

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA A
QUANTIFICAÇÃO DA SEVERIDADE DA SECA-DE-PONTEIROS DO
EUCALIPTO.

Norton Borges Junior
Engenheiro Florestal /UFSM

Dissertação apresentada como um dos requisitos à
obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Sanidade Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil.
Agosto de 2019

CIP - Catalogação na Publicação

Borges Junior, Norton
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ESCALA DIAGRAMÁTICA
PARA A QUANTIFICAÇÃO DA SEVERIDADE DA
SECA-DE-PONTEIROS DO EUCALIPTO / Norton Borges Junior.
-- 2019.
48 f.
Orientador: Roberto Lanna Lanna Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2019.

1. Manejo de doenças florestais. 2. Fitopatologia
florestal. 3. Erwinia psidii. 4. Clonagem. 5.
Eucaliptocultura. I. Lanna Filho, Roberto Lanna,
orient. II. Título.

NORTON BORGES JUNIOR
Engenheiro Florestal - UFSM

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 23.08.2019
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 04.09.2020
Por

ROBERTO LANNA FILHO
Orientador - PPG Fitotecnia
UFRGS

CHRISTIAN BREDEMEIER
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

JÓSE ANTÔNIO MARTINELLI
PPG Fitotecnia/UFRGS

MARÍLIA LAZAROTTO
PPG Fitotecnia/UFRGS

ALEXANDRE SANDRI CAPUCHO
UNIVASF

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

“De nada adiantaria conhecer o patógeno
de uma doença se não fosse possível
quantificar os sintomas por ele causados.”

(Lilian Amorim)

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Franciane Slivinski pelo seu apoio incondicional em todos os momentos dessa caminhada, pela sua ajuda fundamental e compreensão da minha ausência em vários momentos. E, também, às minhas filhas Nicole e Monique que compreenderam a minha ausência nessa fase tão importante na formação delas.

Aos meus pais Norton Tiellet e Suzana Werner que são os principais responsáveis pela minha graduação, sempre deram apoio aos meus estudos e, principalmente, na formação do meu caráter.

Ao meu orientador Roberto Lanna Filho que acreditou na minha capacidade e possibilitou essa oportunidade ímpar de realizar a pós-graduação, pelos seus ensinamentos e confiança. Ao professor Alexandre Capucho, de extrema importância pela sua experiência e pelas qualificadas contribuições ao desenvolvimento deste estudo.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul que possibilitou a realização desse estudo, uma instituição reconhecida em nível mundial, e que possui um excelente quadro de funcionários e professores. Ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia pela ótima organização e qualificação de seu quadro.

À empresa CMPC (*Compañía Manufacturera de Papeles y Cartones*) que permitiu a realização da minha pós-graduação. Obrigado principalmente às pessoas de Rodrigo Alarcon e Marcio Bernardi.

Aos professores da Fitotecnia da UFGRS Carla Delatorre, Edson Bertolini, Josué Sant Ana, Lauri Radunz, Luiza Redaelli, Rafael Dionello e Simone Jahnke pelos ensinamentos e amizade que guardarei por toda a vida.

Aos colegas da pós-graduação Flavia Tomita, Neemias Santos, Patrícia Pires e Vinícius Silveira pelo companheirismo em todos os momentos.

Aos amigos Jonas Silva e Cássio Kockhann pelo apoio fundamental na realização desse estudo.

Aos demais amigos e colegas que incentivaram e possibilitaram a concretização deste sonho.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA SEVERIDADE DA SECA-DE-PONTEIROS DO EUCALIPTO. ¹

Autor: Norton Borges Junior
Orientador: Dr. Roberto Lanna Filho

RESUMO

O gênero *Eucalyptus* engloba diversas espécies cultivadas no Brasil e destaca-se por ocupar uma área plantada de aproximadamente 5,7 milhões de hectares, com uma produtividade média de 35,7 m³/ha/ano. No entanto, alguns fatores têm acometido o cultivo da cultura no país. Dentre estes, as doenças têm se tornado relevante para o decréscimo da produção, bem como o aumento do seu custo. No estado do Rio Grande do Sul, a seca-de-ponteiros tem se destacado como uma das principais doenças da eucaliptocultura, podendo levar à morte das plantas. Causada pela fitobactéria *Erwinia psidii*, a doença também pode manifestar sintomas de cancro e murcha em árvores. Constatada em 2009, há poucos estudos sobre o patossistema *E. psidii* versus *Eucalyptus* spp. nas condições brasileiras. A inexistência de métodos acurados e precisos para quantificar a enfermidade torna laboriosa e árdua a prática de estimar a doença no campo, podendo causar erros na estimativa dos sintomas. Isso impossibilita aferir com exatidão a eficiência de diferentes medidas de controle, a resistência varietal ou a eficácia de produtos fitossanitários contra a enfermidade. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma escala diagramática para quantificar a severidade da seca-de-ponteiros em eucalipto. Para a elaboração da escala, imagens de 80 plantas infectadas foram obtidas com diferentes níveis de severidade da doença. Em seguida, a severidade real para cada imagem foi determinada pelo programa QUANT[®]. A partir da frequência dos valores de severidade nas plantas amostradas, foram estabelecidos os níveis intermediários da doença para compor a escala diagramática. Foram confeccionados 8 diagramas para compor a escala, com os seguintes valores de severidade: 1, 3, 5, 10, 15, 30, 50 e 100%. A escala diagramática desenvolvida melhorou a precisão dos avaliadores, produzindo menor variação nas estimativas da severidade da doença, e melhoraram a reprodutibilidade e a confiabilidade entre as estimativas de severidade, apresentando pequena variação entre os diferentes avaliadores. O emprego dessa escala contribuirá para o desenvolvimento de variedades com resistência à doença, além de auxiliar na comprovação da efetividade de medidas de controle adotadas.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (48f.) Agosto, 2019.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A STANDARD AREA DIAGRAM SET FOR SEVERITY ASSESSMENT OF DIE-BACK IN EUCALYPTUS.¹

Author: Norton Borges Junior
Adviser: Dr. Roberto Lanna Filho

ABSTRACT

The *Eucalyptus* genus includes several species cultivated in Brazil and stands out for occupying a planted area about 5.7 million hectares, with an average productivity of 35.7 m³/ha/year. However, some factors have affected this crop cultivation in the country. Diseases have become relevant for the decrease of production, as well as the increase of its cost. In the state of Rio Grande do Sul, die-back has been highlighted as one of the main diseases of the eucalyptus culture, which can lead to plant death. This disease is caused by the phyto bacterium *Erwinia psidii*, and can also manifest symptoms of canker and wilt in trees. It was documented in 2009 in this crop, therefore there are few studies on the pathosystem *E. psidii* versus *Eucalyptus* spp. under Brazilian conditions. The lack of accurate and precise methods to quantify this disease in the field makes the practice of estimating it laborious and may cause estimation errors of symptoms. This makes it impossible to accurately measure the effectiveness of different control methods, varietal resistance or the effectiveness of phytosanitary products against this disease. In this context, the objective of this study was to develop a standard area diagram set (SAD) to quantify the severity of die-back in different eucalyptus clones. To elaborate the SAD, images of 80 infected plants were obtained with different levels of disease severity. Then, the real disease severity for each image was determined by the QUANT[®] program. Intermediate disease levels were established from the frequency of severity values in the sampled plants to compose the SAD. Eight diagrams were made to compose the SAD, with the following severity values: 1, 3, 5, 10, 15, 30, 50 and 100%. The developed SAD set improved the accuracy of the raters, producing less variation in disease severity estimates, and improved reproducibility and reliability among the severity estimates, showing little variation between different raters. The adoption of this SAD will contribute to the development of varieties with resistance to this disease, and it will help to verify the effectiveness of the control methods used.

¹Master dissertation in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (48p.) August, 2019.

Sumário

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Eucaliptocultura.....	5
2.2 <i>Erwinia psidii</i>	5
2.3 Escalas diagramáticas.....	7
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Elaboração da escala diagramática para a seca-de-ponteiros...12	
3.2 Validação da escala diagramática para a seca-de-ponteiros.....15	
4 RESULTADOS.....	20
5 DISCUSSÃO.....	27
6 CONCLUSÕES.....	33
7 REFERÊNCIAS.....	34

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Coordenadas R, G, B (do inglês Red, Green e Blue) e constantes para as classes tecido sadio, tecido doente, fundo e caule empregados para a função discriminante.....	15
2. Parâmetros e estatísticas da análise de Lin entre a severidade estimada e real da seca-de-ponteiros causada por <i>Erwinia psidii</i> em eucalipto, realizadas por 20 avaliadores com e sem a escala diagramática.....	24
3. Análise do coeficiente de determinação (R^2) entre a severidade estimada e real da seca-de-ponteiros causada por <i>Erwinia psidii</i> em eucalipto, realizadas por 20 avaliadores combinados aos pares, com e sem a escala diagramática.....	25

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Horto Florestal Cerro, talhão 4A, Eldorado do Sul/RS, Coordenadas: -30.11852, -51.52137, local de obtenção das 80 imagens das plantas com incidência da seca-de-ponteiros do eucalipto.....	12
2. Imagem de um clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> x (<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. grandis</i>), com um ano de idade apresentando seca-de-ponteiros causada por <i>Erwinia psidii</i>	13
3. A: imagem de um clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> x (<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. grandis</i>), com um ano de idade apresentando seca-de-ponteiros causada por <i>Erwinia psidii</i> . B: a mesma imagem editada no programa CorelDRAW® e processada no programa Quant, apresentando o tecido sadio (cor verde) e o tecido doente (cor ouro).....	14
4. Escala diagramática desenvolvida para quantificar a severidade da seca-de-ponteiros do eucalipto. Os números acima de cada imagem representam a porcentagem real da área afetada pela doença.....	17
5. Frequência dos intervalos de classe da severidade da seca-de-ponteiros causada por <i>Erwinia psidii</i> em <i>Eucalyptus urophylla</i> x (<i>E. camaldulensis</i> x <i>E. grandis</i>), obtidas pelo programa Quant®.....	20

6. Severidade estimada *versus* real da seca-de-ponteiros do eucalipto para 20 avaliadores sem o uso da escala diagramática desenvolvida. A linha pontilhada é a de concordância, representando perfeita concordância entre o valor real e o estimado (inclinação de 1, intercepto de 0). A precisão é determinada com o coeficiente de correlação concordante de Lin (ρ), calculado como o produto do coeficiente de correlação (r) e o fator de correção do desvio (C_b). C_b é uma função do deslocamento da posição (u) e do deslocamento de escala (v), indicando altura e inclinação da linha, respectivamente. Os parâmetros das estatísticas de Lin estão na Tabela 2..... 21
7. Severidade estimada *versus* real da seca-de-ponteiros do eucalipto para 20 avaliadores com o uso da escala diagramática desenvolvida. A linha pontilhada é a linha de concordância, representando perfeita concordância entre o valor real e o estimado (inclinação de 1, intercepto de 0). A precisão é determinada com o coeficiente de correlação concordante de Lin (ρ), calculado como o produto do coeficiente de correlação (r) e o fator de correção do desvio (C_b). C_b é uma função do deslocamento da posição (u) e do deslocamento de escala (v), indicando altura e inclinação da linha, respectivamente. Os parâmetros das estatísticas de Lin estão na Tabela 2..... 22
8. Distribuição média dos resíduos (severidade estimada – severidade real) das estimativas da seca-de-ponteiros do eucalipto causada por *Erwinia psidii*, obtidas de 20 avaliadores sem a escala diagramática (a) e com a escala diagramática (b)..... 23
9. Confiabilidade das estimativas de severidade da seca-de-ponteiros do eucalipto causada por *Erwinia psidii*, analisando o coeficiente de determinação (R^2) dos 20 avaliadores combinados aos pares com e sem o uso da escala diagramática..... 26

1 INTRODUÇÃO

O eucalipto é atualmente a cultura florestal mais plantada no Brasil, com cerca de 5,7 milhões de hectares e participação de 1,1% do Produto Interno Bruto (PIB). Apresenta a maior produtividade a nível mundial com incremento médio de 35,7 m³ de madeira por hectare ao ano. Também possui a menor rotação do mundo, que equivale ao tempo decorrido entre o plantio e a colheita das árvores, em torno de 5 anos. Os principais usos da madeira de eucalipto são, respectivamente, para fibras: celulose e papel; madeira: painéis, pisos e produtos sólidos; energia: carvão vegetal para siderúrgicas (IBÁ, 2017). Com a necessidade da expansão da eucaliptocultura, resultado da diversificação da produção florestal e aumento da demanda, ataques de patógenos têm sido mais frequentes, tanto em viveiro quanto pós implantação no campo, resultando em perda de crescimento e, em alguns casos, acarretando a perda de toda a produção.

Dentre as doenças que acometem a cultura, destacam-se a ferrugem-do-eucalipto (*Austropuccinia psidii* G. Winter), a murcha-bacteriana (*Ralstonia solanacearum* Smith) e a murcha-de-ceratocystis (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted) (Ferreira, 1989; Alfenas, 2006; Alfenas, 2009; Mafia *et al.*, 2011; Zauza *et al.*, 2014; Fonseca *et al.*, 2016; Beenken, 2017). Nos últimos anos, a seca-de-ponteiros causada por *Erwinia psidii* Rodrigues Neto, Robbs & Yamashiro tem

se destacado como doença importante para a eucaliptocultura nacional, causando a seca-de-ponteiros em árvores de eucalipto e, em menor frequência, a mortalidade de plantas (Arriel *et al.*, 2014). Embora reportada em goiabeira em 1982 (Rodrigues Neto *et al.*, 1987), somente em 2011 foram feitas as primeiras constatações da incidência de *E. psidii* em plantios comerciais de eucalipto (Coutinho *et al.*, 2011). Como a enfermidade foi reportada há poucos anos, ainda não se tem informações consistentes da epidemiologia da doença ou fatores que podem interferir na patogênese da fitobactéria. Estudos conduzidos pela empresa CMPC (*Compañía Manufacturera de Papeles y Cartones*) reportam uma redução de até 24% no crescimento das árvores, e uma incidência do patógeno em até 95% das plantas avaliadas. Notadamente, faz-se necessária a investigação de métodos de controle para minorar os danos causados pela doença. Para isso, métodos para quantificação da seca-de-ponteiros devem ser desenvolvidos para avaliar com acurácia e precisão qual a melhor estratégia de controle do patógeno.

A intensidade da doença pode ser expressa como incidência (ou frequência) e severidade. Incidência é a porcentagem de plantas ou partes de plantas doentes na amostra (ou população), independentemente da sua severidade individual. Severidade da doença é a porcentagem do tecido ou órgão hospedeiro relevante coberto por sintomas (ou lesões) da doença (Kranz, 1988). A determinação da incidência e da severidade são fundamentais para o manejo integrado da doença. O emprego de escalas diagramáticas para a quantificação de doenças tem sido adotado com grande sucesso para diferentes culturas, sendo esse o método mais utilizado para avaliar a severidade em muitos patossistemas (Alfenas *et al.*, 2009). As escalas diagramáticas são

utilizadas para a orientação da estimativa visual da severidade da doença, tornando a avaliação mais precisa e acurada quando comparada à área amostrada com a representação diagramática. Além disso, são mais fáceis de serem utilizadas por representarem os sintomas típicos das doenças em diferentes intensidades (Vale, 2004). Para a seca-de-ponteiros, não existe uma escala diagramática para ser empregada na avaliação de medidas de controle, na estimativa da perda de produção e na seleção de materiais genéticos mais resistentes a doença. Atualmente, a estimativa da severidade da doença baseia-se na observação visual, método mais comum para a quantificação de doenças (Bock *et al.*, 2010), sem o uso de recursos acurados, precisos e reproduzíveis. Isso torna subjetiva a avaliação, podendo acarretar em vários erros na mensuração da severidade, que podem ser minimizados com o emprego de ferramentas padronizadas (Bock *et al.*, 2016).

Neste contexto, o desenvolvimento de uma escala diagramática poderia trazer avanços importantes na investigação do comportamento da doença nos principais genótipos comerciais cultivados no Brasil. Atualmente, não existe um controle satisfatório da fitobactéria por não haver uma compreensão do comportamento do patógeno e da doença sobre a cultura. O uso de um método que de forma rápida possibilite aferir com precisão e acurácia a doença, causaria impactos importantes na seleção de estratégias de manejo mais eficientes contra o patógeno. Notadamente, isto traria redução ou eliminação de dispêndio de recursos por produtores e empresas no combate à seca-de-ponteiros. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo geral desenvolver uma escala diagramática para a quantificação da severidade da seca-de-ponteiros do

eucalipto e, como objetivos específicos, validar a precisão, acurácia e a reprodutibilidade da escala desenvolvida.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Eucaliptocultura

O plantio do eucalipto vem aumentando significativamente no Brasil, com crescimento em 12% da área plantada nos últimos 5 anos, devido à sua excelente adaptação às condições de clima e de solo aqui existentes. O setor de árvores plantadas é responsável por 1,1% de toda riqueza gerada no país e 6,2% do PIB (Produto Interno Bruto) industrial. Os plantios estão localizados, principalmente, em Minas Gerais (24%), São Paulo (17%), Mato Grosso do Sul (15%), Bahia (11%) e Rio Grande do Sul (6%), o que representa 72,3% das plantações florestais brasileiras. O setor energético, de celulose e papel, moveleiro e da construção civil são os principais usuários da madeira produzida pelo eucalipto, de acordo com o Relatório da Associação da Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ, 2017).

2.2 *Erwinia psidii*

Erwinia psidii Rodrigues Neto, Robbs & Yamashiro é uma bactéria fitopatogênica pertencente à família Enterobacteriaceae, apresentando flagelos peritríquios e uma coloração esbranquiçada sobre meio de cultura (Rodrigues Neto *et al.*, 1987). A fitobactéria produz os compostos N-hexanoyl (C6-AHL) e N-heptanoyl-homoserine lactone (C7-AHL) envolvidos no processo de sinalização via

fenômeno de *quorum sensing* (Pomini *et al.*, 2005), que atua na comunicação célula-célula para desencadear processos responsáveis pela patogênese, sobrevivência e interação com o hospedeiro (Barnard *et al.*, 2007). A fitobactéria foi descrita pela primeira vez causando sintomas de seca-dos-ponteiros em goiabeiras (*Psidium guajava* L.), nos municípios de Valinhos e Pindamonhangaba, no estado de São Paulo, Brasil (Rodrigues Neto *et al.*, 1987). Posteriormente, a doença foi relatada em outros estados e no Distrito Federal (Uesugi *et al.*, 2001). Atualmente, a *E. psidii* é um dos patógenos mais importantes da cultura, acometendo plantas em pomares do Brasil Central (Teixeira *et al.*, 2009).

Até recentemente, o patógeno era somente reportado causando enfermidades em goiabeiras. No entanto, nos últimos anos, a fitobactéria foi identificada como agente causal da seca-de-ponteiros em *Eucalyptus* spp. no Uruguai e na Argentina (Coutinho *et al.*, 2011). No Brasil, a doença em eucalipto foi primeiramente constatada em Lençóis Paulista, São Paulo, em 2009, e posteriormente em Guaíba e Rosário do Sul, no Rio Grande do Sul, em plantios clonais dos híbridos de *E. urophylla* × *E. grandis*, *E. saligna* e, em plantios seminais de *E. grandis* e *E. dunnii* (Arriel *et al.*, 2014).

Um dos primeiros sintomas da doença se apresenta como lesões necróticas em folhas recém-formadas que, ao microscópio, apresenta exsudação bacteriana. Em ramos novos, em seções do caule infectado ou no sistema radicular, é possível observar a descoloração dos vasos xilemáticos e o extravasamento de pus (Arriel *et al.*, 2014). Geralmente as folhas apresentam necrose próxima à nervura central, com colorações que variam de avermelhada

a púrpura. Outro sintoma típico é a morte-dos-ponteiros, o que resulta na perda da dominância apical e indução de brotações laterais, atrasando o crescimento da planta (Coutinho *et al.* 2011). A doença é mais severa em plantas nos primeiros dois anos de idade, particularmente em tecidos jovens e em expansão (Coutinho *et al.*, 2011). Além de incitar seca-dos-ponteiros, a *E. psidii* pode causar murcha em plantas de eucalipto culminando na morte destas no campo a partir dos três meses após o plantio (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, eventualmente, pode-se observar exsudação bacteriana. No Brasil, esta enfermidade tem sido frequentemente observada nos estados do Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e São Paulo, nos quais as populações do patógeno apresentam baixa diversidade genética, porém, ocorrem diferenças na agressividade ou velocidade no aparecimento dos sintomas da doença entre os isolados de cada estado (Montoya *et al.*, 2019).

2.3 Escalas diagramáticas

A quantificação de doenças de plantas, ou fitopatometria, é de fundamental importância no estudo e na análise de epidemias, possibilitando compreender o desenvolvimento do patógeno e implementar estratégias de manejo (Amorim, 1995). O principal objetivo é obter dados quantitativos sobre a ocorrência e o desenvolvimento das doenças, para avaliar a importância relativa de diferentes enfermidades. Um bom método de quantificação de doença deve fornecer resultados acurados, precisos e reproduzíveis (Campbell & Madden,

1990; Nutter *et al.*, 1991; Vale, 2004). Acurácia diz respeito ao grau de proximidade entre a estimativa e a quantidade real da doença, enquanto precisão está relacionado à confiabilidade e, ou, repetibilidade dos valores associados à amostra com a menor variação possível entre si; por último, a reprodutibilidade, que trata da ausência de variação nas estimativas quando a mesma amostra é avaliada por diferentes avaliadores (Campbell & Madden, 1990; Vale, 2004).

As determinações de incidência e severidade são fundamentais na quantificação de uma doença, enquanto a incidência trata do número de plantas doentes em relação ao total de plantas, a severidade expressa a quantidade de tecido lesionado pela doença em porcentagem (Vale, 2004). A severidade pode ser estimada por meio de escalas diagramáticas, chaves descritivas, sensoriamento remoto (Bergamin Filho & Amorim, 1996), utilizando-se imagens digitalizadas e *softwares* especiais (Valle *et al.*, 2003). Nas escalas descritivas, ou também denominadas escalas de notas, utilizam-se classes arbitrárias para determinar a quantidade de doença. Assim, cada classe ou nota da escala representa um nível da enfermidade que pode ser representado em porcentagem, graus de resistência ou suscetibilidade. Estas, embora simples, são bastante utilizadas principalmente para avaliar resistência de plantas a doenças. Algumas são bastante imprecisas, sobretudo quando empregam níveis qualitativos (leve, moderado, alto) cujos significados são subjetivos devendo ser evitados pois possuem pouca reprodutibilidade (Vale, 2004; Alfenas *et al.*, 2009).

Dentre os métodos utilizados na quantificação da severidade de doenças, destaca-se o uso de escalas diagramáticas, desenvolvidas para padronizar as avaliações e eliminar a subjetividade dos avaliadores (Nutter Júnior & Schultz, 1995; Bock *et al.*, 2010). Com o advento das facilidades computacionais, o

desenvolvimento de escalas diagramáticas tornou-se mais fácil, aumentando-lhes a acurácia e precisão (Vale, 2004). As escalas diagramáticas consistem em um conjunto de ilustrações de uma planta doente ou órgãos da planta (folhas, caule, frutas, outros), exibindo um nível incremental de severidade. Como os níveis reais de severidade representados em uma escala diagramática são determinados por análise digital de imagens, o uso da escala leva a uma melhor precisão e confiabilidade dos avaliadores nas estimativas de severidade de doenças (Bock *et al.*, 2010; Bock *et al.*, 2016).

O uso de escalas diagramáticas permite ao avaliador situar sua estimativa num intervalo menor, compreendido entre dois dos níveis representados por seus diagramas (Amorim, 1995). Dessa forma, as escalas contribuem para a redução do erro na estimativa visual da severidade de doenças. Portanto, são cruciais para o sucesso no manejo integrado de doenças, sendo ferramentas valiosas para a epidemiologia e o controle de doenças de plantas (Buffara *et al.*, 2014). As escalas devem ser simples, aplicáveis em diferentes condições e ter intervalos suficientes para representar os diferentes níveis de severidade de uma determinada doença. Na elaboração de uma escala diagramática, os níveis mínimo e máximo de severidade da doença observados no campo devem ser representados na escala, bem como os sintomas típicos da enfermidade retratados mais próximos possíveis da realidade (Campbell & Madden, 1990). Dessa forma, a validação da escala diagramática é fundamental para determinar se a obtenção da estimativa de severidade da doença respeita os critérios da acurácia, precisão e reprodutibilidade (Nutter *et al.*, 1991).

Escalas diagramáticas e descritivas têm sido desenvolvidas para a quantificação da severidade de doenças em eucalipto. Dentre elas, destacam-

se a escala diagramática de severidade da mancha foliar causada por *Quambalaria eucalypti* (Andrade *et al.*, 2005), a escala de notas para avaliação da resistência à ferrugem do eucalipto (Junghans *et al.*, 2003), muito empregada em programas de melhoramento genético para avaliação de clones resistentes e suscetíveis à doença, a escala diagramática para quantificação da severidade de manchas em folhas de *Eucalyptus globulus* causadas por *Teratosphaeria nubilosa* (Passador *et al.*, 2013), a escala diagramática para a quantificação da severidade da mancha de *Cylindrocladium* em eucalipto (Damasceno *et al.*, 2014), e a escala diagramática para avaliar a severidade do oídio em eucalipto (Valeriano *et al.*, 2015).

Embora muitas escalas foram propostas para avaliar a severidade das doenças em eucalipto, até o presente momento não existe uma escala diagramática que possa ser utilizada para a quantificação da seca-de-ponteiros. O que impossibilita precisar o dano real causado pela enfermidade às plantas, em programas para o desenvolvimento de genótipos com resistência à doença, ou, para a escolha da melhor medida de controle usada pelos produtores. Atualmente, a estimativa da severidade da doença se baseia na observação visual sem o uso de métodos acurados, precisos e reproduzíveis, o que torna subjetiva a avaliação, podendo acarretar em erros na mensuração da severidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Elaboração da escala diagramática para a seca-de-ponteiros

As imagens das árvores com incidência da seca-de-ponteiros foram obtidas no Horto Florestal Cerro, uma área de reflorestamento com 202 hectares, dentro de um talhão de 4 hectares com um ano de idade, localizado no município de Eldorado do Sul, estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Figura 1). A confirmação do diagnóstico da doença foi realizada por meio de identificação molecular realizada no Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, conforme estudo anterior de Arriel *et al.* (2014). Para a quantificação dos níveis de severidade, 80 imagens foram obtidas de plantas de um clone de *Eucalyptus urophylla* x (*E. camaldulensis* x *E. grandis*), sendo escolhido este material genético por ser suscetível à doença e apresentar os níveis mínimos e máximos de severidade. As imagens das plantas foram obtidas a 4 metros de distância sob fundo branco com câmera digital Canon® SX50 com padrão de resolução de 300 dpi.

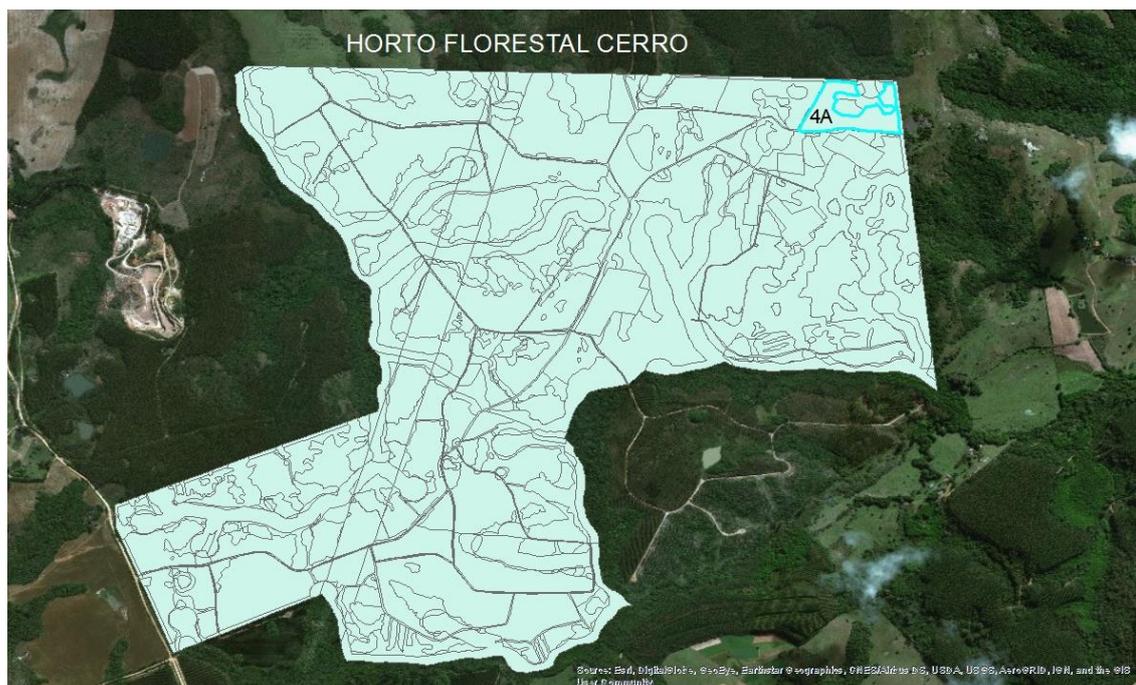


FIGURA 1. Horto Florestal Cerro, talhão 4A, Eldorado do Sul/RS, Coordenadas: -30.11852, -51.52137, local de obtenção das 80 imagens das plantas com incidência da seca-de-ponteiros do eucalipto.

As imagens digitalizadas foram transferidas para um microcomputador e processadas no programa CorelDRAW® versão 2017, no qual toda a área necrosada de folhas e ramos, constituindo o tecido doente, recebeu a cor ouro (R:204, G:153, B:51) e os ramos finos e folhas novas, constituindo o tecido sadio, receberam a cor verde (R:0, G:255, B:0). O caule e os ramos maiores do que 6 mm, menos afetada pela doença, receberam a cor marrom (R:255, G:0, B:0). Estes ajustes na tipificação das cores foram necessários pela falta de nitidez entre tecido saudável e tecido doente, principalmente nos tecidos jovens e tenros da planta onde a variação de coloração é intensa. Além disso, por vezes, o tecido doente assemelha-se ao tecido sadio, muito em decorrência pela falta de incidência de luz nas imagens. Este aprimoramento da distinção entre as matizes de cores dos tecidos sadios e infectados proporciona medições mais precisas da severidade da doença (Bock *et al.*, 2009).



FIGURA 2. Imagem de um clone de *Eucalyptus urophylla* x (*E. camaldulensis* x *E. grandis*), com um ano de idade apresentando seca-de-ponteiros causada por *Erwinia psidii*.

As imagens ajustadas foram calibradas no programa QUANT[®] (Vale *et al.*, 2003), através do objeto de referência de 20 cm para a calibração do seu tamanho no Quant. Posteriormente, foram amostradas as coordenadas das variáveis RGB (do inglês red, green, blue) dos pixels (Tabela 1) dos tecidos sadios e doentes, fundo da imagem, caule e ramos maiores que 6 mm. Para encontrar a melhor função que discrimina o conjunto de variáveis supramencionadas, foi utilizado a análise discriminante no programa MINITAB[®] versão 14 (Minitab Inc., State College, PA, USA). Depois de 10 tentativas, obteve-se a melhor função discriminante que foi utilizada no programa QUANT[®]

para a determinação automática da severidade real da doença nas 80 imagens, baseado na proporção de tecido vegetal afetado.



FIGURA 3. A: imagem de um clone de *Eucalyptus urophylla* x (*E. camaldulensis* x *E. grandis*), com um ano de idade apresentando seca-de-ponteiros causada por *Erwinia psidii*. B: a mesma imagem editada no programa CorelDRAW® e processada no programa Quant, apresentando o tecido sadio (cor verde) e o tecido doente (cor ouro).

A partir dos níveis mínimos e máximos da severidade detectada no dossel das plantas analisadas, foram estabelecidos os níveis intermediários da doença para compor a escala diagramática, considerando os valores de severidade da doença observados com maior frequência. Uma escala diagramática com níveis de severidade de 1, 3, 5, 10, 15, 30, 50 e 100% foi proposta neste estudo (Figura 4). Após estabelecidos os níveis de severidade da doença a serem representados na escala, foram produzidos 8 diagramas ou desenhos

característicos de plantas de eucalipto contendo sintomas típicos da doença em diferentes níveis para a escala, de maneira a retratar os sintomas observados no campo. Os diagramas foram vetorizados no programa Corel Draw 2019[®] utilizando um desenho de uma árvore padrão como base. As lesões foram adicionadas manualmente a cada diagrama, com formas e padrões espaciais idênticos às condições reais, de modo a chegar ao valor da severidade selecionado.

TABELA 1. Coordenadas das variáveis R, G, B (do inglês red, green, blue) e constantes para o tecido sadio, tecido doente, fundo e caule empregados para a função discriminante.

	R	G	B	CONSTANTE
SADIO	0,089	0,036	-0,109	-3,058
DOENTE	0,289	0,034	-0,149	-23,766
FUNDO	-0,125	0,025	0,767	-71,727
CAULE	0,736	-0,010	-0,848	-93,874

3.2 Validação da escala diagramática para a seca-de-ponteiros

Para a validação da escala, 20 avaliadores com experiência no setor de reflorestamento com eucalipto, estimaram a severidade da doença a partir das 80 imagens das plantas (Figura 3B), que foram exibidas individualmente em programa PowerPoint[®], em uma sala onde estavam todos os avaliadores reunidos. A projeção de cada imagem foi realizada em uma tela de 55 polegadas durante 40 segundos. Os avaliadores estavam dispostos a uma distância entre 3 a 6 metros da projeção da imagem. O ambiente de avaliação foi mantido escuro durante o processo.

A severidade real foi predeterminada para as 80 imagens, porém, os valores eram desconhecidos pelos avaliadores. Antes do início das avaliações,

os 20 avaliadores foram instruídos para reconhecer os sintomas da seca-de-ponteiros, para atribuir um percentual de severidade de 0 a 100%. O processo de validação da escala foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, os avaliadores fizeram as estimativas da severidade da doença a partir das imagens das 40 plantas com sintomas da doença, sem a utilização da escala diagramática. Na segunda etapa, os mesmos avaliadores analisaram outras 40 imagens, porém, com a utilização da escala desenvolvida. Em adição, receberam instruções para usar a escala ao estimar a severidade para a porcentagem mais próxima, ou seja, utilizando os valores dos diagramas como referência e realizando-se interpolação para os níveis de severidade da doença.

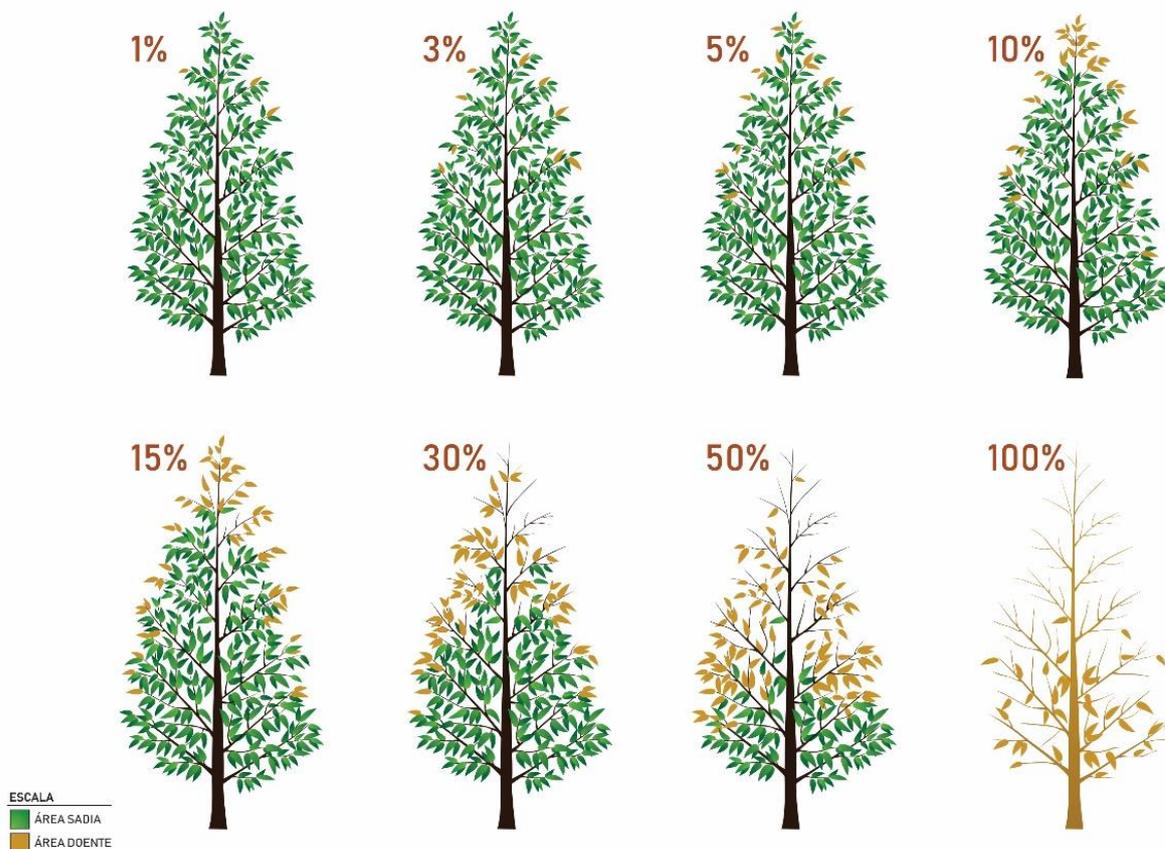


FIGURA 4. Escala diagramática desenvolvida para quantificar a severidade da seca-de-ponteiros do eucalipto. Os números acima de cada imagem representam a porcentagem real da área afetada pela doença.

3.3 Análises estatísticas

A reprodutibilidade das estimativas de severidade foi determinada pelos valores do coeficiente de determinação (R^2) dos diferentes avaliadores combinados aos pares, com e sem o uso da escala desenvolvida (Campbell & Madden, 1990; Nutter Júnior & Schultz, 1995; Nutter Jr. *et al.*, 1993; Correia *et al.*, 2017). A reprodutibilidade é uma medida que indica a confiabilidade das estimativas quando ocorre uma pequena variação pelos diferentes avaliadores.

Para a determinação da acurácia e precisão foi utilizada a análise de correlação concordante de Lin (Lin, 1989), utilizando o programa SAS 9.0® (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Para saber se houve ou não melhoria na acurácia, precisão e reprodutibilidade das estimativas de severidade da doença com o uso da escala diagramática desenvolvida, foi realizada análise estatística com as variáveis obtidas para a validação, através do teste de equivalência (Bardsley & Ngugi, 2012), utilizando o programa SAS 9.0®. Para cada uma das variáveis (C_b , u , v , r e ρ) foi calculada a diferença dos valores de cada variável (com - sem escala) para cada avaliador e depois foi usado o teste de equivalência para calcular o intervalo de confiança (IC) a 95% de probabilidade para cada variável por “bootstrapping” usando o método do percentil (Yadav *et al.*, 2012; Correia *et al.*, 2017). Se o IC para uma determinada variável não incluiu o valor zero, indicou que a diferença foi significativa ($P = 0,05$), ou seja, com o uso da escala diagramática houve melhoria significativa para determinada variável.

O coeficiente de correlação concordante de Lin (ρ) avalia o ajuste relacionado à linha de concordância, sendo o mais apropriado parâmetro de avaliação desse tipo de experimento, pois combina medidas de acurácia e precisão. O fator de correção do desvio (C_b) mede o quanto a linha de melhor ajuste se desvia da linha de 45°, sendo uma medida de desvio ou precisão. O coeficiente de correlação (r) mede a precisão da linha de melhor ajuste. O parâmetro deslocamento de escala (u) mede a diferença de inclinação entre a linha de melhor ajuste e a linha de 45°, enquanto o deslocamento de posição (u) mede a diferença na altura das duas linhas. Para saber se os avaliadores tenderam a superestimar ou subestimar os valores de severidade sem e com o uso da escala diagramática, foram observados os valores de u da análise de correlação concordante de Lin. Se o avaliador apresentou valor de u maior que 0 (positivo), indicou que o avaliador superestimou a severidade da doença e se um avaliador apresentou valor de u menor que 0 (negativo), indicou que o avaliador subestimou a severidade da doença (Capucho *et al.*, 2011).

4 RESULTADOS

Conforme observado na Figura 5, a severidade da doença mais frequentemente encontrada nas imagens obtidas foi entre 0,5 a 16,5%, o que corresponde a 69% das árvores amostradas.

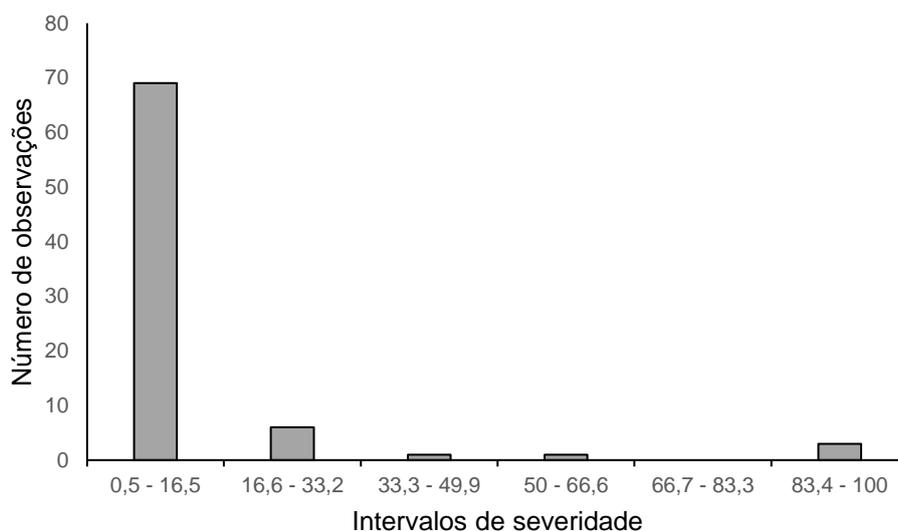


FIGURA 5. Frequência dos intervalos de classe da severidade da seca-de-ponteiros causada por *Erwinia psidii* em *Eucalyptus urophylla* x (*E. camaldulensis* x *E. grandis*), obtidas pelo programa Quant®.

Considerando a frequência dos valores de severidade nas plantas amostradas, os diagramas da escala foram mais concentrados até o nível de 15%, no qual a severidade foi mais frequente, com aproximadamente 70% dos valores encontrados. De acordo com Bock *et al.* (2010), nesta faixa a superestimação é geralmente mais comum. Conforme as Figuras 6 e 7,

baseadas nas análises de regressões lineares e estatísticas de Lin, percebe-se que as avaliações estavam mais próximas do real quando foi utilizada a escala diagramática proposta.

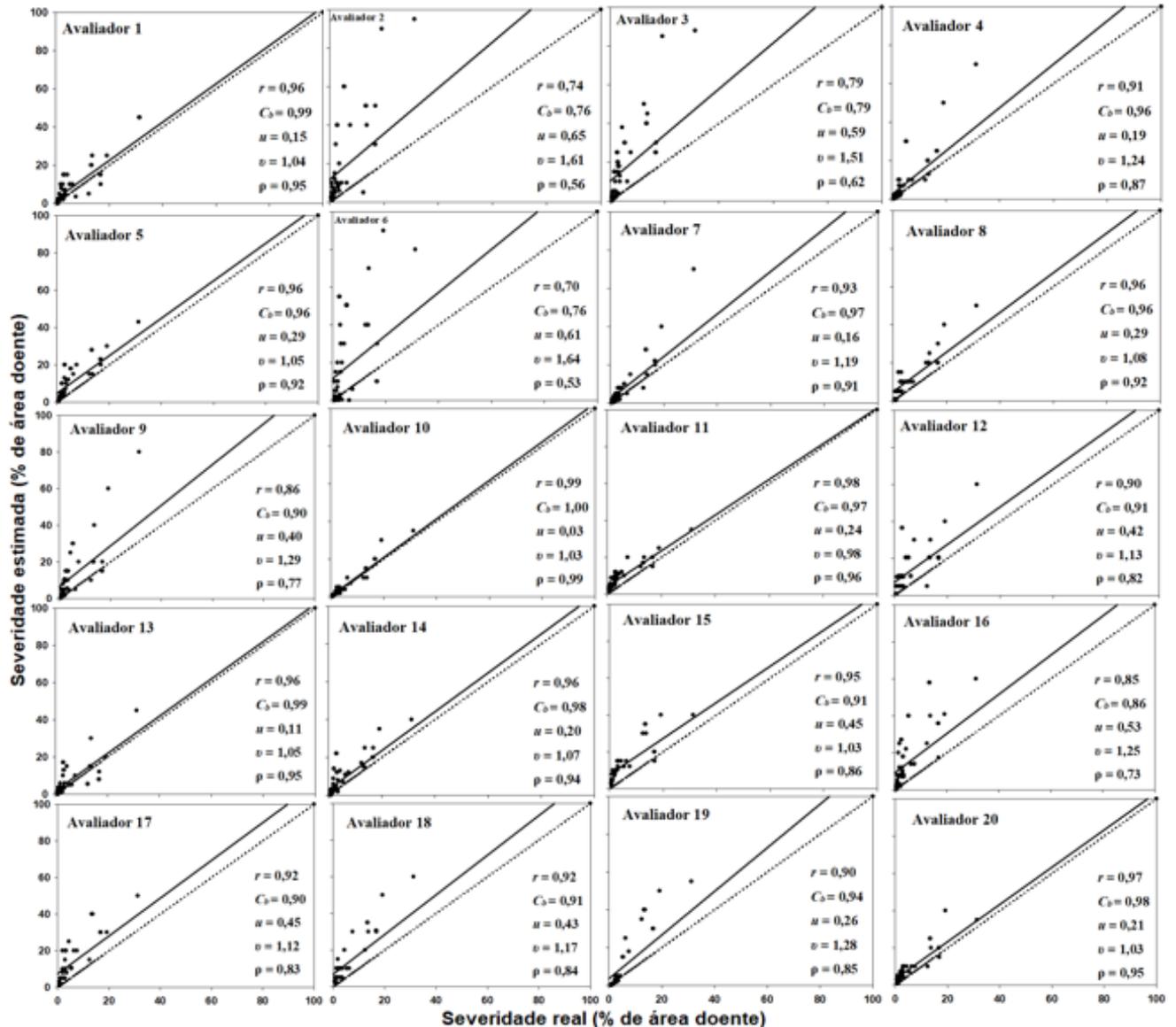


FIGURA 6. Severidade estimada *versus* real da seca-de-ponteiros do eucalipto para 20 avaliadores sem o uso da escala diagramática desenvolvida. A linha pontilhada é a de concordância, representando perfeita concordância entre o valor real e o estimado (inclinação de 1, intercepto de 0). A precisão é determinada com o coeficiente de correlação concordante de Lin (ρ), calculado como o produto do coeficiente de correlação (r) e o fator de correção do desvio (C_b). C_b é uma função do deslocamento da posição (u) e do deslocamento de escala (v), indicando altura e inclinação da linha, respectivamente. Os parâmetros das estatísticas de Lin estão mostrados na Tabela 2.

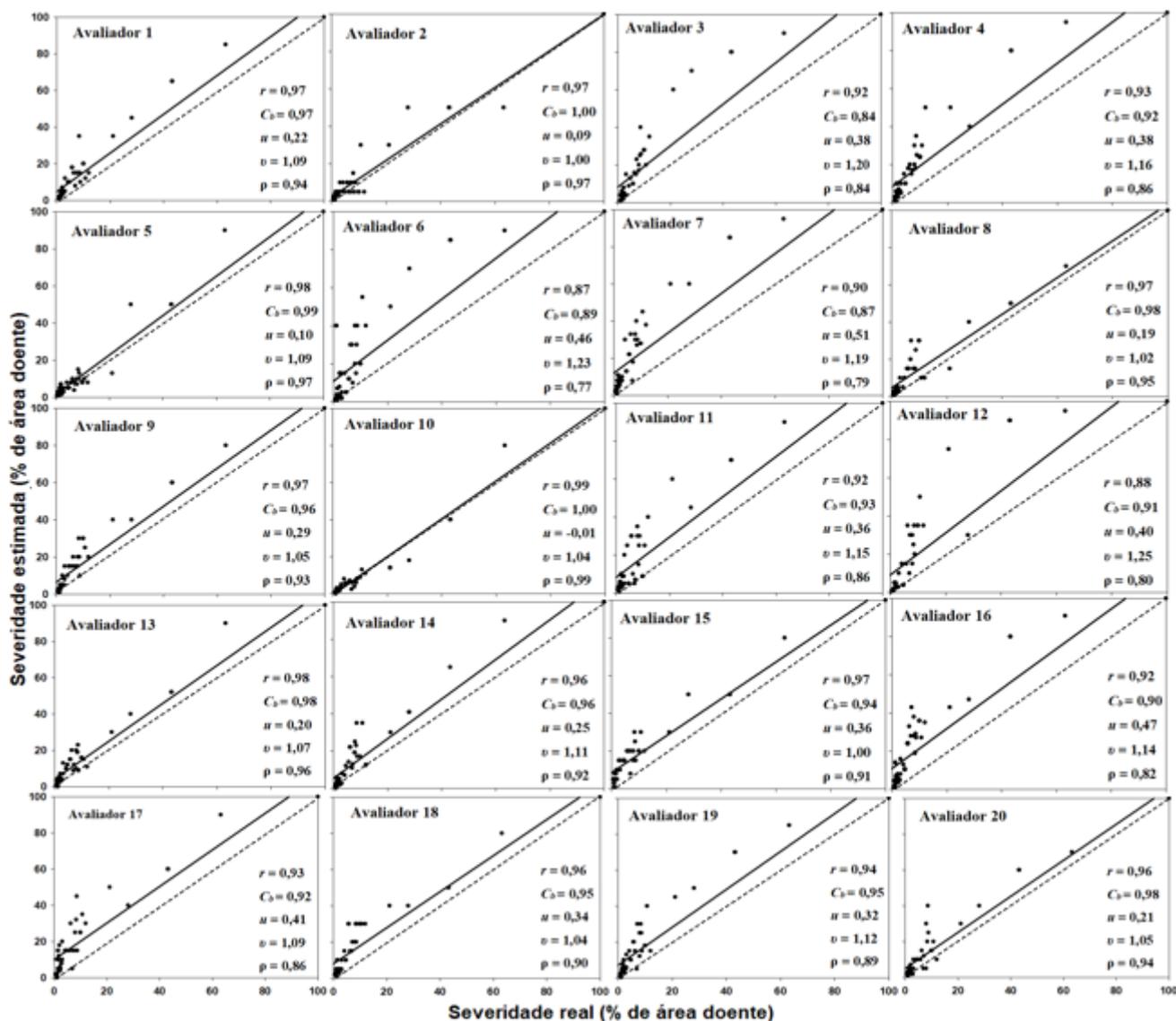


FIGURA 7. Severidade estimada *versus* real da seca-de-ponteiros do eucalipto para 20 avaliadores com o uso da escala diagramática desenvolvida. A linha pontilhada é a linha de concordância, representando perfeita concordância entre o valor real e o estimado (inclinação de 1, intercepto de 0). A precisão é determinada com o coeficiente de correlação concordante de Lin (ρ), calculado como o produto do coeficiente de correlação (r) e o fator de correção do desvio (C_b). C_b é uma função do deslocamento da posição (u) e do deslocamento de escala (v), indicando altura e inclinação da linha, respectivamente. Os parâmetros das estatísticas de Lin estão mostrados na Tabela 2.

Quando as avaliações foram realizadas sem o uso da escala diagramática, houve uma superestimativa média de 7,2% e uma subestimativa média de -0,9% em relação ao valor real. Com o uso da escala diagramática, houve uma superestimativa média de 8,6% e uma subestimativa média de -1,6% (Figura 6). Os valores residuais para avaliações sem a escala apresentaram amplitude de -8,8% e 70,8%. Quando a escala diagramática proposta foi empregada, a amplitude dos valores residuais foi de -13,3% e 53,9%.

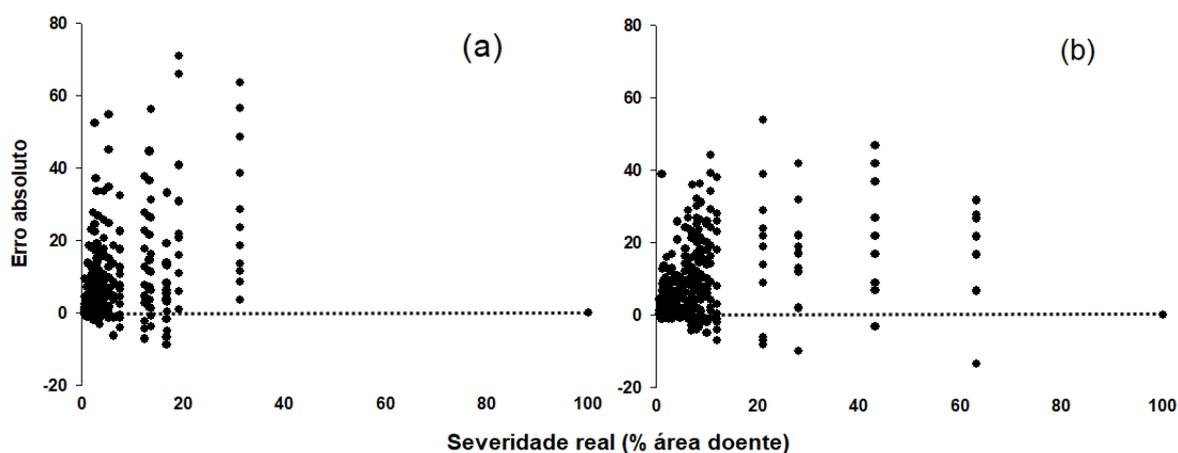


FIGURA 8. Distribuição dos resíduos (severidade estimada – severidade real) das estimativas da seca-de-ponteiros do eucalipto causada por *Erwinia psidii* obtidas de 20 avaliadores sem a escala diagramática (a) e com a escala diagramática desenvolvida (b).

A validação da escala baseada no conjunto de cálculos que constituem as estatísticas de Lin apresentaram os seguintes resultados: verificou-se que o coeficiente de correlação concordante de Lin, parâmetro que melhor prediz a precisão das estimativas, mostrou uma melhoria significativa com o valor de $\rho = 0,84$ sem a escala e $\rho = 0,89$ com a escala. Da mesma forma, houve diferença significativa no coeficiente de correlação que passou de $r = 0,91$

para $r = 0,94$, respectivamente sem e com a escala. O coeficiente de correlação é outro parâmetro de precisão (Tabela 2).

TABELA 2. Parâmetros e estatísticas da análise de Lin entre a severidade estimada e real da seca-de-ponteiros causada por *Erwinia psidii* em eucalipto, realizadas por 20 avaliadores com e sem a escala diagramática desenvolvida.

Médias			
Estatísticas de Lin	Sem a escala	Com a escala	IC 95% ^g de diferença entre as médias
Deslocamento de escala (u) ^b	1,19	1,10	-0,163 a -0,013
Mudança de localização (u) ^c	0,33	0,30	-0,116 a 0,037
Coeficiente de correlação (r) ^d	0,91	0,94	0,010 a 0,069
Fator de correção do desvio (C_b) ^e	0,92	0,95	-0,003 a 0,056
Coeficiente concordante de Lin (ρ) ^f	0,84	0,89	0,006 a 0,106

^b Diferença na inclinação das duas linhas (linha ajustada da regressão com a linha concordante). Inclinações iguais significa valor de $u = 1$.

^c Diferença de altura entre a linha ajustada da regressão em relação a linha concordante. Alturas iguais significa valor de $u = 0$.

^d Coeficiente de correlação entre severidade estimada e severidade real mede a precisão (r).

^e Fator de correção do desvio (C_b) mede o quanto a linha de melhor ajuste se desvia da linha de 45°. Nenhum desvio da linha 45° ocorre quando (C_b)=1. (C_b) é uma medida de acurácia.

^f Coeficiente de correlação concordante de Lin (ρ) que combina precisão e acurácia para medir a concordância com os valores reais.

^g Intervalos de confiança (ICs). Se os ICs incluem zero, então a diferença não é significativa ao nível de 5%. Números em negrito representam diferenças significativas.

Verificou-se uma melhoria significativa com o uso da escala diagramática para o deslocamento da escala (u), com valor de $u = 1,10$ com a escala e $u = 1,19$ sem a escala, conforme pode ser observado pelo avaliador 2 nas Figuras 6 e 7. O deslocamento de posição não foi significativamente diferente sem a escala ($u = 0,33$) e com a escala ($u = 0,30$), conforme pode ser observado pelo avaliador 17 nas Figuras 6 e 7. O fator de correção do desvio, que é formado pelos valores de u e u , não melhorou significativamente: $C_b = 0,92$ sem a escala e $C_b = 0,95$ com a escala (Tabela 2).

A reprodutibilidade da escala foi testada comparando o coeficiente de determinação (R^2) dos avaliadores aos pares, onde os valores de R^2 variaram de 0,51 a 0,97% com média de 0,81% para as avaliações sem a escala, e de 0,71 a 0,97% com média de 0,89% para as avaliações com a escala, evidenciando uma melhoria significativa na reprodutibilidade com o uso da escala (Tabela 3).

TABELA 3. Análise do coeficiente de determinação (R^2) entre a severidade estimada e a real da seca-de-ponteiros causada por *Erwinia psidii* em eucalipto, realizadas por 20 avaliadores combinados aos pares, com e sem a escala diagramática desenvolvida.

Média do coeficiente de determinação R^2 dos avaliadores combinados aos pares^a		
Estatística	Média (intervalo de confiança)	Diferença média (erro padrão) e Intervalo de Confiança da diferença
Sem escala	0,8136 (0,7983 a 0,8280)	
Com escala	0,8895 (0,8818 a 0,8970)	Diferença média ^b 0,0759 (0,0071); ICs 95% 0,0624 a 0,0898

^a Coeficiente de determinação médio das estimativas das avaliações combinando os avaliadores aos pares, com intervalos de confiança (ICs) baseados em 2000 amostras.

^b Diferença média entre cada avaliação, com erro padrão em parenteses (valor calculado), intervalos de confiança (ICs) baseado em 2000 amostras. Se o ICs inclui zero não existe diferença significativa.

Sem o emprego da escala, 75% das comparações pareadas tinham coeficiente de determinação (R^2) menor que 0,89, mas com o uso da escala desenvolvida apenas 43% das comparações pareadas tiveram R^2 menor que 0,89. Ainda, com o emprego da escala 57% das comparações pareadas tiveram R^2 maior que 0,9 e apenas 25% das comparações sem a escala proposta apresentaram R^2 maior que 0,9 (Figura 9).

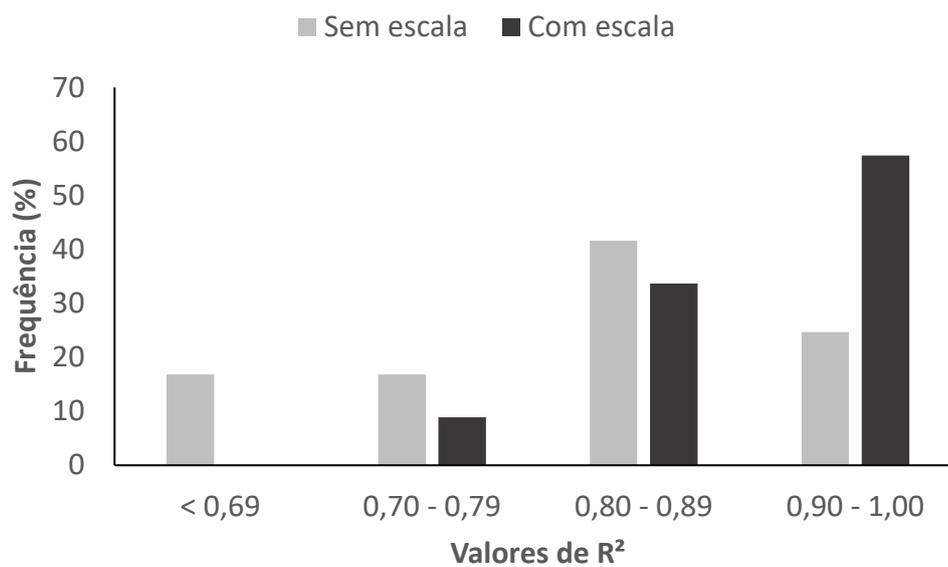


FIGURA 9. Confiabilidade entre as estimativas de severidade da seca-de-ponteiros do eucalipto causada por *Erwinia psidii*, analisando o coeficiente de determinação (R^2) dos 20 avaliadores combinados aos pares com e sem o uso da escala diagramática.

5 DISCUSSÃO

Este estudo trouxe a primeira escala diagramática elaborada e validada para a quantificação da seca-de-ponteiros do eucalipto, que poderá ser empregada para estimar a severidade da doença no patossistema *Erwinia psidii* x *Eucalyptus* spp. Além disso, é a primeira vez que uma escala diagramática foi elaborada para a quantificação da severidade de uma doença em plantas inteiras de eucalipto. Outras escalas desenvolvidas para o eucalipto foram baseadas apenas em doenças foliares (Andrade *et al.*, 2005; Passador *et al.*, 2013; Damasceno *et al.*, 2014; Valeriano *et al.*, 2015), o que torna laborioso e moroso a quantificação da severidade da doença em condições de campo.

Os avaliadores tiveram um desempenho razoável, pois suas estimativas foram no intervalo de $\pm 20\%$ dos valores reais de severidade, com e sem o uso da escala diagramática. Tomerlin & Howell (1988) utilizando o programa Distrain[®] para quantificar a severidade de doenças, classificaram como excelentes avaliadores aqueles cujos erros não excederam 5% e como bons avaliadores, aqueles cujos erros foram inferiores a 10%. Embora o emprego da escala não tenha reduzido os valores médios dos resíduos, houve uma redução na amplitude dos valores residuais. Stonehouse (1994) menciona que a presença de algum nível de erro absoluto nas medições pode

ser compensada por algumas vantagens pela escala diagramática, como rapidez e padronização.

A maioria dos erros de avaliação ocorre na faixa de 20 a 50% de severidade para avaliadores inexperientes (Angelotti *et al.*, 2008), e na faixa de 10 a 30% de severidade para avaliadores experientes (Andrade *et al.*, 2005). Resultados similares foram observados neste estudo realizado com avaliadores inexperientes e pouco experientes, os quais os maiores erros absolutos foram observados na faixa de 10 a 50% de severidade. Em níveis baixos de severidade (<10%) os avaliadores apresentaram estimativas com maior acurácia e precisão, estando de acordo com os resultados obtidos por Stonehouse (1994) e Andrade *et al.* (2005).

Os avaliadores tenderam a superestimar a severidade da seca-de-ponteiros do eucalipto, conforme pode ser observado pelos valores maiores que zero do deslocamento de posição (u), enquanto à subestimativa da severidade da doença foi pouco observada, seguindo uma tendência para a maioria dos estudos envolvendo a validação de escalas diagramáticas (Lima *et al.*, 2011; Capucho *et al.*, 2011; Del Ponte *et al.*, 2017).

Há vários fatores que afetam a acurácia e, ou, a precisão das estimativas, relacionados ao avaliador (por exemplo, capacidade inata, experiência, treinamento, concentração, preferência de valor) ou às características e padrões das lesões ou órgãos (Bock *et al.*, 2016). Neste aspecto, o grande número de pequenas folhas afetadas pode ter levado os avaliadores a superestimarem a severidade da doença. Geralmente, um grande número de pequenas lesões leva às superestimativas (Bock *et al.*, 2010; Schwanck & Del Ponte, 2014).

A validação da escala através dos parâmetros da análise estatística de Lin e do coeficiente de determinação produziram conclusões convergentes sobre o desempenho dos avaliadores para alguns parâmetros, como por exemplo, o coeficiente de determinação R^2 e os coeficientes de correlação (r) e correlação concordante de Lin (ρ). Observou-se que houve melhoria significativa no coeficiente de correlação (r) e também no coeficiente de determinação R^2 com o emprego da escala proposta, parâmetros que indicam melhoria na precisão das estimativas. Além disso, houve melhoria significativa no coeficiente de correlação concordante de Lin (ρ) quando a escala foi usada, aumentando a precisão e acurácia das estimativas da severidade da doença. Para 60% dos avaliadores houve aumento do coeficiente concordante (ρ) e para 70% dos avaliadores houve melhoria no coeficiente de correlação (r), quando utilizada a escala desenvolvida. Capucho *et al.* (2011) observaram uma melhoria do coeficiente concordante (ρ) em 90% dos avaliadores quando usada a escala diagramática.

A melhoria de precisão com o emprego de escalas diagramáticas também foi observada em outros estudos. Maciel *et al.* (2013) encontraram boa precisão com o uso da escala diagramática, analisando o coeficiente de determinação R^2 , que foi maior quando utilizado a escala desenvolvida para avaliação de brusone causado pelo fungo *Magnaporthe oryzae* em espiga de trigo (*Triticum aestivum*). Angelotti *et al.* (2008) e Buffara *et al.* (2014) também verificaram melhoria na precisão pela análise do coeficiente de determinação R^2 , nas escalas desenvolvidas para a ferrugem, causada pelo fungo *Phakopsora euvitis*, e o míldio, causado pelo fungo *Plasmopora viticola* em videira (*Vitis vinifera*), respectivamente.

Com respeito aos valores de deslocamento de posição (u) e mudança de escala (v), que formam o fator de correção C_b que é uma medida de desvio ou precisão, observou-se que o desvio constante (u) não melhorou significativamente com o emprego da escala. Contudo, observou-se uma melhoria significativa para o viés sistemático (v) com o uso da escala proposta. Considerando que os métodos de análise de concordância combinam as medidas de acurácia e precisão para avaliar o ajuste relacional à linha de concordância de 45° (Capucho *et al.*, 2011), verifica-se que houve melhoria na diferença de declive entre a linha de melhor ajuste e a linha de concordância de 45°. Em síntese, a escala diagramática desenvolvida reduziu o desvio sistemático, contudo não houve melhoria na diferença de altura entre a linha concordante e a linha de melhor ajuste, mostrando que o emprego da escala não reduziu o desvio constante. Capucho *et al.* (2011) verificaram uma redução do desvio constante (u) com o emprego da escala proposta para avaliação da ferrugem do café, como observado no presente estudo.

Houve melhoria significativa da confiabilidade entre avaliadores quando a escala diagramática proposta foi empregada, ou seja, as estimativas de severidade foram mais reproduzíveis com o uso da escala desenvolvida, com menor variação entre os diferentes avaliadores. Capucho *et al.* (2011) e Correia *et al.* (2017) também observaram ganhos na reprodutibilidade. Segundo os autores, as escalas desenvolvidas reduziram a variabilidade das estimativas, o que é especialmente útil quando múltiplos avaliadores estão envolvidos em trabalhos de campo na estimativa da severidade da doença. Em adição, é importante uma alta confiabilidade entre avaliadores em plantas

perenes produzidas em larga escala por longos períodos, como é o caso da cultura do eucalipto.

De maneira geral, a escala diagramática desenvolvida para avaliação da seca-de-ponteiros do eucalipto melhorou a precisão e a reprodutibilidade entre as estimativas, contudo não melhorou a acurácia dos avaliadores. Andrade *et al.* (2005) observaram maior precisão com a escala diagramática para a avaliação da mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*. Os avaliadores foram mais precisos que acurados, análogo ao observado nesse estudo e por Nutter Jr. *et al.* (1993). Como em níveis baixos de severidade (<10%) os avaliadores apresentaram estimativas com maior acurácia e precisão, possivelmente a maior frequência de plantas com baixa severidade reduziu o erro das estimativas na avaliação sem a escala (Figura 8). Assim, uma segunda etapa de validação da escala, com uma melhor uniformidade nos níveis de severidade das imagens projetadas para as avaliações sem e com a escala, deve ser realizada.

Neste contexto, a formação dos avaliadores para usar a escala pode reduzir ainda mais a subjetividade das estimativas melhorando seu desempenho (Nutter Júnior & Schultz, 1995) e aumentando a sua acurácia. Conforme Nunez *et al.* (2016), o uso de uma escala diagramática fornece velocidade e permite usuários padronizarem suas estimativas. Buffara *et al.* (2014) verificaram uma boa precisão e reprodutibilidade na escala diagramática desenvolvida para a quantificação da severidade do míldio, causado pelo fungo *Plasmopora vitícola* em videira (*Vitis vinífera*), fornecendo uma estimativa rápida da doença.

O emprego da escala diagramática desenvolvida poderá ser útil em avaliações da resistência genética entre clones por inoculação artificial da fitobactéria *Erwinia psidii* (Ferraz *et al.*, 2016), para avaliação de espécies (Caires *et al.*, 2019) ou ainda para testar a agressividade entre isolados do patógeno (Montoya-Estrada *et al.*, 2019). Especialmente, em inoculações realizadas em plantas com 6 meses de idade, estágio de desenvolvimento no qual geralmente iniciam os sintomas da seca-de-ponteiros do eucalipto no campo.

A escala diagramática desenvolvida para a quantificação da seca-de-ponteiros do eucalipto é pioneira para estimativa da severidade de uma doença em plantas desta cultura em nível de campo. Poderá ser muito útil para a avaliação de epidemias em diferentes materiais genéticos de eucalipto e para estimar possíveis perdas causadas pela enfermidade. Dentro da estratégia de manejo integrado da doença, esta escala será fundamental para a avaliação e recomendação de plantio de clones e espécies resistentes, em programas de melhoramento genético. Além disso, será importante para avaliar alternativas testadas para o controle da doença pelos produtores. O treinamento dos avaliadores para o uso da escala diagramática será fundamental para melhorar as estimativas dos valores reais de severidade, de forma precisa, confiável, rápida e padronizada.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e nas condições em que o trabalho foi realizado, é possível concluir que:

- A escala diagramática desenvolvida para avaliação da seca-de-ponteiros do eucalipto melhorou a precisão dos avaliadores, produzindo menor variação nas estimativas da severidade da doença;
- A escala proposta melhorou a reprodutibilidade e a confiabilidade entre as estimativas de severidade, apresentando pequena variação entre os diferentes avaliadores;
- A escala diagramática não melhorou a acurácia dos avaliadores.

7 REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. *et al.* *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. 357–366, 2006.
- ALFENAS, A. C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009.
- AMORIM, L. Avaliação de doenças. *In*: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 647-671.
- ANDRADE, G. *et al.* Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, p. 504–509, 2005.
- ANGELOTTI, F. *et al.* Diagrammatic scale for assessment of grapevine rust. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, n. 6, p. 439-443, 2008.
- ARRIEL, D. A. A. *et al.* Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. **Forest Pathology**, Oxford, v. 44, p. 255-265, 2014.
- BARDSLEY, S. J.; NGUGI, H. K. Reliability and accuracy of visual methods to quantify severity of foliar bacterial spot symptoms on peach and nectarine. **Plant Pathology**, Oxford, v. 62, n. 2, p. 460-474, 2013.
- BARNARD, A. M. L. *et al.* Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B**, London, v. 362, n. 1483, p. 1165–1183, 2007. DOI 10.1098/rstb.2007.2042.
- BEENKEN, L. *Austropuccinia*: a new genus name for the myrtle rust *Puccinia psidii* placed within the redefined family Sphaerophragmiaceae (Pucciniales). **Phytotaxa**, Auckland, v. 297, n. 1, p. 53-61, 2017.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996.

BOCK, C. H. *et al.* Automated image analysis of the severity of foliar citrus canker symptoms. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, n. 6, p. 660-665, 2009.

BOCK, C. H. *et al.* Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 29, p. 59–107, 2010.

BOCK, C. H.; CHIANG, K.-S.; DEL PONTE, E. M. Accuracy of plant specimen disease severity estimates: Concepts, history, methods, ramifications and challenges for the future. **CAB Reviews: perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources**, Wallingford, v. 11, n. 032, p. 1-21, 2016.

BUFFARA, C. R. S. *et al.* Elaboration and validation of a diagrammatic scale to assess downy mildew severity in grapevine. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, p. 1384-1391, 2014.

CAIRES, N. P. *et al.* Host range of *Erwinia psidii* and genetic resistance of *Eucalyptus* and *Corymbia* species to this pathogen. **Forest Pathology**, Oxford, v. 49, n. 4, [art.] e12527, 2019. DOI 10.1111/efp.12527.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Wiley Interscience, 1990.

CAPUCHO, A. S. *et al.* Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea Arabica* and *C. canphora*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, p. 1144-1150, 2011.

CORREIA, K. C. *et al.* Development and evaluation of a standard area diagram set for the severity of Phomopsis leaf blight on eggplant. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 149, n. 2, p. 269-276, 2017. DOI 10.1007/s10658-017-1184-y.

COUTINHO, T. A. *et al.* A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. **Australasian Plant Pathology**, Berlin, v. 40, n. 1, p. 55-60, 2011.

DAMASCENO, V. F. F.; FURTADO, E. L.; FERREIRA FILHO, P. J. Comparação de dois métodos de elaboração e validação de escala diagramática para a quantificação da severidade da mancha de *Cylindrocladium* em eucalipto. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 40, n. 3, p. 248-255, 2014.

DEL PONTE, E. M. *et al.* Standard area diagrams for aiding severity estimation: scientometrics, pathosystems and methodological trends in the last 25 years. **Phytopathology**, St. Paul, v. 107, n. 10, p. 1161-1174, 2017.

FERRAZ, H. G. M. *et al.* Methods of inoculation and evaluation of *Erwinia psidii* in eucalypt. **Forest Pathology**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 240–247, 2016.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, MG: SIF, 1989.

FONSECA, N. R. *et al.* An efficient inoculation method of *Ralstonia solanacearum* to test wilt resistance in *Eucalyptus* spp. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 41, n. 1, p. 42-47, 2016.

IBÁ - INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório Ibá 2017**. São Paulo, 2017. Disponível em: http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf. Acesso em: 8 out. 2017.

JUNGHANS, D. T.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, p. 261-265, 2003.

KRANZ, J. Measuring plant disease. *In*: KRANZ, J.; ROTEM, J. **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. p. 35-50.

LIN, L. I. Aconcordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. **Biometrics**, Washington, DC, v. 45, p. 255-268, 1989.

LIMA, G. S. A. *et al.* Development and validation of a standard area diagram set for assessment of alternaria spot on the cladodes of the prickly pear cactus. **Journal of Plant Pathology**, Cham, v. 93, n. 3, p. 691-695, 2011.

MACIEL, J. L. N. *et al.* Diagrammatic scale for assessment of blast on wheat spikes. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 39, p. 162–166, 2013.

MAFIA, R. G. *et al.* Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 4, p. 817-824, 2011.

MONTOYA-ESTRADA, C. N. *et al.* Genetic diversity and aggressiveness of *Erwinia psidii* on *Eucalyptus* spp. in Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 68, p. 31-41, 2019.

NUNEZ, A. M. P. *et al.* Development and validation of a diagrammatic scale to assess the severity of black rot of crucifers in kale. **Journal of Phytopathology**, Oxford, v. 165, n. 3, p. 195-203, 2017. DOI 10.1111/jph.12550.

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

NUTTER JR., F. W. *et al.* Accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, p. 806-812, 1993.

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, p. 174-184, 1995.

PASSADOR, M. M. *et al.* 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. 521-528, 2013.

POMINI, A. M. *et al.* Acyl-homoserine lactones from *Erwinia psidii* R. IBSBF 435T, a guava phytopathogen (*Psidium guajava* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 53, n. 16, p. 6262-6265, 2005.

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

SCHWANCK, A. A.; DEL PONTE, E. M. Accuracy and reliability of severity estimates using linear or logarithmic disease diagram sets in true colour or black and white: a study case for rice brown spot. **Journal of Phytopathology**, Oxford, v. 162, p. 670-682, 2014.

STONEHOUSE, J. Assessment of Andean bean diseases using visual keys. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 519-527, 1994.

TEIXEIRA, A. C. O.; MARQUES, A. S. A.; FERREIRA, M. A. S. V. Low genetic diversity among pathogenic strains of *Erwinia psidii* from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 678-684, 2009.

TOMERLIN, J. R.; HOWELL, T. A. Distrain: a computer program for training people to estimate disease severity on cereal leaves. **Plant Disease**, St. Paul, v. 72, p. 455-459, 1988.

UESUGI, C. H. *et al.* Ocorrência de *Erwinia psidii* em goiabeira no Distrito Federal. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 118, 2001. Trabalho apresentado no XXIV Congresso Paulista de Fitopatologia, realizado em Piracicaba, 2001.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. A software plant disease severity assessment. *In*: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8., 2003, Christchurch. **Anais [...]**. Christchurch: New Zealand, 2003. p.105.

VALE, F. X. R. **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfil, 2004.

VALERIANO, R. *et al.* Escala diagramática e reação diferencial de clones para oídio do eucalipto. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 43, n. 105, [p. 1-10], 2015.

YADAV, N. V. S. *et al.* Development and validation of standard área diagrams to a id assessment of pecan scab symptoms on fruit. **Plant Pathology**, Oxford, v. 62, n. 2, p. 325-335, 2013.

ZAUZA, E. A. V. *et al.* Wind dispersal of *Puccinia psidii* urediniospores and progress of eucalypt rust. **Forest Pathology**, Oxford, v. 45, p. 102-110, 2015.