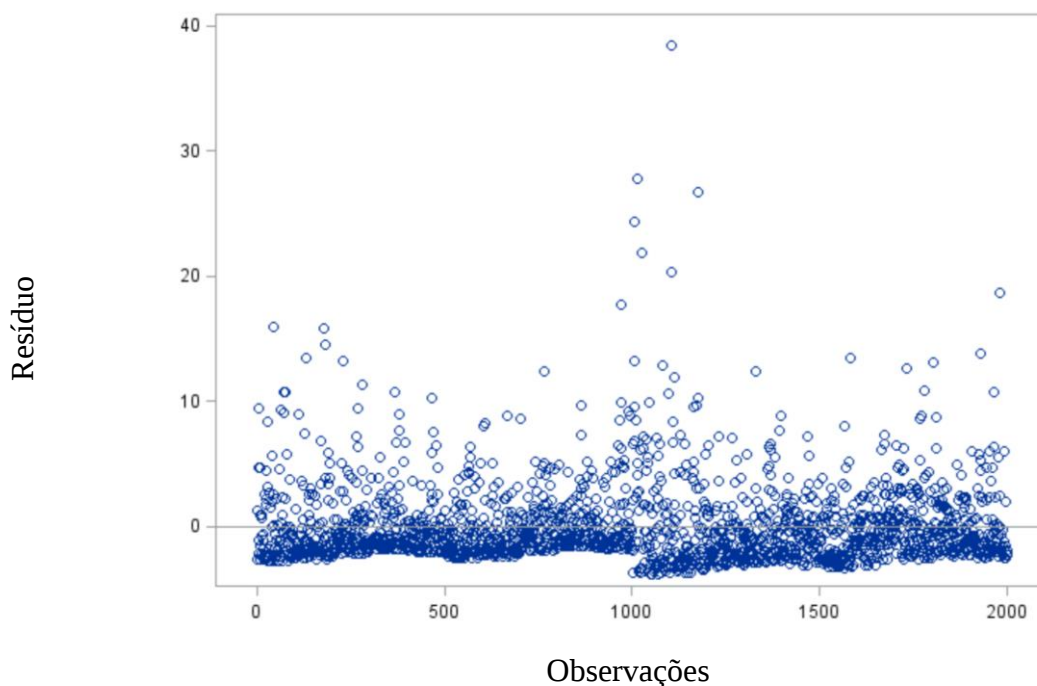


Figura 10. Resíduos em função das observações para os efeitos principais significativos (método, escala e avaliador) presentes nas avaliações das escalas diagramáticas, elaboradas em quartis e Weber-Fechner, de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone H13.

A diferença estatística entre médias de diferenças absolutas referente ao método, evidencia que o método dos percentis produz menor diferença absoluta média em relação ao método de Weber-Fechner, cujas médias seguidas dos intervalos de confiança à 95% para o método dos percentis e o método de Weber-Fechner foram, respectivamente, 2,46 (2,30; 2,63) e 2,86 (2,62; 3,09). A diferença é corroborada pelo teste Tukey-Kramer ($p < 0,0196$).

Com relação ao efeito da escala, a diferença estatística entre médias de diferenças absolutas evidencia que o uso da escala favoreceu o processo de avaliação da doença, cujas médias seguidas dos intervalos de confiança à 95% para o uso ou não da escala diagramática foram, respectivamente, 2,19 (2,02; 2,36) e 3,13 (2,90; 3,36).

A respeito do efeito de avaliador (Tabela 1), a diferença absoluta média possibilitou a diferenciação entre os avaliadores 1 e 4 ($p < 0,0093$). O avaliador 4 foi o que apresentou estimativas mais próximas dos valores considerados reais de severidade da doença na amostragem (menor média de diferença absoluta).

Tabela 1. Diferença absoluta média e seus intervalos de confiança para cada avaliador da escala diagramática de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone H13.

Avaliador	Diferença Média Absoluta	IC – inferior	IC – superior
1	3,14 a	2,74	3,53
2	3,03 a	2,63	3,42
3	2,54 ab	2,25	2,78
5	2,40 ab	2,12	2,68
4	2,22 b	1,97	2,47

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente no teste de Tukey-Kramer a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Para o clone I144, foram obtidas duas escalas de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, uma elaborada pelo método baseado na lei da acuidade visual Weber-Fechner (Figura 11) e outra pelo método dos quartis (Figura 12).

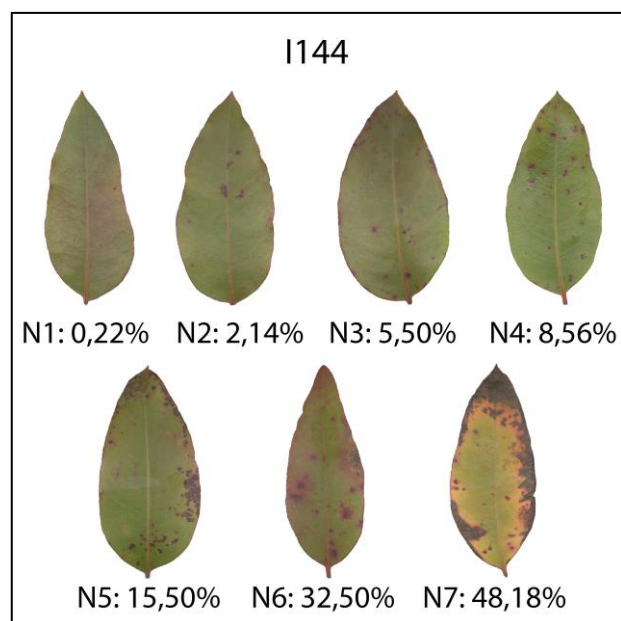


Figura 11. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone I144 elaborada pelo método da lei de acuidade visual Weber-Fechner.

Diferente dos outros clones, a escala elaborada pelo método Weber-Fechner apresenta sete níveis de severidade de infecção pela doença ao invés de seis, devido à maior amplitude de severidade encontrada, chegando próximo a 50% de infecção.

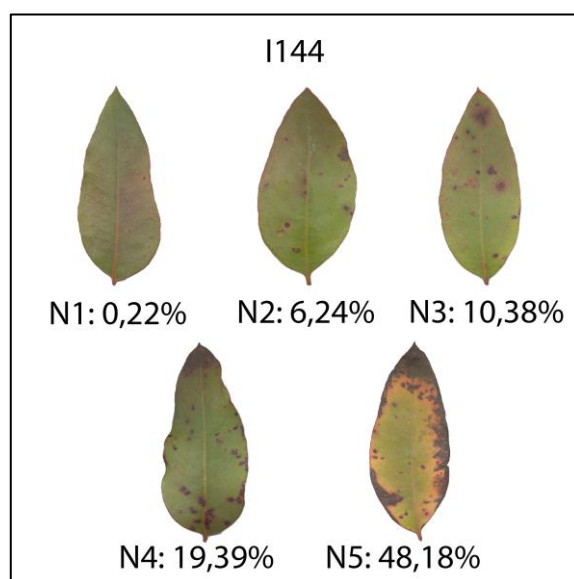


Figura 12. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone I144 elaborada pelo método de quartis.

Este experimento, utilizando o clone I144, tem uma interação significativa a 95% de confiança de método com escala ($p < 0,0102$), tornando a análise de um fator dependente do outro. O ajuste do modelo considerando os efeitos principais é bom (Figura 13).

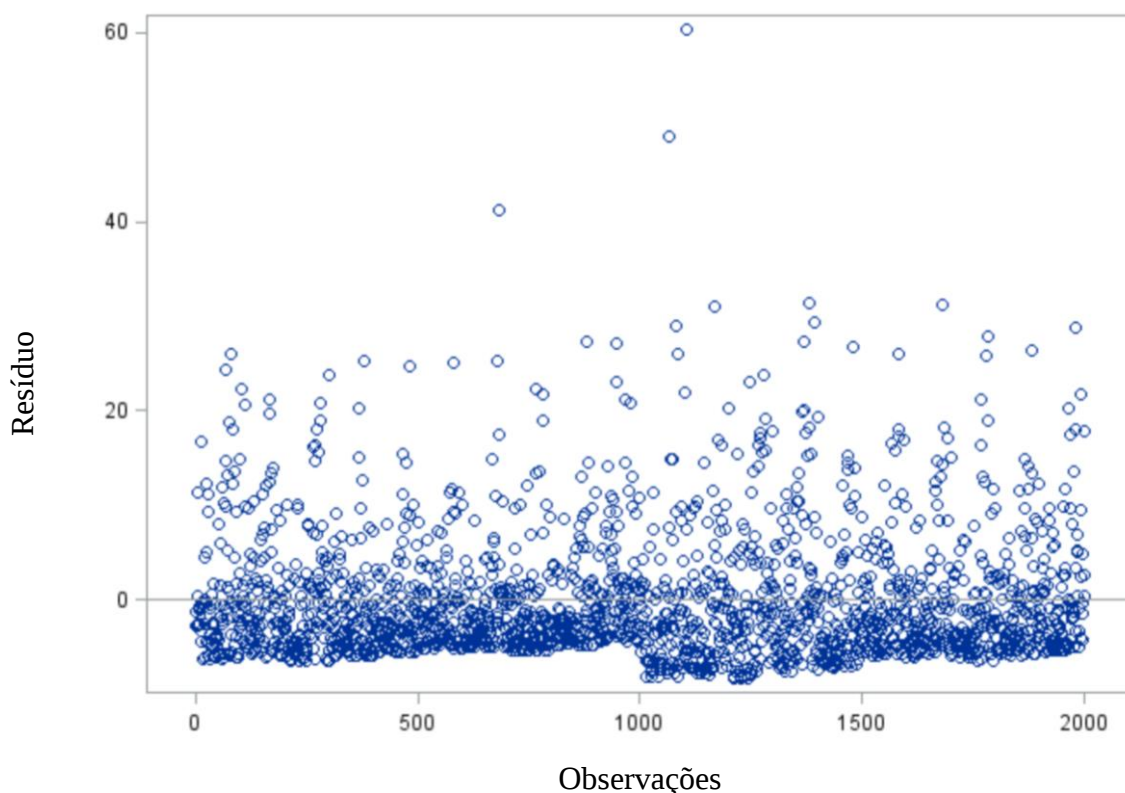


Figura 13. Resíduos em função das observações para os efeitos principais significativos (método, escala e avaliador) presentes nas avaliações das escalas diagramáticas, elaboradas em quartis e Weber-Fechner, de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone I144.

A interação entre os métodos de elaboração das escalas e o uso ou não das mesmas apresenta como resultados (Tabela 2) a diferença estatística entre os métodos utilizados nas avaliações com o uso de escala, evidenciando novamente diminuição das médias da diferença absoluta das estimativas quando utilizada a escala baseada no método de quartis quando comparadas às leituras feitas utilizando a escala elaborada com o método Weber-Fechner. Em relação ao uso e não uso da escala diagramática para auxílio dos avaliadores, ocorre a diminuição das médias da diferença

absoluta em situações com uso da escala de ambos os métodos para as avaliações, favorecendo estimativas mais próximas dos valores reais.

Tabela 2. Médias da diferença absoluta das estimativas dos avaliadores com e sem auxílio das escalas diagramáticas de mancha bacteriana foliar em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone I144 elaboradas pelo método de quartis e Weber-Fechner, e intervalos de confiança.

Uso de Escala	Método	
	Quartis	Weber-Fechner
Sim	4,97 Aa (4,45; 5,48)	6,01 Ba (5,45; 6,58)
Não	6,03 Ab (5,46; 6,60)	7,99 Bb (7,26; 8,72)

Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem estatisticamente no teste de Tukey-Kramer a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Para o clone AEC 1528, foram elaboradas duas escalas diagramáticas de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, uma utilizando o método baseado na lei Weber-Fechner (Figura 14) e outra baseada no método de quartis (Figura 15).

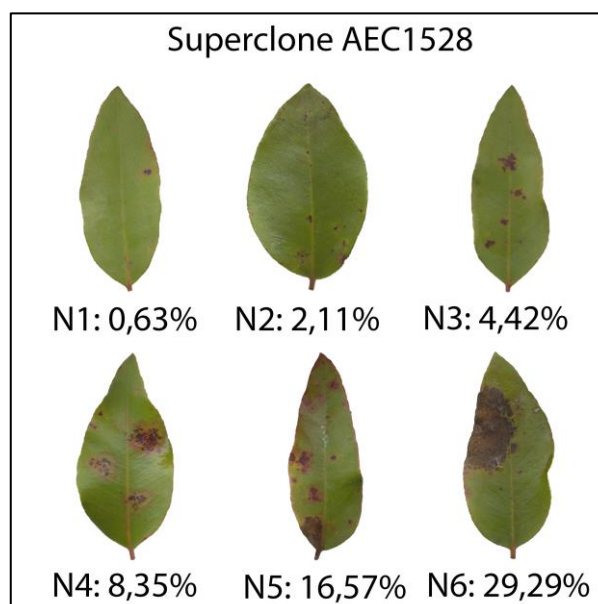


Figura 14. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone AEC 1528 elaborada pelo método da lei de acuidade visual Weber-Fechner.

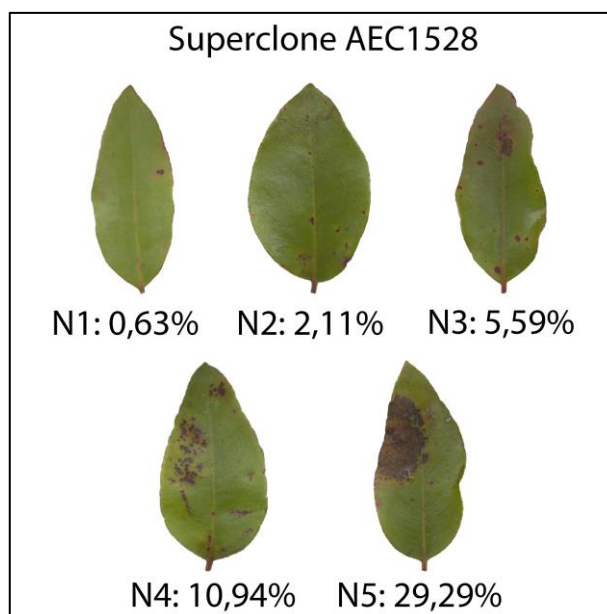


Figura 15. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone AEC 1528 elaborada pelo método de quartis.

Para este clone, apenas o método ($p < 0,0255$) foi efeito principal significativo. Apesar do bom ajuste apresentado pelo modelo ajustado, possíveis outliers foram detectados (Figura 16). Três estimativas do avaliador 1 para a escala elaborada com o método Weber-Fechner foram discrepantes, mesmo em situações em que houve o auxílio de escala diagramática, podendo ser considerados erros de medição (exemplo: equívoco da estimativa, erro na transcrição de valores) que são impossibilitados de correção. Cogitou-se a possibilidade de ser algum erro experimental, porém houve um único avaliador a apresentar estimativas consideradas pontos fora da curva.

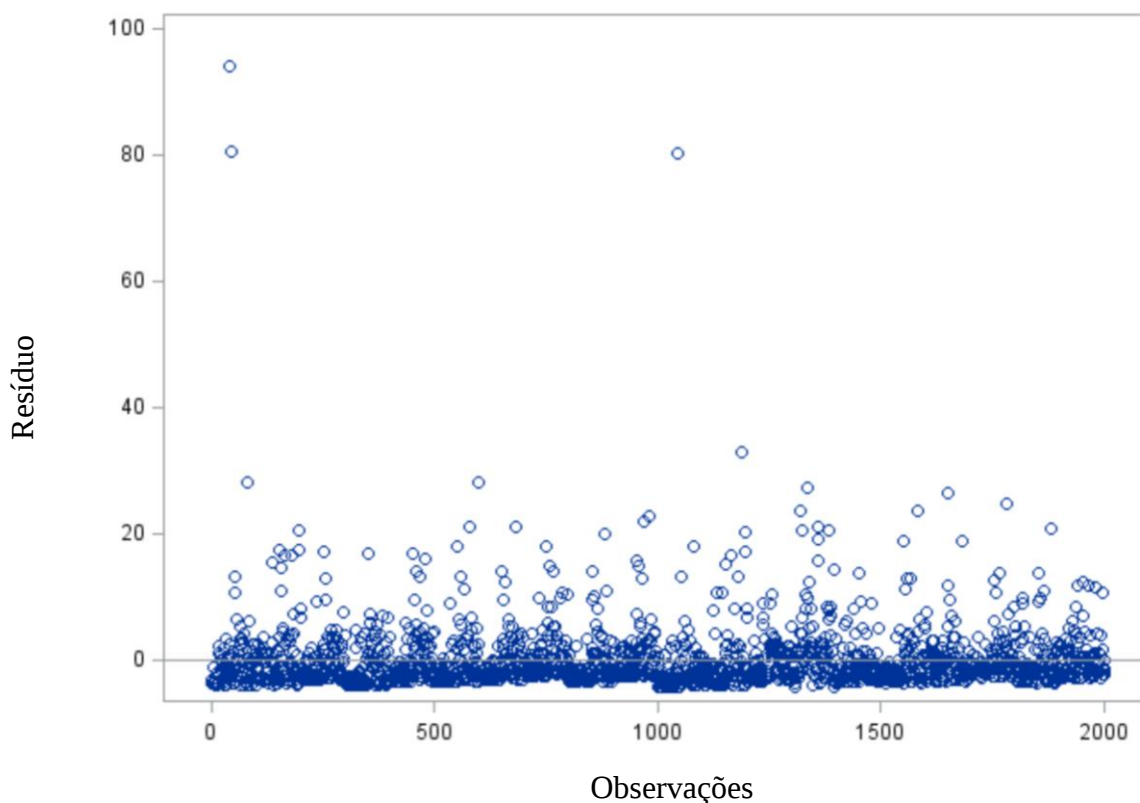


Figura 16. Resíduos em função das observações para os efeitos principais significativos (método, escala e avaliador) presentes nas avaliações das escalas diagramáticas, elaboradas em quartis e Weber-Fechner, de mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* – clone AEC 1528.

Com relação ao efeito causado pelo método, nota-se a diferença estatística significativa, com 95% de confiança, entre as médias da diferença absoluta das avaliações auxiliados pela escala elaborada com o método de quartis e da escala elaborada pelo método seguindo a lei Weber-Fechner, sendo respectivamente: 3,23 (2,97; 3,49) e 3,92 (3,51; 4,32). Diferença que é confirmada pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,0251$).

De forma geral, o resultado comum deste experimento com os três clones foi o efeito do método utilizado na elaboração das escalas diagramáticas. Em todos os casos o método de elaboração da escala influenciou diretamente nas avaliações. Escalas diagramáticas elaboradas pelo método dos quartis proporcionaram médias da diferença absoluta média menores das estimativas quando comparadas com as médias das estimativas realizadas com auxílio das escalas elaboradas pelo método Weber-Fechner. Tratando-se de um efeito principal, pode-se dizer que há viabilidade do uso de outros métodos para elaboração de escalas diagramáticas. Apesar da lei da acuidade visual

Weber-Fechner apresentar amplo uso e eficiência, neste caso abordagens alternativas podem ser tão eficientes quanto a tradicional.

As médias apresentadas para cada clone sugerem que o clone H13 foi o que teve as amostras de mais fácil leitura, devido a proximidade das estimativas com os valores reais de severidade, seguido pelo AEC 1528, e o clone I144 foi o que teve amostras mais complicadas de se estimar. Esta diferença talvez esteja relacionada com a forma que a bacteriose expressa seus sintomas em cada um dos clones, produzindo lesões bem delimitadas no clone H13 e AEC 1528 e maior presença de manchas no clone I144. Outra possibilidade pode ser a dispersão da doença presente em cada um dos clones, favorecendo superestimativas ou subestimativas com maior erro.

4.2 Efeito da concentração de inóculo de diferentes espécies de bactérias na validação de escalas diagramáticas

Quando inoculados nas folhas o mix de bactérias (*Pseudomonas* sp. *Xanthomonas* sp.) em diferentes concentrações, a escala diagramática de mancha bacteriana seguindo a lei Weber-Fechner gerada apresenta sete níveis de severidade (Figura 17).

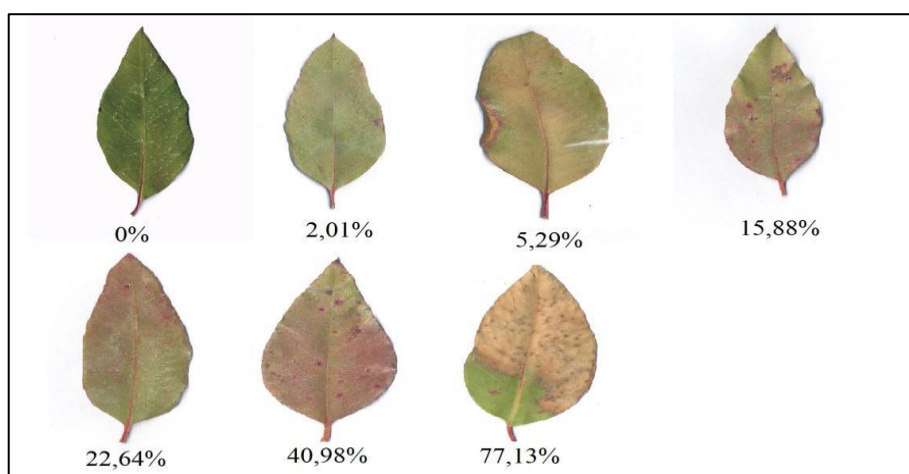


Figura 17. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana (variedade mix) para análise de severidade de tecidos lesionados em eucalipto.

Houve efeito significativo para escala à 95% de confiança para escala ($p < 0,0010$) e concentração ($p < 0,0095$), não apresentando interações significativas. O modelo ajustado considerando os efeitos principais apresenta bom ajuste (Figura 18).

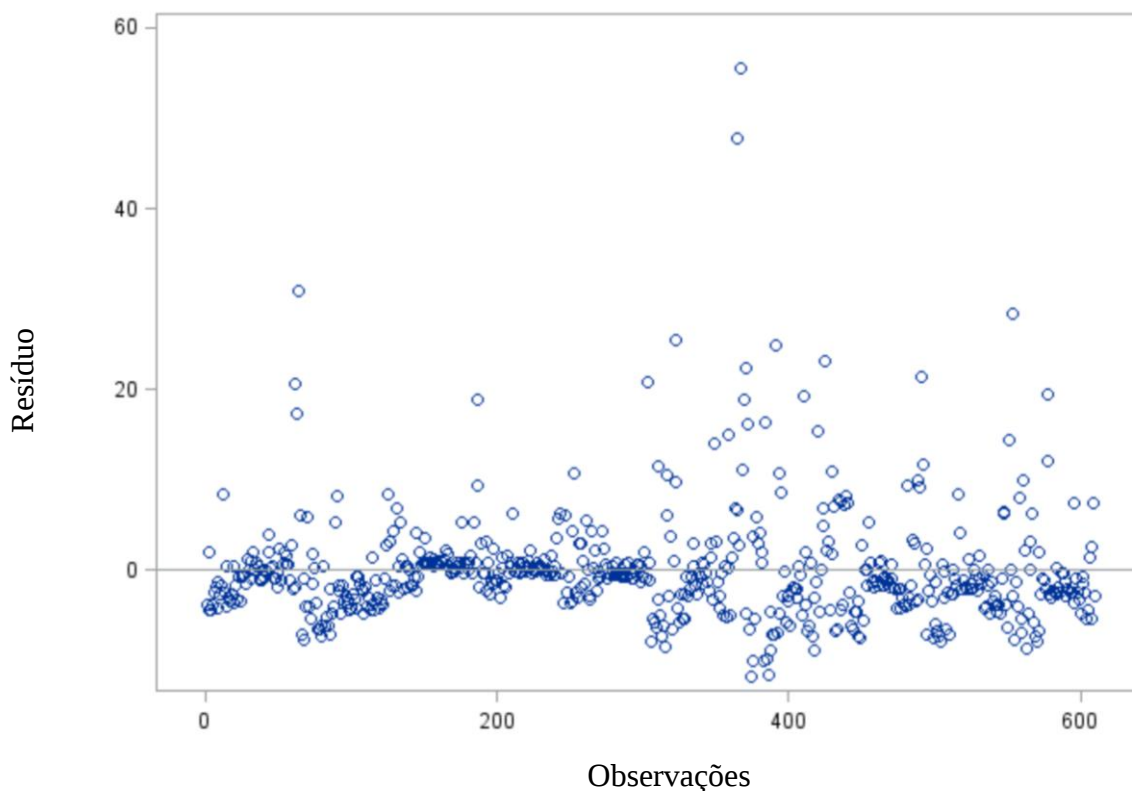


Figura 18. Resíduos das observações para os efeitos principais significativos (escala e concentração) presentes nas avaliações das escalas diagramáticas de mancha foliar bacteriana (variedade mix) em eucalipto.

Para a variedade mix de bactérias, a diferença estatística entre médias de diferenças absolutas referente ao uso ou não de escala, torna evidente que o uso de escala para avaliar a severidade produz menor diferença absoluta média em relação ao não uso, cujas médias seguidas dos intervalos de confiança à 95% são, respectivamente, 2,75 (2,27; 3,22) e 6,54 (5,58; 7,50). O teste de Tukey-Kramer confirma a diferença ($p < 0,0001$).

Com relação ao efeito da concentração, a diferença estatística entre médias de diferenças absolutas evidencia que as diferentes concentrações de inóculo (10^5 , 10^7 e 10^9 indivíduos/mL) influenciaram no processo de avaliação da doença (Tabela

3). A concentração de bactérias mais favorável para as estimativas dos avaliadores foi a de 10^7 indivíduos/mL, seguida das concentrações de 10^9 e 10^5 . Neste caso, concentrações maiores apresentaram as menores médias de diferença absoluta média, favorecendo a quantificação visual da severidade da doença. Este resultado sugere que a concentração de 10^7 indivíduos/mL seja a mais adequada para o inóculo deste mix de bactérias quando houver a necessidade de avaliação visual ou quantificação de severidade em folhas de eucalipto.

Tabela 3. Diferença absoluta média para as avaliações de diferentes concentrações de inóculo de bactérias (mix) e seus respectivos intervalos de confiança à 95%.

Concentração (indivíduos/mL)	Diferença Absoluta Média	IC – inferior	IC - Superior
10^5	6,83 a	5,75	7,92
10^9	4,07 b	3,07	5,06
10^7	2,58 c	2,01	3,15

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente no teste de Tukey-Kramer a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Para a espécie de bactérias *Pseudomonas* sp., foi construída uma escala diagramática de mancha foliar bacteriana em eucalipto para análise de severidade do tecido lesionado em diferentes concentrações de inóculo, seguindo a mesma metodologia da anterior (Figura 19).

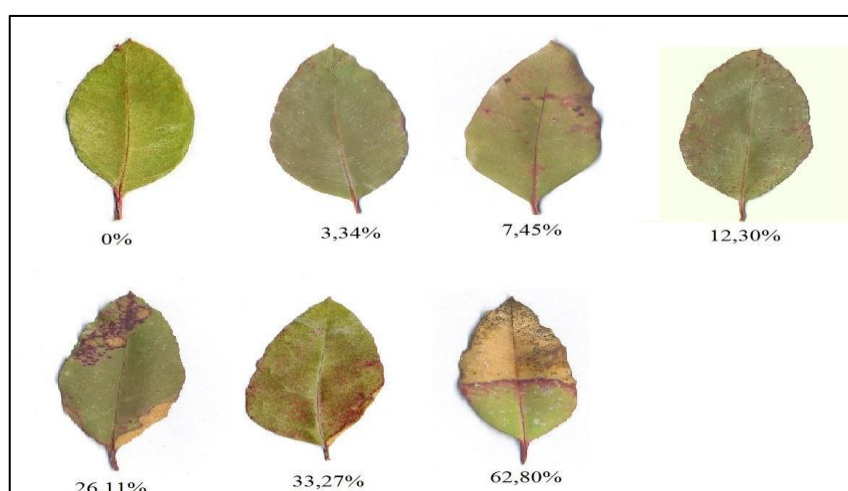


Figura 19. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana (*Pseudomonas* sp.) para análise de severidade de tecidos lesionados em eucalipto.

Houve efeito significativo com 95% de confiança para escala ($p < 0,0081$) e avaliador ($p < 0,0448$), não apresentando interações significativas. O ajuste apresentado pelo modelo foi bom (figura 20).

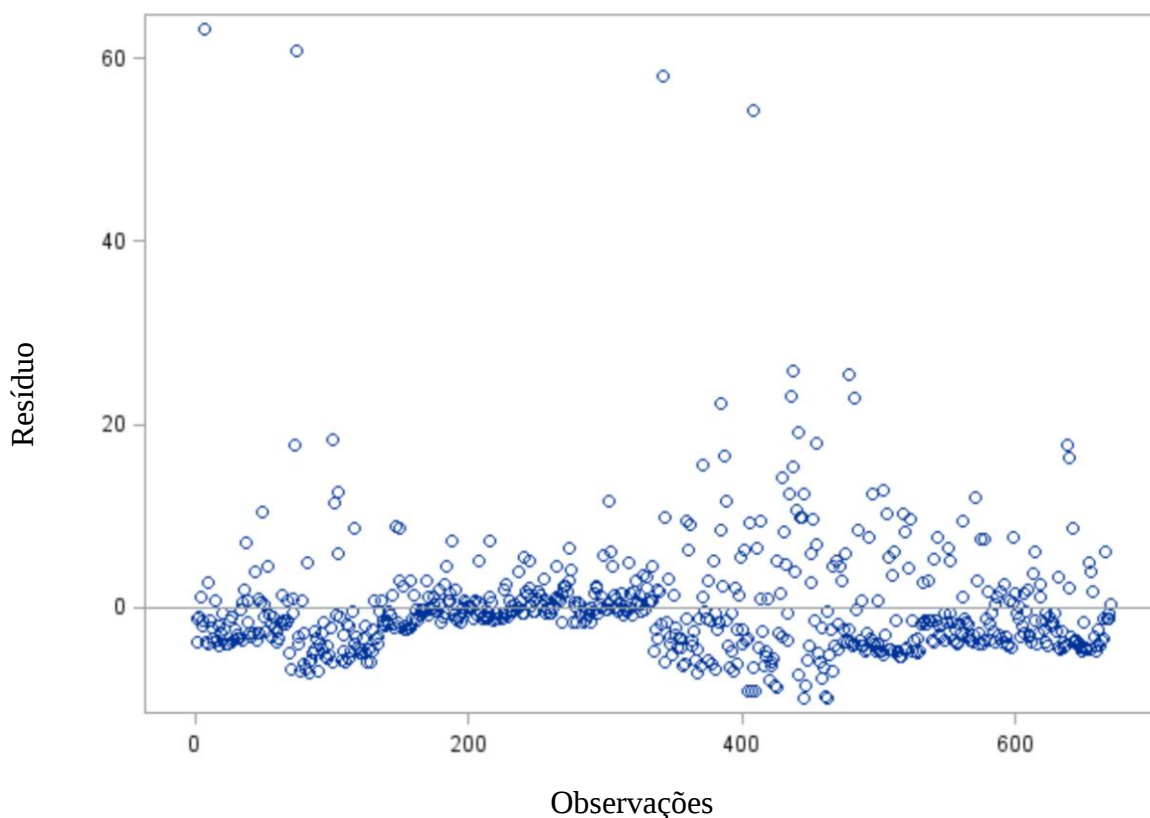


Figura 20. Resíduos das observações para os efeitos principais significativos (escala e avaliador) presentes nas avaliações das escalas diagramáticas de mancha foliar bacteriana (*Pseudomonas* sp.) em eucalipto.

Em relação ao efeito de uso de escala, a diferença entre as médias da diferença absoluta indica que o uso da escala diagramática para as estimativas da severidade da doença pelos avaliadores é favorável em comparação às estimativas feitas sem o auxílio de escala, sendo as respectivas médias e intervalos de confiança à 95%: 2,88 (2,23; 3,53) e 5,95 (5,07; 6,82). O teste de Tukey-Kramer foi significativo para esta diferença ($p < 0,0001$).

Para o efeito de avaliador, a diferença absoluta média indica que há diferença significativa entre os avaliadores da escala diagramática de bacteriose causada por *Pseudomonas* sp. em eucalipto (Tabela 4). Considerando as estimativas, todos

avaliadores são diferentes entre si com exceção do avaliador 5, que é igual estatisticamente aos avaliadores 3 e 4.

Tabela 4. Diferença entre os avaliadores da escala diagramática de mancha bacteriana foliar causada por *Pseudomonas* sp. em eucalipto, com respectivas médias da diferença absoluta e intervalos de confiança à 95%.

Avaliador	Diferença Absoluta Média	IC – inferior	IC – superior
2	8,15 a	6,33	9,97
1	5,46 b	3,90	7,01
3	3,32 c	2,44	4,21
5	2,66 cd	2,05	3,26
4	2,47 d	1,94	3,00

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente no teste de Tukey-Kramer a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Para a espécie *Xanthomonas* sp. de bactérias, também foi elaborada uma escala diagramática de mancha bacteriana para avaliação de severidade em diferentes concentrações de inóculo em eucalipto (Figura 21).

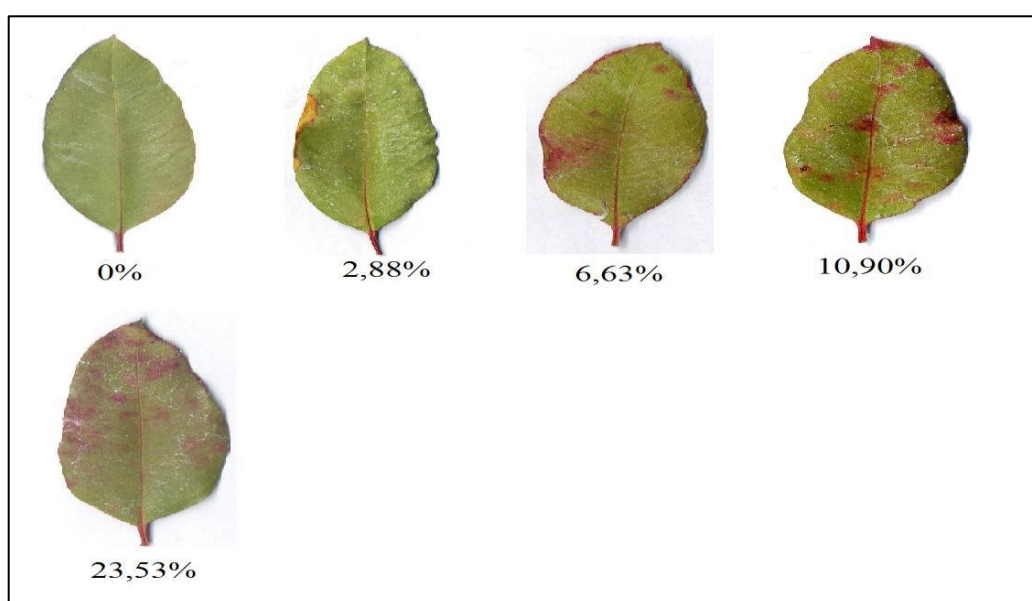


Figura 21. Escala diagramática de mancha foliar bacteriana (*Xanthomonas* sp.) para análise de severidade de tecidos lesionados em eucalipto.

O experimento envolvendo a espécie de bactéria *Xanthomonas* sp. apresenta apenas um efeito principal: escala ($p < 0,0463$). O modelo ajustado apresentou bom ajuste (figura 22).

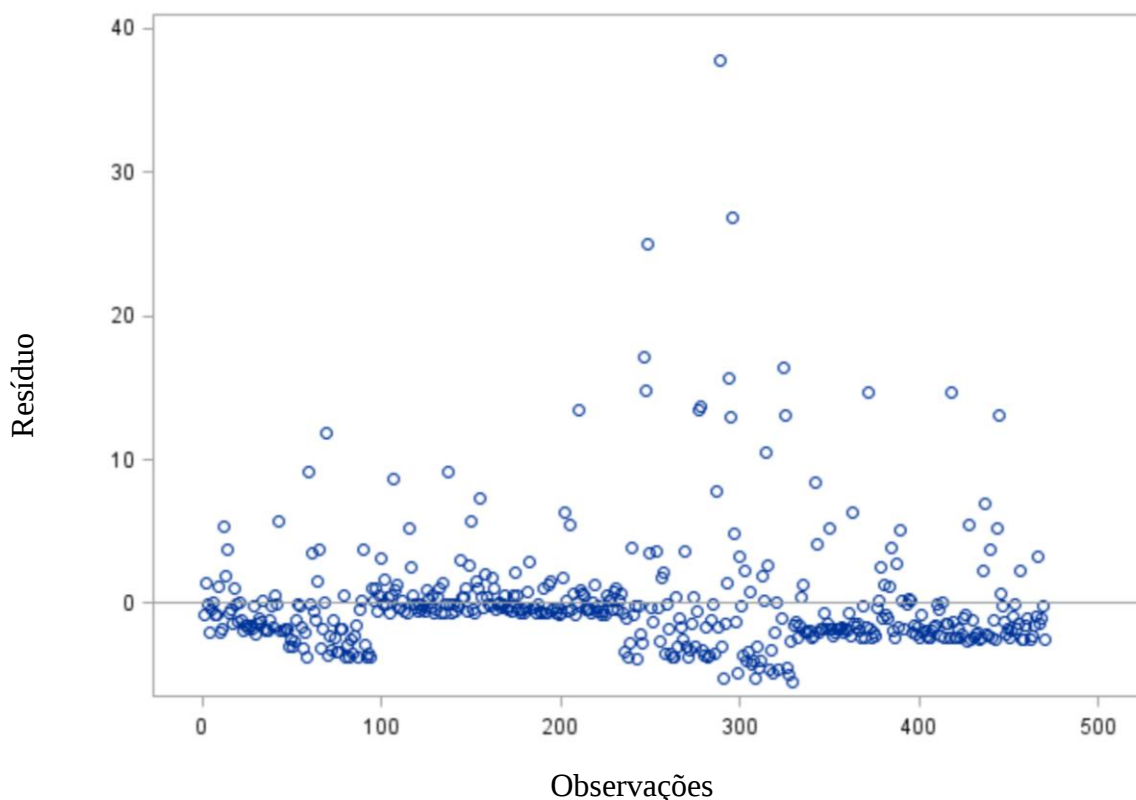


Figura 22. Resíduos das observações para os efeitos principais significativos (escala e avaliador) presentes nas avaliações das escalas diagramáticas de mancha foliar bacteriana (*Xanthomonas* sp.) em eucalipto.

Para o efeito principal detectado (escala), a diferença absoluta média torna evidente que o uso de escala teve impacto positivo nas estimativas dos avaliadores, apresentando médias menores que a situação com avaliações sem auxílio da escala elaborada, sendo, respectivamente com 95% de confiança: 1,58 (1,28; 1,88) e 3,42 (2,69; 4,15). O teste de Tukey-Kramer confirmou a diferença significativa ($p < 0,0030$)

4.3 Utilização de tons de cinza de imagens digitais foliares de clones com bacteriose no estudo da severidade

Na primeira abordagem, que considerava todos os clones como um único grupo, as correlações de Spearman de tons de cinza médio, modal e máximo e severidade foram significativas e positivas, exceto para a correlação entre a severidade e os tons de cinza mínimo, que foi negativa (Tabela 5). Isto indica que quanto maior a severidade, maior os valores de tons de cinza médio, modal e máximo, e menor o valor de cinza mínimo. Na segunda abordagem, analisando clone a clone, as correlações de Spearman foram significativas e negativas entre a severidade e os tons de cinza mínimo para todos os clones (Tabela 6), indicando que é possível detectar o aumento de severidade com a diminuição do tom de cinza mínimo. Já foi visto que tons de cinza podem ser utilizados como ferramenta de diferenciação (MONTINI et al., 2016).

Tabela 5. Correlação de Spearman entre severidade e tons de cinza (médio, modal, mínimo e máximo), seguidos dos respectivos valores p, considerando todos os clones como um único grupo.

	Tons de cinza			
	Médio	Modal	Mínimo	Máximo
Severidade	0,23986	0,26161	-0,35753	0,16747
(valor p)	(0,0031)	(0,0012)	(<0,0001)	(0,0405)

Tabela 6. Correlação de Spearman entre severidade e tons de cinza (médio, modal, mínimo e máximo), seguidos dos respectivos valores p, considerando clone a clone.

	Clone	Tons de cinza			
		Médio	Modal	Mínimo	Máximo
Severidade	H13	-0,01676	-0,0558	-0,47447	0,10890
(valor p)		(0,9080)	(0,7003)	(0,0005)	(0,4516)
	I144	0,13248	0,17224	-0,36159	0,03057
		(0,6591)	(0,2317)	(0,0099)	(0,08325)
	AEC 1528	0,12922	0,21917	-0,30539	-0,04751
		(0,3711)	(0,1262)	(0,0310)	(0,7427)

Na análise estatística do efeito dos clones na severidade, houve diferença entre as médias de severidade do clone I144 e médias de severidade dos clones H13 e AEC 1528, porém não houve diferença entre as médias de severidade dos clones H13 e AEC 1528 (Tabelas 7), tornando possível a diferenciação do I144 dos demais por meio da severidade. Este fato pode indicar uma maior suscetibilidade do clone I144 para infecção de bacteriose em relação aos demais, necessitando de mais estudos para comprovação. Houve boa qualidade de ajuste, pois o modelo ajustado apresentou desvio por graus de liberdade igual a 1,1387 (Figura 23).

Tabela 7. Médias e desvio padrão para as severidades dos clones AEC 1528, H13 e I144 de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

Clone	Média	Desvio Padrão
I144	11,00 a	8,39
H13	5,88 b	5,97
AEC 1528	5,18 b	5,20

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente no teste de Tukey-Kramer a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

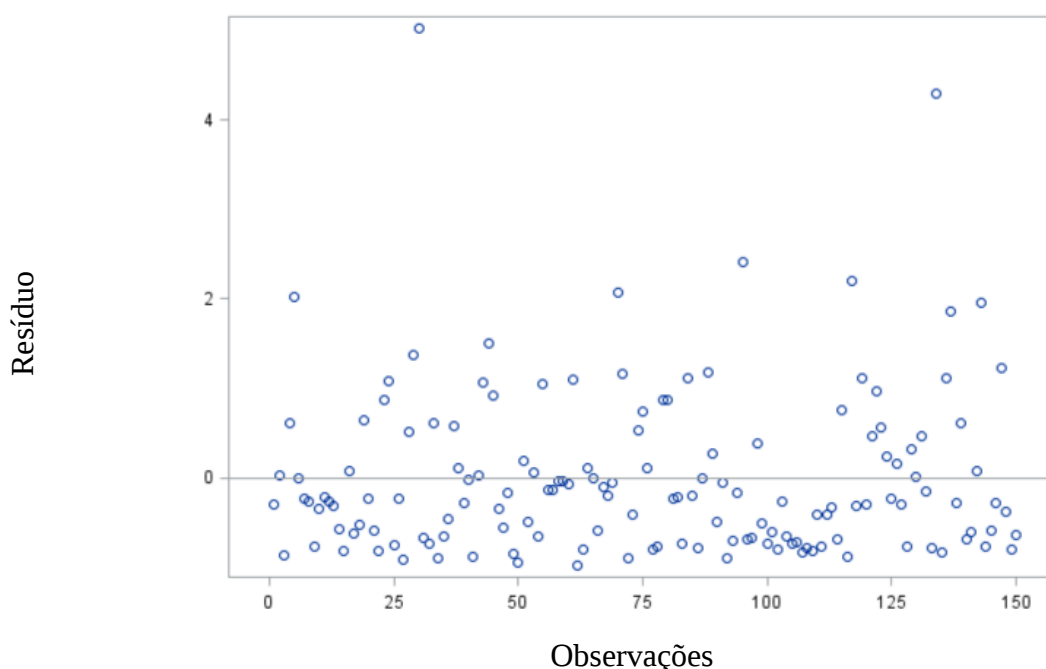


Figura 23. Resíduos do efeito de diferentes clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (H13, I144 e AEC 1528) na severidade de lesões causadas por mancha foliar bacteriana.

Na análise estatística do efeito dos clones nos tons de cinza, houve diferença entre as médias de todos os clones (H13, I144 e AEC 1528) com relação aos tons de cinza médio (Tabela 8) e modal (Tabela 9). Já para o tom de cinza máximo não foi possível diferenciar o clone H13 do AEC 1528 (Tabela 10), assim como no teste anterior relacionado à severidade, e não houve diferença entre os clones para o tom de cinza mínimo. O desvio por graus de liberdade para os ajustes dos modelos relacionados aos tons de cinza médio (Figura 24), cinza modal (Figura 25), cinza mínimo (Figura 26) e cinza máximo (Figura 27) foram 1,0213; 1,0219; 1,0403; e 1,0231, respectivamente, indicando bons ajustes.

Tabela 8. Médias e desvio padrão dos valores de tom de cinza médio obtidos dos clones H13, I144 e AEC 1528 de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

Clone	Média	Desvio Padrão
I144	110,69 a	8,92
H13	105,78 b	6,08
AEC 1528	97,65 c	7,84

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente no teste de Tukey-Kramer a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Tabela 9. Médias e desvio padrão dos valores de tom de cinza modal obtidos dos clones H13, I144 e AEC 1528 de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

Clone	Média	Desvio Padrão
I144	110,16 a	10,12
H13	104,40 b	8,24
AEC 1528	94,50 c	10,55

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente no teste de Tukey-Kramer a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Tabela 10. Médias e desvio padrão dos valores de tom de cinza máximo obtidos dos clones H13, I144 e AEC 1528 de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

Clone	Média	Desvio Padrão
I144	229,78 a	17,80
AEC 1528	210,38 b	27,23
H13	202,38 b	31,76

Médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente no teste de Tukey-Kramer a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

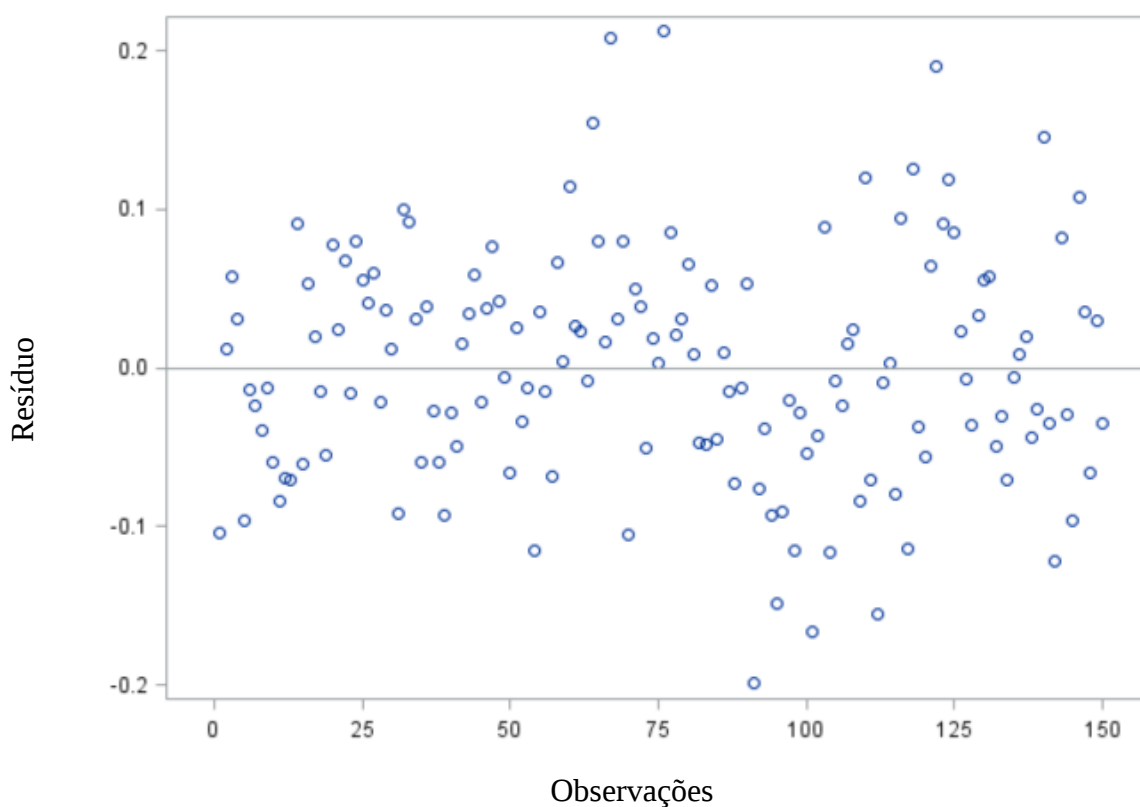


Figura 24. Resíduos do efeito de diferentes clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (H13, I144 e AEC 1528) em tons de cinza médio das imagens das folhas digitalizadas.

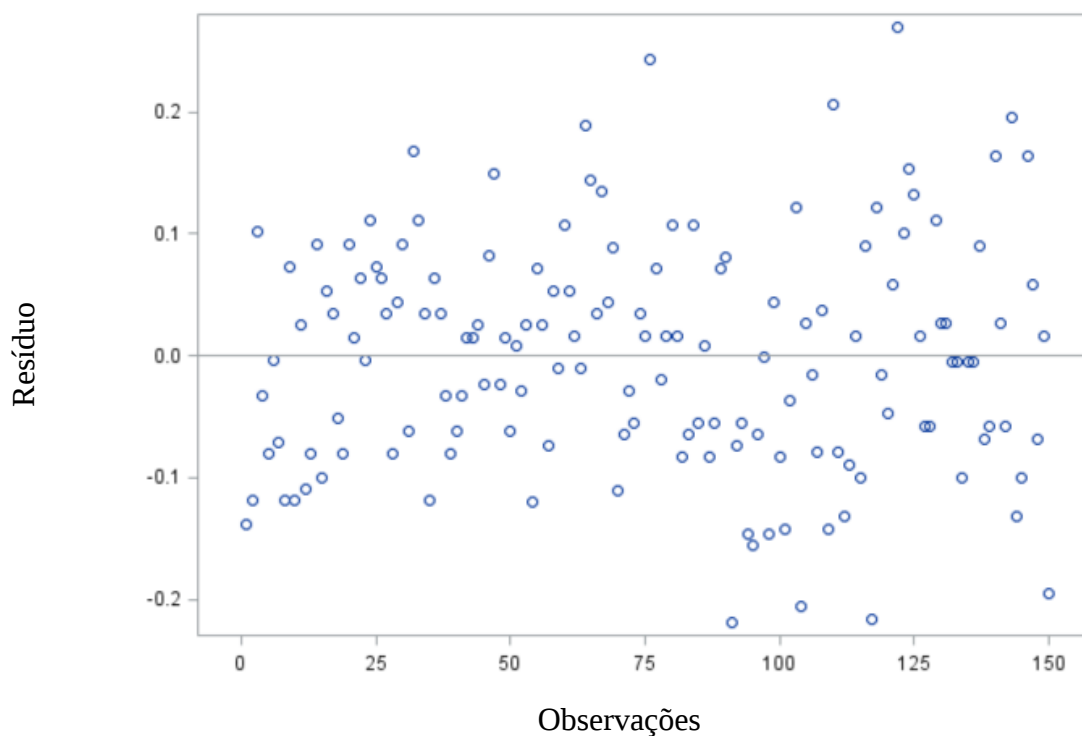


Figura 25. Resíduos do efeito de diferentes clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (H13, I144 e AEC 1528) em tons de cinza modal das imagens das folhas digitalizadas.

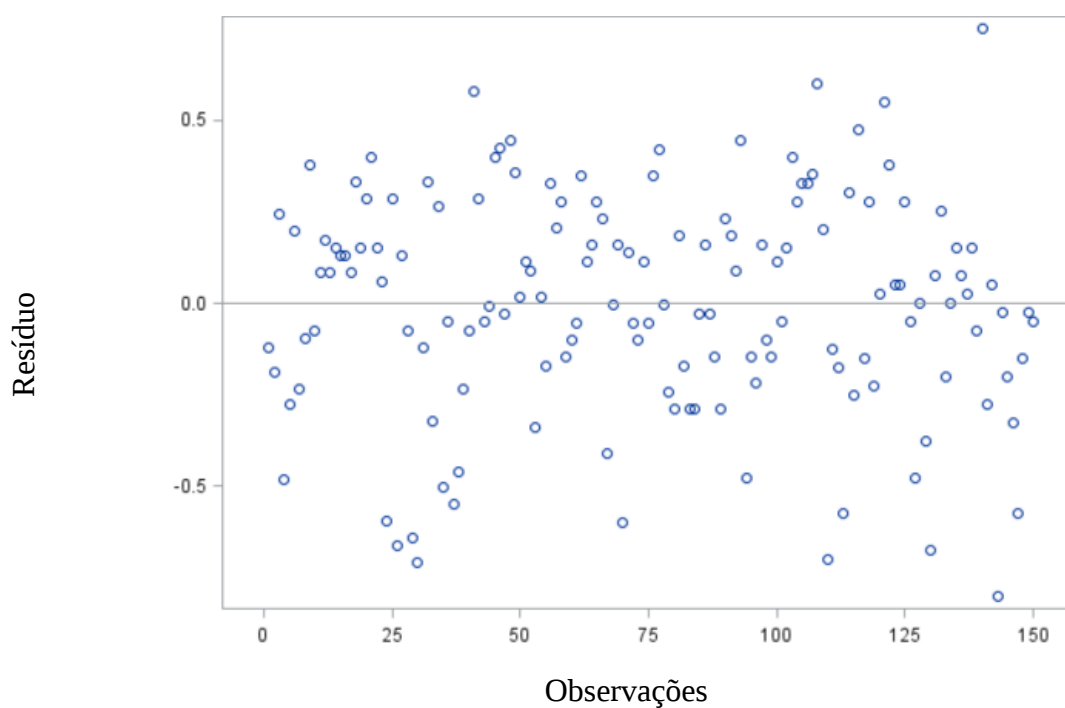


Figura 26. Resíduos do efeito de diferentes clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (H13, I144 e AEC 1528) em tons de cinza mínimo das imagens das folhas digitalizadas.

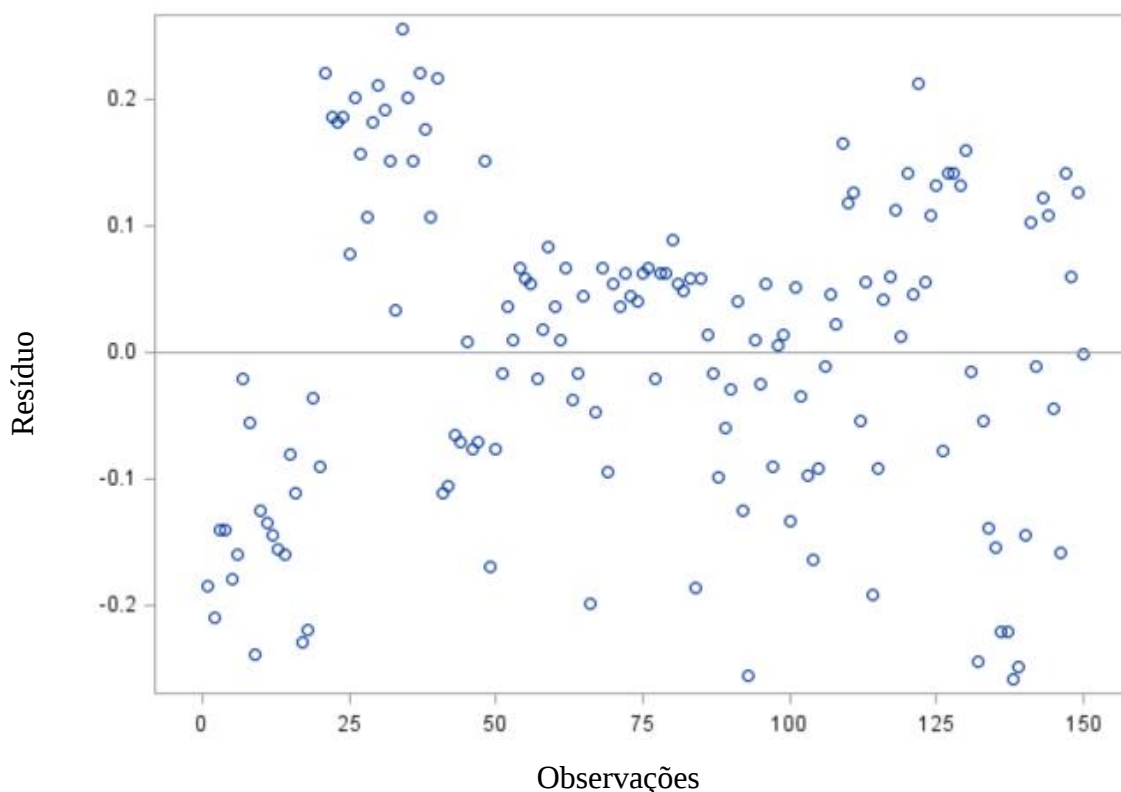


Figura 27. Resíduos do efeito de diferentes clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (H13, I144 e AEC 1528) em tons de cinza máximo das imagens das folhas digitalizadas.

4.4 Efeito da dispersão de área lesionada na utilização de escalas diagramáticas

Utilizando o método da diferença absoluta média, este experimento obteve como efeitos principais e significativos: nível da escala ($p < 0,0001$) e dispersão da lesão ($p < 0,0001$) - Tukey-Kramer a 95% de confiança. Foi detectada uma interação significativa entre os níveis da escala e as dispersões de lesão nas folhas ($p < 0,0189$). A interação dos níveis 5 e 6 de dispersão de lesões causadas pela bacteriose e o nível 6 da escala diagramática mostraram-se diferentes de todas as outras, provavelmente por se tratarem de áreas maiores de tecido coberto por lesões mais dispersas que os demais, gerando maior erro nas avaliações (Tabela 11). O desvio por graus de liberdade foi de 1,2931, mostrando um bom ajuste do modelo (Figura 28).

Tabela 11. Diferenças na interação entre os 6 níveis da escala e as 5 dispersões da doença utilizando diferença absoluta média.

		Dispersão da doença				
		1	2	3	4	5
Níveis da escala	1	0,1000 Aa	1,5400 Aa	0,7280 Aa	0,8880 Aa	0,5280 Aa
	2	0,1800 Aa	2,9900 Aa	1,4700 Aa	1,1340 Aa	0,3020 Aa
	3	0,0160 Aa	0,9160 Aa	1,1160 Aa	1,0840 Aa	1,3880 Aa
	4	0,3600 Aa	3,7900 Aa	2,1700 Aa	1,8100 Aa	3,9900 Aa
	5	0,1280 Aa	5,6860 Aa	3,9140 Aa	6,7140 Aa	4,4860 Aa
	6	0,2000 Aa	5,6260 Aa	2,3420 Aa	7,6580 Bb	9,0580 Bb

Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem estatisticamente no teste de Tukey-Kramer a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

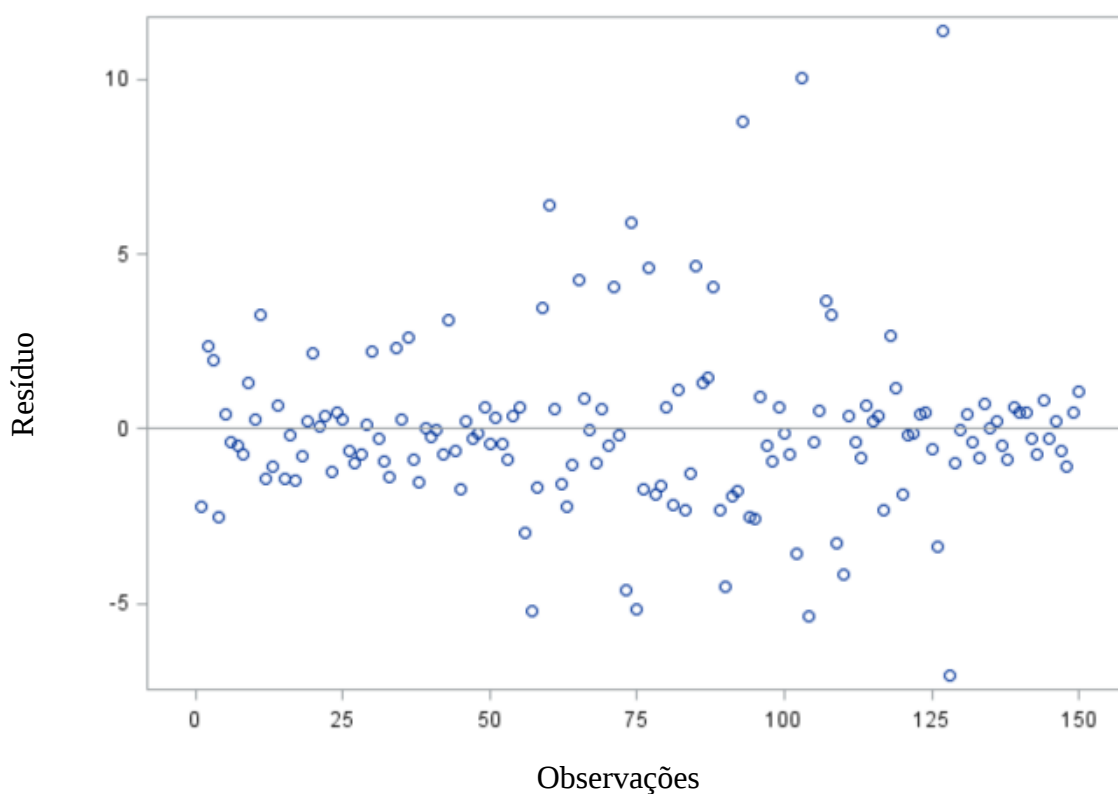


Figura 28. Resíduos dos efeitos principais significativos (nível de escala e dispersão de lesão) presentes nas avaliações de mancha foliar bacteriana em folhas geradas artificialmente de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

Utilizando o modelo linear generalizado de regressão entre dispersão e classe, chegou-se a um modelo ajustado $\text{Ln}(\text{difabs} + 0,5) = -1,0240 + 0,2397\text{dispersão} + 0,2427\text{classe}$. Analisando os parâmetros é possível observar que quando se aumenta a dispersão e o nível da escala, há implicância no aumento da diferença absoluta da severidade estimada. Este fato indica que a variação na dispersão das lesões nas folhas e a variação dos níveis da escala influenciam diretamente a estimativa de cada avaliador. O desvio por graus de liberdade foi de 1,0204, indicando um bom ajuste do modelo (figura 29).

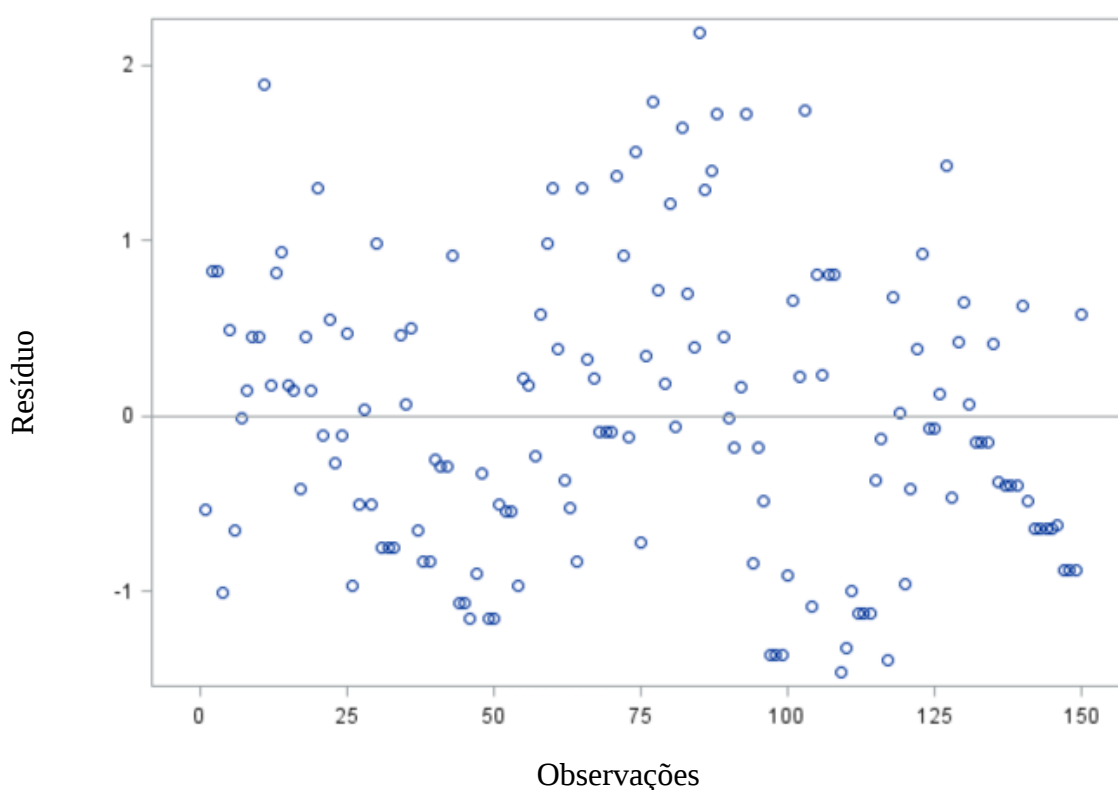


Figura 29. Resíduos do modelo ajustado pelo modelo linear generalizado de regressão baseado nas avaliações de mancha foliar bacteriana em folhas geradas artificialmente de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

Em ambas abordagens, foi detectado que houve influência da dispersão e do nível de severidade encontrado. Estudos já demonstraram que o número de lesões, inclusive o tamanho das lesões propicia superestimativas por parte dos avaliadores (SHERWOOD et al., 1983; NITA et al., 2003; BOCK et al., 2010).

5 CONCLUSÃO

a) Escalas diagramáticas podem ser validadas por diferença absoluta média. O método de quartis é viável na elaboração de escalas diagramáticas para bacteriose em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. O uso das escalas diagramáticas favoreceu melhoras nas estimativas dos avaliadores na maioria dos casos.

b) A validação pode ser feita por diferença absoluta média e o uso de escalas favorem as estimativas dos avaliadores. A construção de escalas diagramáticas de bacteriose em *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* levando em consideração diferentes concentrações de inóculo e diferentes espécies de bactérias podem causar diferenças nas estimativas de cada avaliador.

c) É possível avaliar a severidade utilizando tons de cinza em imagens digitais de clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* como um único grupo. É possível avaliar a severidade pelo tom de cinza mínimo, quando se analisa cada clone separadamente. Todos os clones podem ser diferenciados pelos tons de cinza médio e modal.

d) As variações da dispersão das lesões foliares de uma mesma severidade e a variação dos níveis da escala diagramática implicam diretamente na estimativa dos avaliadores, favorecendo aumentos ou diminuições em suas estimativas.

6 BIBLIOGRAFIA

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2^a. ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 500p.

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; PALAZZO, D.; BASSANEZI, R.B.; GODOY, C.V.; TORRES, G.A.M. Clorose variegada dos citros: uma escala diagramática para avaliação da severidade da doença. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.18, n.2, p.174-180, 1993.

ANDRADE, G.C.G.; ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G., MAFFIA, L.A.; GONÇALVES, R.C. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalariaeucalypti*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.30, n.5, p.504-509, out. 2005.

AUER, C.G.; SANTOS, A.F. dos; RODRIGUES, L.M. R.; RODRIGUES NETO, J. Ocorrência de mancha foliar bacteriana em plantios de eucaliptos no Estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, fev. 2010.

BARDSLEY, S.J. e NGUGI, H.K. Reliability and accuracy of visual methods to quantify severity of foliar bacterial spot symptoms on peach and nectarine. **Plant Pathology**, v.62, p.460–474, 2013.

BARRICHELO, L. E. G; QUEIROZ, L. R. de S. **O eucalipto: um século no Brasil [1908/2008]**. São Paulo: Antonio Bellini Editora & Cultura, 2007. p. 18-23.

BOCK, C. H.; G. H. POOLE; P. E. PARKER; T. R. GOTTWALD. Plant Disease Severity Estimated Visually, by Digital Photography and Image Analysis, and by Hyperspectral Imaging. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 29:59–107, 2010.

BOCK, C.H.; EL JARROUDI, M; KOUADIO, L.A.; MACKELS, C.; CHIANG, K.-S.; DELFOSSE, P. Disease severity estimates – effects of rater accuracy and assessment methods for comparing treatments. **Plant Disease**, v.99, n.8, p.1104-1112, 2015.

CASELLA, G.; BERGER, R. L. Regression Models. In: CASELLA, G.; BERGER, R. L. **Statistical Inference**. 2. ed. Pacific Grove: Duxbury, 2002. cap. 12, p. 577-583.

DIGGLE, P.J., HEAGERTY, P.J., LIANG, K.Y. AND ZEGER, S.L. **Analysis of Longitudinal Data**. 2^a.ed. Oxford: Oxford University Press, 2002.

FURTADO, E. L.; DIAS, D. C.; OHTO, C. T.; ROSA, D. D. **Doenças do eucalipto no Brasil**. 1. ed. Botucatu: 2009. 74 p.

FURTADO, E. L.; WILKEN, C. F. **Principais doenças e pragas em plantios de eucalipto no Brasil**. IPEF/PROTEF Câmara Setorial de Florestas Plantadas no Brasil, maio, 2011.

GBUR, E. E.; STROUP, W. W. **Analysis of Generalized Linear Mixed Models in the Agricultural and Natural Resources Science**. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Crop Science Society of America. Madison, Wisconsin-USA. 283 p., 2012.

GODOY, C. V.; CARNEIRO, S.M.P.T.G.; IMAUTI, M.T.; PRIA, M.D.; AMORIM, L.; BERGER, R.D.; BERGAMIN FILHO. A. Diagrammatic scales for bean diseases: Development and validation. **Journal of Plant Disease and Protection**, Stuttgart, v.104, n.4, p.336-345, nov. 1997.

GONÇALVES, G. C.; LAU, D; OLIVEIRA, J. R.; MAFFIA, L. A.; CASCARDO, J. C. M.; ALFENAS, A. C. Etiology of bacterial leaf blight of eucalyptus in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 180-188, 2008.

HERBERT, T. T. 1982. The rationale for the Horsfall-Barratt plant disease assessment scale. **Phytopathology**, v.72, n.10, p.1269, 1982.

HORSFALL, J. C.; BARRATT, R. W. An improved grading system for measuring plant diseases. **Phytopathology**, St. Paul, v.35, n.8, p.665, 1945.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório IBÁ 2016. Brasília, DF, 2016. 100p. Disponível em: <http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2016_.pdf>. Acesso em: 8 set. 2016

JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A. Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.28, n.2, p.184-188, abr. 2003

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A.B.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 2005. v.2, p.327-328.

KRUGNER, T.L.; AUER, C.G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A.B.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 2005. v.2, p.327-328.

LIN, L. I. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. **Biometrics**, v.45, p. 255–268, 1989.

MAHLEIN, A. K.. Plant disease detection by imaging sensors – Parallels and specific demands for precision agriculture and plant phenotyping. **Plant disease**, v.100, n.2, p.241-251, fev. 2016.

MONTINI, R.M. de C.; PASSOS, J.R. de S.; EIRA, A.F. da. Digital monitoring of mycelium growth kinetics and vigor of shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) on agar medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.37, n.1, p.90-95, Mar. 2006.

NELDER, JOHN A; WEDDERBURN, ROBERT W. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society Series A**, 135 (3): 370–384, 1972.doi:10.2307/2344614.

NICOLI, A. et al. Validação de escala diagramática para quantificação da severidade da antracnose do colmo do milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 10, p. 1720-1726, Out. 2015.

NITA, M., ELLIS, M.A., MADDEN, L.V. Reliability and accuracy of visual estimation of *Phomopsis* leaf blight of strawberry. **Phytopathology**, v.93, n.8, p.995-1005, 2003.

NUTTER JR, F.W.; SCHULTZ, P.M. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.17, n.2, p.174-184, 1995.

PASSADOR, M.M.; PORCENA, A.S.; MASSON, M.V.; DE PIERI, C.; FINKENAUER, E.; FFURTADO, E.L. Escala diagramática para quantificação da severidade de manchas em folhas de *Eucalyptus globulus* Labill. causadas por *Teratosphaeria nubilosa* (Cooke) Crous & U. Braun. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.23, n.2, p.523-530, abr. 2013.

SANKARAN, S.; MISHRA, A.; Ehsani, R.; Davis, C.A review of advanced techniques for detecting plant diseases. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.72, p.1–13, 2010.

SANTOS, A. F. dos; AUER, C. G.; RODRIGUES, L. M. R.; RODRIGUES NETO, J. 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.

SAS – **Statistical analysis system for Windows**. release 9.2. Cary, 2012.

SHERWOOD, R.T., BERG, C.C., HOOVER, M.R., ZEIDERS, K.E. Illusions in visual assessment of Stagonospora leaf spot of orchard grass. **Phytopathology**, v.73, n.2, p.173-177, 1983.

TRUMAN, R. Die-back of *Eucalyptus citriodora* caused by *Xanthomonas eucalypti* sp. n. **Phytopathology**, v. 64, p.143-144, 1974.

VALE, F.X.R. do; JUNIOR, W.C. de J.; LIBERATO, J.R.; SOUZA, C.A. Quantificação de doenças e do crescimento do hospedeiro. In: **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perffil, 2004. p. 91–121.

WALKER, C.; ARAÚJO, M. M.; MACIEL, C. G.; MARCUZZO, S. B. **Viveiro florestal: evolução tecnológica e legalização**. Revista Verde. Mossoró – RN – Brasil. v.6, n.5, p.8-14, 2011.

WESTFALL, P. H.; TOBIAS, R. D.; ROM, D.; WOLFINGER, R. D.; HOCHBERG, Y.. **Multiple Comparisons and Multiple Tests Using the SAS System**, Cary, NC: SAS Institute Inc. 1999.

ZAMBOLIM, L. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Editora Perffil, 2004. p.98-102.

ZAMPROGNO, K.C.; FURTADO, E.L.; MARINO, C.L.; BONINE, C.A.; DIAS, D.C. Use of bulked segregant analysis in identification of molecular markers linked to resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus* sp. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.3, p.253-255, 2008.