

CAMILA RIBEIRO COSTA

**SOBREVIVÊNCIA E HERANÇA DA RESISTÊNCIA A *Erwinia psidii* EM
EM EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Acelino Couto Alfenas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C837s
2021
Costa, Camila Ribeiro, 1994-
Sobrevivência e herança da resistência a *Erwinia psidii* em
Eucalyptus spp. / Camila Ribeiro Costa. - Viçosa, MG, 2021.
1 dissertação eletrônica (67 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Acelino Couto Alfenas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Fitopatologia, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.746>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Eucalipto - Melhoramento genético. 2. Eucalipto - Resistência a
doenças e pragas - Aspectos genéticos. 3. Herança poligênica. 4.
Erwinia psidii. I. Alfenas, Acelino Couto, 1950-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia. III. Título.

CDD 22. ed. 631.52

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

CAMILA RIBEIRO COSTA

**SOBREVIVÊNCIA E HERANÇA DA RESISTÊNCIA A *Erwinia psidii* EM
EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de agosto de 2021.

Assentimento:



Camila Ribeiro Costa
Autora



Acelino Couto Alfenas
Orientador

AGRADECIMENTOS

Toda minha jornada acadêmica só foi possível porque tive à minha frente Deus e Nossa Senhora, que me amparam, me guiaram, capacitaram e me encorajaram para enfrentar os medos e os desafios. Sou grata ao bondoso e infinito amor de Deus e à Sua misericórdia.

A caminhada até aqui teve a participação de muitas pessoas que, sem elas a jornada não seria possível. Agradeço aos meus pais, Daurio e Simone, por todo suporte, amor, carinho, orações, apoio e por sempre acreditarem em mim. Às minhas irmãs Bárbara e Amanda, pela amizade e parceria, por sempre terem palavras de conforto nos momentos de dificuldade e por todo amor e carinho. Ao meu marido Samuel, minha fonte de inspiração e admiração pela pessoa e profissional que é, pelo amor, companheirismo e por sempre me incentivar a ser a minha melhor versão. O apoio emocional de vocês fez toda a diferença e sou muito grata por tudo que fizeram por mim.

Um agradecimento muito especial aos amigos do trabalho que me ajudaram com os experimentos em especial a Ana, Elenice, Fernando, Mara, Marcia, Samuel e William que foram essenciais em todas as coletas de dados e processamento das amostras.

Ao meu orientador Acelino Alfenas, pelas contribuições grandiosas no decorrer da minha caminhada com a pesquisa, pela paciência, dedicação e ensinamentos durante minha orientação desde a graduação. Foi um privilégio ter sido orientada por um dos maiores nomes da Patologia Florestal no Brasil, que não me ensinou somente o conhecimento técnico necessário para atuar na Fitopatologia, mas também ensina seus alunos a como serem os melhores profissionais, saímos do laboratório treinados para os desafios que nos aguardam. Muito obrigada, Professor!

Aos meus coorientadores Lúcio Mauro Guimarães e Rafael Alfenas, por toda contribuição, boa vontade e disponibilidade sempre que precisei. Em especial, agradeço ao Lúcio que foi muito importante em todas as etapas da pesquisa, me direcionando para onde ir e foi luz nos momentos de escuridão e desespero.

Ao Rodrigo Alves, pelas contribuições e análises de dados para o aperfeiçoamento do trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitopatologia e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de realização do mestrado. Aos professores que fizeram parte da minha trajetória.

À Clonar Resistência a Doenças Florestais e seus funcionários, por todo suporte oferecido no desenvolvimento do trabalho.

Ao Laboratório de Patologia Florestal, por todo suporte e infraestrutura necessários para o desenvolvimento de pesquisa de qualidade. À Márcia Brandão, pela amizade, dedicação e atenção com todos do laboratório. À Mara e Elenice, pelo companheirismo, amizade e acolhimento durante os anos de

trabalho, pelas palavras amigas e por tornarem o dia a dia mais leve. E a todos os amigos e colegas de trabalho que são como uma família e estavam sempre dispostos a ajudar. Vocês fazem a diferença.

Agradeço à Claudia Montoya-Estrada que foi quem plantou a sementinha em mim pela paixão com a pesquisa e em especial, foi quem me introduziu ao trabalho com *Erwinia psidii*. Obrigada pela paciência e acolhimento enquanto me orientava na Iniciação Científica. Seu amor e dedicação ao trabalho são grandes exemplos para mim e tudo que aprendi com você foi essencial na minha formação como pesquisadora. Agradeço a Deus pela sua amizade.

À CMPC Celulose Riograndense pela parceria e realização dos cruzamentos para obtenção das sementes utilizadas neste estudo.

Agradeço também a Ana Luiza Rati, minha amiga e irmã de coração, que foi meu alento e meu colo nos momentos mais difíceis e me proporcionou os momentos mais felizes durante a pandemia. Agradeço imensamente a Deus por ter me dado a oportunidade de conviver com você.

Aos amigos de vida e meus familiares, pelo companheirismo, mesmo que de longe, nesse momento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e concessão da bolsa.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

COSTA, Camila Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2021. **Sobrevivência e herança da resistência a *Erwinia psidii* em eucalipto**. Orientador: Acelino Couto Alfenas.

Erwinia psidii é, atualmente, um dos principais patógenos da eucaliptocultura no Brasil. Embora seu manejo tem sido baseado no plantio de clones resistentes, pouco se sabe a respeito do período de sobrevivência de *E. psidii* e o modelo de herança da resistência de eucalipto à doença. Neste estudo, avaliou-se a translocação e a sobrevivência de *E. psidii* em diferentes partes de mudas e minicepas de *Corymbia torelliana* e *Eucalyptus* spp., inoculadas e mantidas por até quatro anos, bem como a herança da resistência em sete famílias de irmãos-completos provenientes de cruzamentos interespecíficos controlados. Os resultados deste trabalho demonstram que *E. psidii* apresenta movimento principalmente basipetal até as raízes, onde sobrevive por até quatro anos, tanto em minicepas suscetíveis quanto em minicepas resistentes. A bactéria também foi detectada no caule, porém em menor frequência e em uma amostra de broto. Seis modelos baseados na hipótese de herança genética monogênica ou controlada por dois ou três genes de efeito maior foram testados, entretanto, nenhum explicou totalmente os padrões de segregação fenotípica observados para todas as famílias estudadas. Dentre os parâmetros genéticos estimados encontramos uma herdabilidade moderada ($0,15 < h_a^2 < 0,50$), o que reforça a hipótese de múltiplos genes envolvidos na resistência. Assim, os resultados deste estudo indicam que a herança da resistência de *Eucalyptus* spp. a *E. psidii* é complexa e dependente de múltiplos genes de efeitos aditivos e não-aditivos.

Palavras-chave: Seca de ponteiros. Eucalipto. Resistência genética. Melhoramento genético. Detecção de bactéria. Clonagem.

ABSTRACT

COSTA, Camila Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2021. **Survival and inheritance of resistance to *Erwinia psidii* in eucalyptus**. Adviser: Acelino Couto Alfenas.

Erwinia psidii is currently one of the main pathogens of eucalyptus culture in Brazil. Although its management has been based on planting resistant clones, little is known about the survival period of *E. psidii* and the inheritance model of eucalyptus resistance to the disease. In this study, the translocation and survival of *E. psidii* in different parts of seedlings and ministumps of *Corymbia torelliana* and *Eucalyptus* spp., inoculated and maintained for up to four years, as well as the inheritance of resistance in seven families of complete siblings, were evaluated from controlled interspecific crosses. The results of this work demonstrate that *E. psidii* presents mainly basipetal movement up to the roots, where it survives for up to four years, both in susceptible and resistant ministumps. The bacteria was also detected in the stem, but less frequently and in a sprout sample. Six models based on the hypothesis of monogenic or controlled genetic inheritance by two or three genes of greater effect were tested, however, none fully explained the patterns of phenotypic segregation observed for all families studied. Among the estimated genetic parameters we found a moderate heritability ($0,15 < h_a^2 < 0,50$), which reinforces the hypothesis of multiple genes involved in resistance. Thus, the results of this study indicate that the inheritance of resistance in *Eucalyptus* spp. *E. psidii* is complex and dependent on multiple genes for additive and non-additive effects.

Keywords: Dieback. Eucalyptus. Genetic resistance. Genetic breeding. Bacteria detection. Cloning.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	8
CAPÍTULO 1 - TRANSLOCAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE <i>Erwinia psidii</i> EM MUDAS E MINICEPAS DE EUCALIPTO.....	12
RESUMO	13
INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
Inoculação de <i>Erwinia psidii</i> via parte aérea e sistema radicular de mudas de eucalipto	16
Inoculação de <i>Erwinia psidii</i> via parte aérea e formação de minicepas de <i>Corymbia torelliana</i> e <i>Eucalyptus</i> spp.	17
Detecção de <i>Erwinia psidii</i> em tecido vegetal.....	18
Translocação e sobrevivência de <i>Erwinia psidii</i> em mudas e minicepas de eucalipto.....	20
RESULTADOS	21
Translocação e sobrevivência de <i>Erwinia psidii</i> em mudas de eucalipto.....	21
Translocação e sobrevivência de <i>Erwinia psidii</i> em minicepas de eucalipto.....	27
DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO 2 - HERANÇA DA RESISTÊNCIA À SECA DE PONTEIROS CAUSADA POR <i>Erwinia psidii</i> EM <i>Eucalyptus</i> spp.	39
RESUMO	40
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	43
Material genético	43
Inoculação.....	45
Avaliação	46
Re-inoculação	46
Modelos de herança da resistência - mono ou oligogênica	47
Modelos de herança da resistência - poligênica	48
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS	60

INTRODUÇÃO GERAL

O setor florestal brasileiro é reconhecido internacionalmente pelo manejo florestal sustentável e alta produtividade de suas florestas plantadas (IBÁ 2020). O eucalipto é a essência florestal mais plantada no Brasil, com área de aproximadamente 7,6 milhões de hectares (IBÁ 2020). As plantações comerciais de eucalipto sustentam uma indústria multibilionária com produtos diversificados como polpa de celulose, papel, carvão para a indústria siderúrgica, dentre outros produtos sólidos (IBÁ 2020). Com a expansão das plantações para diversas regiões do país favoráveis à infecção, vários patógenos ganharam importância na eucaliptocultura e, recentemente *Erwinia psidii* Rodrigues Neto, Robbs & Yamashiro 1988, agente causal da seca de ponteiros do eucalipto (Coutinho *et al.* 2011, Arriel *et al.* 2014) vem se destacando como um patógeno emergente da cultura.

Erwinia psidii foi relatada pela primeira vez na década de 1980, causando seca de ponteiros em goiabeira (*Psidium guajava* L.) em São Paulo, Brasil (Rodrigues Neto *et al.* 1987). Mais recentemente, *E. psidii* foi relatada como agente causal da seca de ponteiros em *Eucalyptus* spp no Uruguai, na Argentina (Coutinho *et al.* 2011) e no Brasil (Arriel *et al.* 2014). No Brasil, a doença foi relatada em plantios clonais (*E. urophylla* × *E. grandis*) e seminais (*E. grandis* e *E. dunnii*) nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (Arriel *et al.* 2014). Dependendo do local e da época do ano, a doença pode incidir em quase 100% das árvores, causando sérios prejuízos à cultura (Arriel *et al.* 2014).

Em *Eucalyptus* spp., lesão necrótica arroxeadada ou bronzeada no pecíolo e ao longo da nervura principal de folhas jovens, constitui sintoma marcador da doença (Arriel *et al.* 2014). À medida que a doença progride, observam-se morte dos ponteiros, perda de dominância apical e envassouramento das brotações emergentes, o que pode afetar o crescimento das árvores, dependendo da intensidade da doença (Coutinho *et al.* 2011, Arriel *et al.* 2014). Análises mais detalhadas, revelaram que tanto em secções do caule quanto de ramos jovens de plantas

infectadas é possível observar exsudação macroscópica e microscópica de pus, além da descoloração dos tecidos internos do lenho (Arriel *et al.* 2014, Montoya-Estrada *et al.* 2019).

Recentemente, Caires *et al.* (2020) demonstrou que *E. psidii* coloniza os vasos do xilema, formando biofilme e é capaz de movimentar acropetal e basipetalmente no caule. A bactéria também coloniza células do esclerênquima, parênquima e xilema de folhas e caule, entretanto não há relatos da colonização dos vasos do floema (Caires *et al.* 2020). Por meio de inoculações no sistema radicular, demonstrou-se que *E. psidii* penetra e coloniza raízes primárias e secundárias, atinge o xilema, mas não movimenta ascendentemente até atingir o ápice caulinar (Montoya-Estrada *et al.* 2019). Já quando inoculada nas gemas axilares do ápice do caule, a bactéria não foi detectada nas raízes até 42 dias após a inoculação (Montoya-Estrada *et al.* 2019).

Em goiabeira, a poda e queima dos ramos doentes constituem as principais medidas de controle da enfermidade (Marques *et al.* 2007). Entretanto, em eucalipto, tais medidas são impraticáveis devido principalmente à grande extensão das áreas de plantio e ao elevado porte das árvores. Para o eucalipto, a seleção de clones resistentes em condições controladas (Ferraz *et al.* 2016) tem sido a principal estratégia de manejo da doença. Apesar de fontes de resistência a *E. psidii* terem sido identificadas em várias espécies de *Corymbia* e *Eucalyptus* (Caires *et al.* 2019), atualmente a porcentagem de clones comerciais resistentes à bacteriose é inferior a 25% (Informação pessoal: Lúcio M. S. Guimarães), o que limita a disponibilidade de clones para plantio. Para aumentar o percentual de clones resistentes, é fundamental a realização de cruzamentos controlados, baseado no conhecimento da base genética e do modelo de herança da resistência. Além disso, o entendimento do modo e tempo de sobrevivência da bactéria pode embasar a obtenção de mudas saudáveis para plantio. Recentemente, foi reportado que *E. psidii* consegue sobreviver por até 90 dias como epifítica e saprofítica em restos de folhas de eucalipto

e por período menor (5 a 15 dias) no solo (Lanna-Filho *et al.* 2021). Entretanto, pouco se conhece sobre a sobrevivência da bactéria dentro de plantas de eucalipto após inoculação.

Nesta Dissertação, avaliou-se mensalmente a translocação e a sobrevivência de *E. psidii* em diferentes partes de mudas de um clone de *E. urophylla* × *E. grandis* até 180 dias após a inoculação, bem como em minicepas de *C. torelliana* e *Eucalyptus* spp. resistentes ou suscetíveis aos quatro anos após a inoculação. Além disso, determinou-se o modelo de herança da resistência em mudas de sete famílias provenientes de cruzamentos interespecíficos entre quatro genitores de *Eucalyptus* spp. com diferentes níveis de resistência à doença.

REFERÊNCIAS

- Arriel DAA, Fonseca NR, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Mafia RG, Borges Júnior N, de Souza HP and Alfenas AC (2014) Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. **Forest Pathology** **44**: 255–265.
- Caires NP, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Rodrigues FA, Badel JL and Alfenas AC (2020) Bidirectional colonization and biofilm formation by *Erwinia psidii* in eucalyptus plants. **Plant Pathology** **69**: 549–558.
- Caires NP, Hermenegildo PS, Guimarães LMS, Mafia RG, Zauza EÂV, Júnior NB, Badel JL and Alfenas AC (2019) Host range of *Erwinia psidii* and genetic resistance of *Eucalyptus* and *Corymbia* species to this pathogen. **Forest Pathology** **49**: e12527.
- Coutinho TA, Brady CL, Vaart M Van Der, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Perez C and Wingfield MJ (2011) A new shoot and stem disease of eucalyptus species caused by *Erwinia psidii*. **Australasian Plant Pathology** **40**: 55–60.
- Ferraz HGM, Demuner GA, Guimarães LMS, Arriel DAA, da Silva AC, Junior NB, Mafia RG and Alfenas AC (2016) Methods of inoculation and evaluation of *Erwinia psidii* in eucalypt. **Forest Pathology** **46**: 240–247.

Grattapaglia D and Kirst M (2008) *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist** **179**: 911–929.

IBÁ - Indústria Brasileira de Árvores (2020) Relatório Anual. São Paulo, Brasil, p. 123.

Available at <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-iba-2020.pdf>>

Accessed on July 1, 2021.

Lanna-Filho R, Bieler FL and Junior NB (2021) Survival of *Erwinia psidii* in epiphytic, soil and eucalyptus leaf debris conditions. **Forest Pathology** e12710.

Marques ASA, Coelho MVS, Ferreira MÁ silva V, Damasceno JPS, Mendes AP and Vieira TM (2007) Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: níveis de incidência e aspectos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Fruticultura** **29**: 488–493.

Montoya-Estrada CN, Costa CR, Badel JL, Guimarães LMS and Alfenas AC (2019) Root infection and aerial colonization of eucalypt host plants by *Erwinia psidii*. **Tropical Plant Pathology** **44**: 251–257.

Rodrigues Neto J, Robbs CF and Yamashiro T (1987) A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. **Fitopatologia Brasileira** **12**: 354–350.

CAPÍTULO 1 - TRANSLOCAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE *Erwinia psidii* EM MUDAS E MINICEPAS DE EUCALIPTO

Camila Ribeiro Costa¹, Samuel A. Santos^{1,2}, Lúcio M.S. Guimarães^{3,4}, Rafael F. Alfenas¹,
Acelino C. Alfenas^{1*}

¹ Laboratório de Patologia Florestal, Departamento de Fitopatologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, MG, Brasil.

² Plant Health Program, Research and Development, Asia Pacific Resources International Ltd. (APRIL), Pangkalan Kerinci, Riau 28300, Indonesia

³ Clonar Resistência a Doenças Florestais, Zona Rural, 36560-000, Cajuri, MG, Brasil

⁴ Sanidade e Proteção Florestal, Suzano S.A., Itapetininga, SP, Brasil

***Autor para correspondência.** Departamento de Fitopatologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: aalfenas@ufv.br (A.C. Alfenas).

RESUMO

A murcha e seca de ponteiros causada por *Erwinia psidii* é considerada uma das principais doenças do eucalipto (*Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp.) no Brasil. Seu manejo tem sido baseado principalmente na seleção de clones resistentes. Entretanto, o tempo que a bactéria permanece viva nos tecidos de mudas e minicepas continua desconhecido. Neste estudo, avaliou-se, mensalmente por até 180 dias, a translocação e a sobrevivência de *E. psidii* em folhas, ramos, caule e raízes de mudas de um clone híbrido (*E. urophylla* × *E. grandis*) e em minicepas de *Corymbia torelliana* e *Eucalyptus* spp. resistentes ou suscetíveis aos quatro anos após a inoculação. Em mudas inoculadas nas gemas axilares apicais, a bactéria foi detectada nas folhas somente no início da infecção, aos 30 e 60 dias após a inoculação (dai), nos ramos laterais e no caule no período de 30 a 150 dai e nas raízes, de 60 a 180 dai. Em mudas inoculadas no sistema radicular, *E. psidii* apresentou um baixo movimento acropetal, sendo detectada no caule, somente aos 30 e 60 dai, embora tenha permanecido viável nas raízes por até 180 dai. Em minicepas, *E. psidii* foi detectada no caule e nas raízes da maioria das espécies testadas, aos quatro anos após a inoculação por deposição de inóculo nas gemas axilares, tanto em minicepas suscetíveis como também nas resistentes. Em brotos a serem empregados para a produção de miniestacas, dentre as 71 minicepas avaliadas de oito espécies diferentes, *E. psidii* foi encontrada apenas em uma única minicepa de *E. sideroxylon*. Tanto em mudas quanto em minicepas, a bactéria foi detectada mesmo em plantas assintomáticas o que indica uma possível disseminação do patógeno por mudas visualmente sadias. Os resultados deste estudo demonstraram que *E. psidii* sobrevive nos tecidos da planta por até quatro anos sem exibir sintomas de infecção, mas principalmente nas raízes de plantas vivas de eucalipto.

Palavras-chave: seca de ponteiros, eucalipto, detecção de bactéria, clonagem, resistência.

INTRODUÇÃO

Erwinia psidii Rodrigues Neto, Robbs & Yamashiro 1988 é uma bactéria, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, originalmente descrita como agente causal da seca de ponteiros em goiabeira (*Psidium guajava*), no estado de São Paulo, Brasil (Rodrigues Neto *et al.* 1987) e constitui atualmente um importante patógeno em eucalipto, no Uruguai, na Argentina (Coutinho *et al.* 2011) e no Brasil (Arriel *et al.* 2014). No Brasil, a doença em eucalipto foi relatada em plantios clonais (híbridos de *E. urophylla* × *E. grandis*) e seminais de (*E. grandis* e *E. dunnii*) nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (Arriel *et al.* 2014). Dependendo do local e da época do ano, a doença pode incidir em quase 100% das árvores, levando à perda da dominância apical e redução do crescimento (Arriel *et al.* 2014).

Lesão necrótica arroxeadada ou bronzeada no pecíolo e na nervura principal das folhas jovens, conhecido também como sintoma marcador da doença constitui um dos primeiros sintomas em eucalipto (Arriel *et al.* 2014). À medida que a doença progride, observam-se anelamento e a morte do ponteiro da haste principal, perda da dominância apical, e envassouramento das brotações emergentes, escurecimento dos tecidos internos do lenho, redução do crescimento das árvores e do valor comercial da madeira para celulose e serraria (Coutinho *et al.* 2011, Arriel *et al.* 2014). Em materiais genéticos altamente suscetíveis, *E. psidii* pode causar murcha descendente, também conhecida como *dieback*, culminando com a morte de árvores no campo (Arriel *et al.* 2014). Exsudação macroscópica e microscópica de pus pode ser observada a partir dos tecidos infectados (Arriel *et al.* 2014, Montoya-Estrada *et al.* 2019a).

Estudos recentes demonstraram que *E. psidii* coloniza os vasos do xilema, esclerênquima e parênquima de folhas e caule de eucalipto (Montoya-Estrada *et al.* 2019a, Caires *et al.* 2020). Uma vez nos tecidos da planta, a bactéria apresenta movimento bidirecional (acropetal e basipetal) no caule, deslocando-se principalmente através dos vasos do xilema (Montoya-Estrada *et al.* 2019a, Caires *et al.* 2020). O movimento acropetal ocorre de forma

mais rápida que no sentido basipetal (Caires *et al.* 2020). A bactéria também pode ser encontrada em tecidos assintomáticos do caule de mudas de eucalipto (Montoya-Estrada *et al.* 2019a). Recentemente foi reportado que *E. psidii* é capaz de sobreviver no filoplano de florestas de eucalipto por até 60 dias como epifíticas, bem como saprofíticas, em restos de folhas de eucalipto infectadas, por até 90 dias, contudo, a bactéria não é capaz de sobreviver em solo não estéril (Lanna-Filho *et al.* 2021).

Quando inoculada via sistema radicular, *E. psidii* mostrou-se capaz de penetrar e colonizar raízes primárias e secundárias, atingindo o xilema, entretanto não foi observado movimento ascendente (Montoya-Estrada *et al.* 2019a). Por outro lado, quando inoculada na parte apical do caule, a bactéria não foi detectada nas raízes até 42 dias após a inoculação (dai) (Montoya-Estrada *et al.* 2019a). Baseado nas evidências de que *E. psidii* é capaz de movimentar em ambos os sentidos e que o movimento basipetal ocorre de forma mais lenta, especula-se que a falta de detecção da bactéria nas raízes por Montoya-Estrada *et al.* (2019a) pode estar relacionada ao curto período de incubação de 28 dai.

Embora o processo de colonização da bactéria no caule esteja bem esclarecido, ainda há lacunas no conhecimento acerca da colonização do sistema radicular e sobrevivência de *E. psidii* na planta, uma vez que o período de incubação das plantas inoculadas foi relativamente curto. Além disso, devido ao modo de produção de mudas clonadas no eucalipto, é fundamental entender a sobrevivência da bactéria em minicepas. Assim, no presente estudo avaliou-se, a sobrevivência de *E. psidii* em mudas de um clone híbrido de *E. urophylla* × *E. grandis*, inoculadas tanto via sistema radicular quanto via gemas axilares até 180 dai. Em outro ensaio avaliou-se o tempo de sobrevivência da bactéria em minicepas de *Corymbia* e *Eucalyptus* quatro anos após serem inoculadas com a bactéria.

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação de *Erwinia psidii* via parte aérea e sistema radicular de mudas de eucalipto

Cento e vinte mudas do clone CLR375 (*E. urophylla* × *E. grandis*), previamente classificado como suscetível a *E. psidii* (Lúcio M. S. Guimarães, Clonar Resistência a Doença Florestais, Cajuri, Brasil, comunicação pessoal) foram transplantadas para sacolas plásticas de 6 L, contendo o substrato Carolina Soil (turfa de sphagnum 70%, casca de arroz carbonizada 20%, perlita 10%), enriquecido com superfosfato (6.0 kg m⁻³) e osmocote (19:06:10) a 1,5 kg. m⁻³. As mudas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura média de 28 ± 5 °C e fertilizadas quinzenalmente com solução de NPK (05:10:30 a 6 g L⁻¹). Aos 30 dias após o transplântio, as mudas foram inoculadas de duas formas: *i*) inoculação da parte aérea por deposição de inóculo nas gemas axilares de ramos apicais do caule (Ferraz *et al.*, 2016) e *ii*) inoculação do sistema radicular por imersão em suspensão bacteriana (Montoya-Estrada *et al.* 2019a).

Para as inoculações, utilizou-se uma cultura do isolado LPF534 de *E. psidii*, caracterizado por Arriel *et al* (2014), da bacterioteca do Laboratório de Patologia Florestal/Biagro/DFP/UFV. A cultura foi reativada a partir de uma suspensão bacteriana, armazenada em glicerol (30%) a -80 °C, transferida com o auxílio de ponteiras autoclavadas para placas de Petri, contendo meio sólido 523 (Kado & Heskett 1970). As placas foram mantidas em câmara de crescimento por 48 h a 28 °C e a identidade das colônias bacterianas foi confirmada por meio de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) espécie-específica (Costa, 2017).

Para inoculação da parte aérea, fez-se um ferimento com alfinete estéril nas axilas dos três primeiros pares de folhas e em seguida, com auxílio de um palito de madeira autoclavado, impregnou-se colônias bacterianas nos ferimentos de cada planta (Ferraz *et al.* 2016) Plantas

inoculadas apenas com água destilada estéril serviram de testemunha. Todas as plantas foram incubadas em casa de vegetação com temperatura média de 28 ± 5 °C até o final do experimento.

Para inoculação do sistema radicular, ajustou-se uma suspensão bacteriana a uma $OD_{540} = 1$, de aproximadamente 10^7 UFC/ml, preparada em NaCl (0,85%) usando uma cultura pura de 48h após repicagem do isolado bacteriano. Efetuou-se a poda de um terço do sistema radicular, com o auxílio de tesoura autoclavada, o qual foi imerso por 30 min na suspensão bacteriana. Plantas com sistema radicular igualmente podado e imerso em água destilada autoclavada foram utilizadas como testemunha. Após a imersão, as plantas foram transplantadas para sacolas plásticas de 6L e cultivadas em casa de vegetação conforme previamente descrito.

Inoculação de *Erwinia psidii* via parte aérea e formação de minicepas de *Corymbia torelliana* e *Eucalyptus* spp.

Para a obtenção das minicepas, empregaram-se mudas seminais com 60 dias de idade previamente inoculadas por Caires *et al.* (2019) com o isolado LPF534 por deposição de inóculo nas gemas axilares do ápice caulinar conforme descrito por Ferraz *et al.* (2016). Após avaliação da resistência, cada muda foi rebaixada por meio de podas sucessivas visando à formação de minicepas. As minicepas foram mantidas em vasos individuais de 2L contendo substrato Carolina Soil, enriquecido com superfosfato (6.0 kg m^{-3}) e osmocote (19:06:10) a $1,5 \text{ kg. m}^{-3}$ em casa de vegetação com temperatura média de 28 ± 5 °C, fertilizadas quinzenalmente com solução de NPK (05:10:30 a 6 g L^{-1}) e podadas periodicamente por um período de quatro anos.

Setenta e uma minicepas previamente caracterizadas como resistentes ou suscetíveis a *E. psidii* (Caires *et al.* 2019) foram utilizadas neste estudo (Tabela 1).

Tabela 1. Número de minicepas resistentes ou suscetíveis a *Erwinia psidii* avaliadas por espécie.

Espécie	Nº de minicepas		
	R*	S*	Total
<i>C. torelliana</i>	2	1	3
<i>E. camaldulensis</i>	3	10	13
<i>E. grandis</i>	5	4	9
<i>E. pellita</i>	7	2	9
<i>E. saligna</i>	2	2	4
<i>E. sideroxylon</i>	5	2	7
<i>E. tereticornis</i>	12	1	13
<i>E. urophylla</i>	6	7	13

* Previamente fonotipadas como resistentes (R) e suscetíveis (S) por Caires *et al.* (2019).

Detecção de *Erwinia psidii* em tecido vegetal

A detecção de *E. psidii* em mudas e minicepas foi realizada por meio de isolamento indireto, seguido do teste de aglutinação e PCR. Inicialmente, fragmentos de tecido vegetal de aproximadamente 5 × 5 mm foram desinfestados por transferência sucessiva em etanol 50% por 30 segundos, NaOCl 1% por 90 segundos e enxaguados em água destilada esterilizada por 3 min. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 2 mL, contendo 1 mL de água destilada esterilizada e duas *beads* de tungstênio e macerados em Tissuelyser (Qiagen Sciences Inc., Germantown, MD, USA) a uma frequência de 13 Htz por 2,5 min. O macerado foi transferido com alça bacteriológica esterilizada para placas de Petri contendo meio 523 sólido. As placas foram mantidas a 28 °C por 48 h. Após incubação, colônias individuais circulares com bordas irregulares, de aspecto ressecado/fosco, coloração esbranquiçada a incolor e com crescimento mais lento em relação às demais colônias bacterianas, morfológicamente similares a *E. psidii*, foram transferidas para novas placas, contendo o mesmo meio para obtenção de culturas puras. Após uma segunda incubação por 48 h a 28 °C, as colônias puras obtidas foram submetidas ao teste sorológico de aglutinação com anticorpos específicos para *E. psidii* (Montoya-Estrada *et al.* 2019b).

Culturas bacterianas puras com resultado positivo pelo teste de aglutinação foram submetidas à extração de DNA para uma confirmação por PCR. O DNA total foi extraído utilizando o kit Wizard® (Promega, Madison, USA), seguindo as recomendações do fabricante para bactérias Gram-negativas. O DNA extraído foi espectrofotometricamente quantificado em NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) e sua concentração final ajustada para 15 ng μL^{-1} .

Os ensaios de PCR foram realizados em termociclador Veriti® (Applied Biosystems – ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) em um volume final de 15 μl [7,5 μl (1x) de GoTaq® DNA Polymerase (Promega); 1,0 μl do *reverse primer* (10 mM); 1,0 μl do *forward primer* (10 mM); 2 μl de suspensão bacteriana e 3,5 μl de água ultrapura esterilizada]. Utilizou-se o par de primers GapA 6F (5'-CGTTTCGAAGGCACTGTTGAAGTC-3') e 6R (5'-CGGTTTTCTGCGTTGCGGTAG-3'), específicos para *E. psidii* (Costa, 2017) com a seguinte programação: ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 3 min, 32 ciclos de amplificação [94 °C por 1 min (desnaturação), 68 °C por 30 segundos (anelamento dos primers), 72 °C por 2 min (elongação)] e extensão final a 72 °C por 5 min (Costa, 2017). O DNA do isolado LPF534 de *E. psidii* foi utilizado como controle positivo, enquanto que água ultrapura esterilizada serviu de controle negativo.

O produto de PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose 2,0% (m v^{-1}) a 4 V cm^{-1} por 90 min em tampão 1X TBE [Tris-borato 90 mM; EDTA 2,0 mM; pH 8,0]. O gel foi contrastado com brometo de etídio (1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e visualizado em sistema de fotodocumentação de gel L-PIX (Locus Biotechnology Inc., Morrisville, NC, USA). O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen – ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Considerou-se como resultado positivo, as amostras que apresentaram amplificação de fragmento de DNA com peso molecular igual ao do controle positivo (~ 400bp) (Costa, 2017).

Translocação e sobrevivência de *Erwinia psidii* em mudas e minicepas de eucalipto

As plantas inoculadas via parte aérea ou sistema radicular foram monitoradas semanalmente durante o primeiro mês após a inoculação para observação dos sintomas induzidos por *E. psidii*. A translocação e a sobrevivência de *E. psidii* foram avaliadas aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dai, através de detecção da bactéria em raízes, caule, ramos e folhas das mudas inoculadas. Para cada tempo de avaliação foram amostradas cinco plantas para cada método de inoculação, além de cinco plantas controle (inoculadas com água destilada). Em cada planta amostrada (repetição = unidade amostral), aproximadamente 20 fragmentos de 5 × 5 mm de tecido vegetal foram retirados de cada parte da planta (folha, ramo, caule e raiz) em diferentes pontos representativos, os quais foram analisados como 1 *pool*. Cada *pool* foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 2 mL separadamente. Cada tubo foi devidamente identificado e utilizado para os ensaios de detecção, conforme detalhado anteriormente. Além disso, fragmentos representativos de cada parte da planta foram submetidos ao teste de exsudação em gota para observação de exsudação de pus bacteriano, conforme descrito por Alfenas & Mafia (2016).

Para as minicepas, a translocação e sobrevivência de *E. psidii* foram avaliadas por meio de detecção da bactéria em raízes, caule e brotos. A amostragem foi realizada da mesma forma como descrito acima para mudas, porém a avaliação foi realizada em período único de aproximadamente quatro anos após a inoculação.

Os dados de sobrevivência de *E. psidii* foram computados de forma qualitativa como presença ou ausência e analisados de forma descritiva. Para cada avaliação, a frequência média de detecção da bactéria foi obtida a partir do número de amostras positivas em relação ao total avaliado.

RESULTADOS

Translocação e sobrevivência de *Erwinia psidii* em mudas de eucalipto

As mudas inoculadas na parte aérea apresentaram sintomas típicos de infecção causada por *E. psidii* aos 30 e 60 dai como bronzeamento da nervura principal das folhas, lesões e cancro no caule, morte e perda de dominância apical (Figuras 1A-C). Após esse período, as folhas com necrose foram abortadas e não foi observado sintomas nas folhas remanescentes ou em novas folhas emitidas. Além disso, os cancros no caule não progrediram. Apesar da perda de dominância apical, as plantas retomaram o crescimento, mas bifurcaram (Figura 1D) e apresentaram escurecimento nos tecidos internos do caule e raiz (Figuras 1E-F). Já as plantas inoculadas via sistema radicular não apresentaram sintomas de infecção na parte aérea independentemente do tempo de avaliação. Plantas testemunhas, inoculadas apenas com água destilada estéril, permaneceram assintomáticas independentemente do tempo de avaliação.

Detectou-se *Erwinia psidii* em todos os tempos de avaliação em ao menos um dos órgãos quando as plantas foram inoculadas nas gemas axilares (Figura 2). Aos 30 dai, o patógeno foi detectado com maior frequência nas folhas (60%), seguido de ramos (20%) e caule (20%). Já aos 60 dai, *E. psidii* foi detectada em todos os órgãos inclusive em maior frequência (60%) na raiz (Figura 2). A partir dos 90 dai, a bactéria deixou de ser detectada nas folhas e foi mais frequente no caule (80%). Aos 150 dai, *E. psidii* deixou de ser detectada nos ramos, sobrevivendo apenas nos tecidos do caule e raiz, com a mesma frequência de detecção (20%), respectivamente (Figura 2). Aos 180 dai, o patógeno foi detectado apenas nas raízes (Figura 2). A presença de *E. psidii* no tecido vegetal também foi confirmada através de análise molecular, por meio de PCR espécie-específica (Figura 3).

Nas plantas inoculadas via sistema radicular, independentemente do tempo de avaliação, *E. psidii* foi detectada somente no caule e nas raízes (Fig.2; Fig. 3). No caule, a bactéria foi

detectada apenas aos 30 e 60 dai, porém em baixa frequência (20%) nas plantas avaliadas (Fig. 2; Fig. 3). Já nas raízes *E. psidii* foi encontrada em alta frequência na maioria dos períodos avaliados, especialmente aos 30, 90 e 120 dai (Fig. 2; Fig. 3).

Para ambos os métodos de inoculação, *E. psidii* foi detectada em plantas sintomáticas e assintomáticas (Tabela 2). Embora muitas plantas apresentassem sintomas, como escurecimento interno do tecido, cancos no caule e bifurcação, além de exsudação de pus bacteriano em análise microscópica, não foi possível isolar/detectar a bactéria através de PCR (Tabela 2).



Figura 1. Sintomas observados em plantas do clone CLR375 (*Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*) inoculadas com *Erwinia psidii* e avaliadas aos 30 (A), 60 (B e C) e 180 (D-F) dias após a inoculação por deposição de inóculo nas gemas axilares de ramos apicais. **A.** Lesão foliar arroxeada na nervura principal (seta). **B.** Lesões e cancro no caule (setas). **C.** Morte do ponteiro (seta) e perda da dominância apical. **D.** Morte do ápice caulinar (seta) e bifurcação (detalhe). **E-F.** Escurecimento dos tecidos interno (setas) do caule e das raízes, respectivamente.

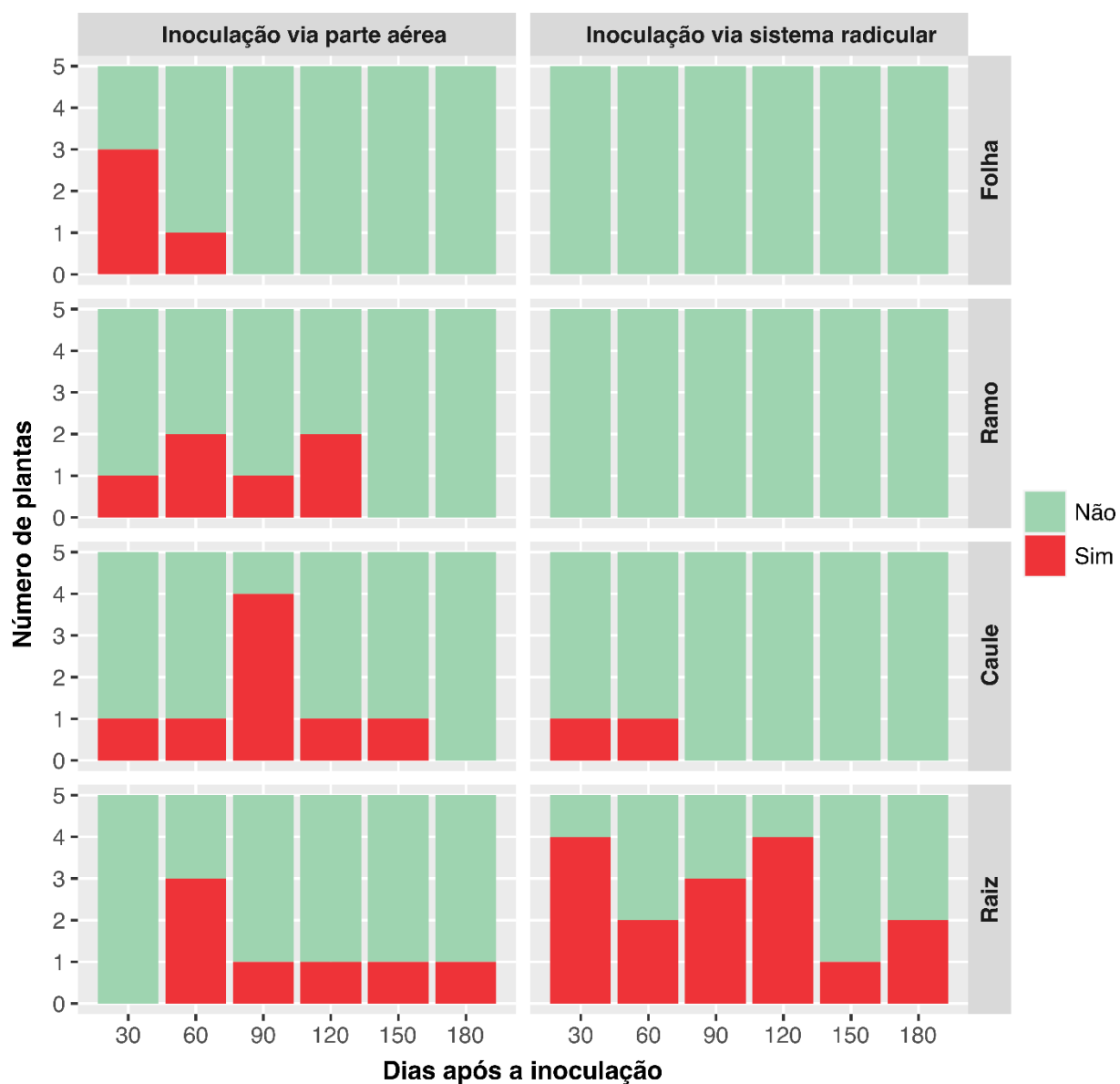


Figura 2. Detecção de *Erwinia psidii* em folha, ramo, caule e raiz de plantas do clone CLR375 (*Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*) em plantas inoculadas nas gemas axilares e via sistema radicular ao longo do tempo.

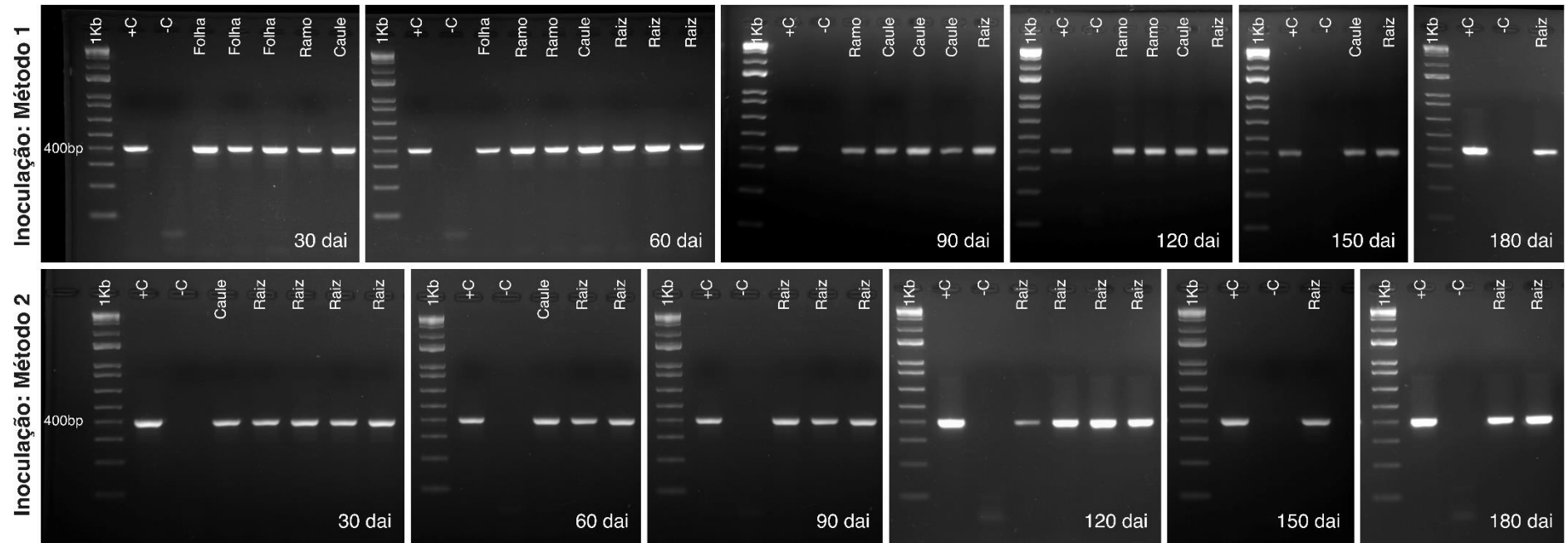


Figura 3. Detecção de *Erwinia psidii* em folha, ramo, caule e raiz de plantas do clone CLR375 (*Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*) ao longo do tempo por PCR usando os primers GapA 6F e 6R, específicos para *E. psidii*. Amostras com fragmento de ~400bp no gel de agarose foram consideradas positivas. **Método 1:** plantas inoculadas por deposição de inóculo nas gemas axilares de ramos apicais. **Método 2:** Plantas inoculadas via sistema radicular. **1Kb** = marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); **+C** = controle positivo (DNA *E. psidii*); **-C** = controle negativo (água destilada autoclavada).

Tabela 2. Exsudação microscópica e detecção de *Erwinia psidii* via PCR espécie-específica em plantas sintomáticas e assintomáticas do clone CLR375 (*Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*) inoculadas via parte aérea ou sistema radicular

DAI ^a	Parte da planta	Inoculação via parte aérea			Inoculação via sistema radicular		
		Sintoma ^b	Exsudação microscópica	Confirmação <i>E. psidii</i> ^c	Sintoma ^b	Exsudação microscópica	Confirmação <i>E. psidii</i> ^c
30	Folha	3 5	1 5	3 5	0 5	0 5	0 5
	Ramo	0 5	1 5	1 5	0 5	0 5	0 5
	Caule	3 5	3 5	2 5	0 5	0 5	1 5
	Raiz	0 5	0 5	0 5	3 5	0 5	4 5
60	Folha	1 5	0 5	1 5	0 5	0 5	0 5
	Ramo	3 5	1 5	2 5	0 5	0 5	0 5
	Caule	3 5	1 5	1 5	0 5	0 5	1 5
	Raiz	0 5	0 5	3 5	1 5	1 5	2 5
90	Folha	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5
	Ramo	0 5	0 5	1 5	0 5	0 5	0 5
	Caule	2 5	0 5	3 5	0 5	0 5	0 5
	Raiz	0 5	0 5	1 5	4 5	2 5	3 5
120	Folha	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5
	Ramo	2 5	1 5	2 5	0 5	0 5	0 5
	Caule	3 5	0 5	1 5	0 5	0 5	0 5
	Raiz	2 5	0 5	1 5	2 5	0 5	4 5
150	Folha	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5
	Ramo	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5
	Caule	4 5	0 5	1 5	0 5	0 5	0 5
	Raiz	2 5	0 5	1 5	5 5	0 5	1 5
180	Folha	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5
	Ramo	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5
	Caule	4 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5
	Raiz	0 5	0 5	1 5	5 5	0 5	2 5

Número de amostras positivas | Total de amostras avaliadas.

^a Dias após a inoculação.

^b Sintomas incluem mancha foliar, cancro, bifurcação e escurecimento interno.

^c Confirmação molecular através de PCR espécie-específica.

Translocação e sobrevivência de *Erwinia psidii* em minicepas de eucalipto

Independentemente do nível de resistência das minicepas, *E. psidii* foi detectada na maioria das espécies avaliadas, principalmente no caule e nas raízes (20% e 30% respectivamente), aos quatro anos após a inoculação (Tabela 3; Fig. 4). Em brotos, *E. psidii* foi encontrada apenas em uma única minicepa de *E. sideroxylon*, previamente classificado como resistente (Caires *et al.* 2019) (Tabela 3; Fig. 4). Em *E. pellita*, não se detectou a bactéria em nenhum dos órgãos avaliados, mesmo em minicepas previamente classificadas como suscetíveis, embora tenha sido observado sintomas de escurecimento interno do tecido vegetal e exsudação microscópica (Tabela 3; Fig. 4). Entretanto, não foi confirmado por PCR que o escurecimento e a exsudação eram devido a *E. psidii* (Tabela 3). Além de *E. pellita*, apenas em *E. camaldulensis* não foi possível detectar *E. psidii* nas minicepas, mas diferentemente do observado para *E. pellita* essa não detecção ocorreu apenas nas minicepas previamente classificadas como resistentes (Tabela 3).

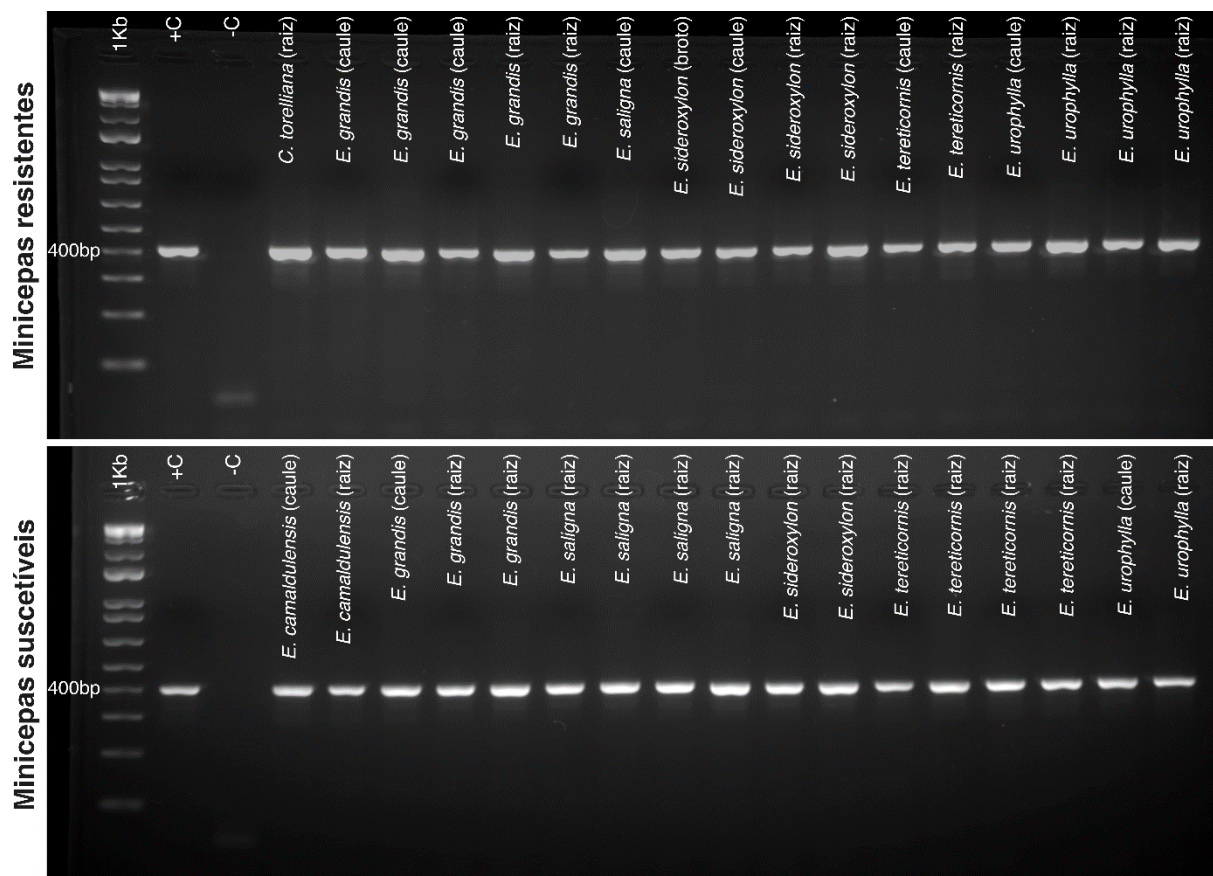


Figura 4. Detecção de *Erwinia psidii* em broto, caule e raiz de minicepas de *Corymbia* e *Eucalyptus* ssp. aos quatro anos após serem inoculadas por deposição de inoculo nas gemas axilares apicais, por PCR usando primers os primers GapA 6F e 6R, específicos para *E. psidii*. Amostras com fragmento de ~400bp no gel de agarose foram consideradas positivas. **1Kb** = marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); **+C** = controle positivo (DNA *E. psidii*); **-C** = controle negativo (água destilada autoclavada). As mudas que deram origem às minicepas foram previamente avaliadas por Caires *et al.* 2019.

Tabela 3. Exsudação microscópica e detecção de *Erwinia psidii* em minicepas de *Corymbia torelliana* e diferentes espécies de *Eucalyptus*, aos quatro anos após inoculação nas gemas axilares apicais

Resistentes ^a					Suscetível ^a				
Espécie	Parte da Planta	Sintoma ^b	Exsudação Microscópica	Confirmação <i>E. psidii</i> ^c	Espécie	Parte da Planta	Sintoma ^b	Exsudação Microscópica	Confirmação <i>E. psidii</i>
<i>C. torelliana</i>	Broto	0 2	0 2	0 2	<i>C. torelliana</i>	Broto	0 1	0 1	0 1
	Caule	2 2	0 2	0 2		Caule	0 1	1 1	0 1
	Raiz	2 2	0 2	1 2		Raiz	0 1	1 1	0 1
<i>E. camaldulensis</i>	Broto	0 3	0 3	0 3	<i>E. camaldulensis</i>	Broto	0 10	0 10	0 10
	Caule	1 3	1 3	0 3		Caule	9 10	7 10	2 10
	Raiz	1 3	0 3	0 3		Raiz	6 10	4 10	3 10
<i>E. grandis</i>	Broto	0 5	0 5	0 5	<i>E. grandis</i>	Broto	0 4	0 4	0 4
	Caule	4 5	1 5	3 5		Caule	4 4	1 4	1 4
	Raiz	1 5	0 5	2 5		Raiz	3 4	3 4	3 4
<i>E. pellita</i>	Broto	0 7	0 7	0 7	<i>E. pellita</i>	Broto	0 2	0 2	0 2
	Caule	5 7	2 7	0 7		Caule	1 2	1 2	0 2
	Raiz	6 7	1 7	0 7		Raiz	2 2	1 2	0 2
<i>E. saligna</i>	Broto	0 2	0 2	0 2	<i>E. saligna</i>	Broto	0 2	0 2	0 2
	Caule	1 2	0 2	1 2		Caule	2 2	0 2	0 2
	Raiz	1 2	0 2	0 2		Raiz	1 2	0 2	2 2
<i>E. sideroxylon</i>	Broto	0 5	0 5	1 5	<i>E. sideroxylon</i>	Broto	0 2	0 2	0 2
	Caule	4 5	4 5	1 5		Caule	2 2	1 2	0 2
	Raiz	2 5	0 5	2 5		Raiz	1 2	0 2	1 2
<i>E. tereticornis</i>	Broto	0 12	0 12	0 12	<i>E. tereticornis</i>	Broto	0 1	0 1	0 1
	Caule	12 12	5 12	3 12		Caule	1 1	1 1	1 1
	Raiz	6 12	1 12	2 12		Raiz	0 1	0 1	0 1
<i>E. urophylla</i>	Broto	1 6	0 6	0 6	<i>E. urophylla</i>	Broto	0 7	0 7	0 7
	Caule	5 6	2 6	1 6		Caule	6 7	2 7	1 7
	Raiz	4 6	3 6	3 6		Raiz	6 7	2 7	2 7

Número de amostras positivas | Total de amostras avaliadas.

^a Previamente avaliadas como resistentes e suscetíveis por Caires *et al.* (2019).

^b Escurecimento interno.

^c Confirmação molecular através de PCR espécie-específica.

DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que o tempo de sobrevivência de *E. psidii* varia de acordo com o órgão da planta em que a bactéria se encontra alojada. Em plantas do clone CLR375 (*Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*), mesmo quando inoculadas nas gemas axilares apicais, a bactéria foi detectada em folhas e ramos apenas no início do processo infeccioso, sendo que aos 180 dai *E. psidii* foi encontrada somente nas raízes. Além disso, quando inoculada via sistema radicular o patógeno apresenta um pequeno movimento acropetal, sendo encontrado no caule aos 30 e 60 dai, porém não atinge outros órgãos aéreos e a partir dos 90 dai permanece sobrevivendo apenas no sistema radicular. Já em minicepas de *C. torelliana* e *Eucalyptus* spp., avaliadas 4 anos após a inoculação nas gemas axilares apicais *Erwinia psidii* foi detectada principalmente nas raízes e caules.

Estudos anteriores revelaram que *E. psidii* é capaz de colonizar células do parênquima, esclerênquima, e principalmente vasos do xilema, além de se movimentar no caule tanto no sentido acropetal quanto basipetal (Montoya-Estrada *et al.* 2019a, Caires *et al.* 2020). Colonização bidirecional do xilema tem sido reportada para diferentes bactérias fitopatogênicas como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em tomate (Xu *et al.* 2010), *Erwinia amylovora* em maçã (Bogs *et al.* 1998), *Erwinia tracheiphila* em melão e abobrinha (Vrisman *et al.* 2016), além de *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* em alface (Barak *et al.* 2002). Apesar de colonizar bem o xilema e formar biofilme dentro dos vasos, não há evidências de que *E. psidii* coloniza o floema (Caires *et al.* 2020). Assim, o seu movimento descendente pode ser explicado pela pressão negativa no xilema decorrente de uma baixa absorção de água nas raízes ou redução da taxa de transpiração nas folhas (Bogs *et al.* 1998, Tattar & Tattar 1999). Uma segunda hipótese, seria uma movimentação ativa mediada por estruturas especializadas. Por exemplo, *Xylella fastidiosa* coloniza os vasos do xilema de seus hospedeiros contra o fluxo de água devido à formação de pili (Meng *et al.* 2005). Outro exemplo é *Ralstonia solanacearum*

agente causal da murcha bacteriana do eucalipto, que coloniza vasos do xilema formando biofilme em genótipo susceptível e apresenta movimentação bidirecional no caule através do tecido vascular (Freitas *et al.* 2021).

Quando inoculada na parte aérea (gemas axilares) foi possível observar sintomas típicos de infecção por *E. psidii* como necrose arroxeadada na nervura central, cancro no caule, morte do ponteiro apical, perda da dominância e superbrotamento/envassouramento. No entanto, quando inoculada via sistema radicular nenhum sintoma foi observado na parte aérea, o que corrobora com resultados anteriores observados (Montoya-Estrada *et al.* 2019a). Além disso, Montoya-Estrada *et al.* (2019a) observaram que quando a bactéria foi inoculada via sistema radicular, ela colonizou raízes, mas não apresentou movimento ascendente para outros órgãos da planta, o que pode ser atribuído ao curto período de avaliação (28 dai), uma vez que no presente estudo detectamos a bactéria no caule aos 30 e 60 dias após ter sido inoculada nas raízes.

No presente estudo, *E. psidii* foi detectada mesmo em tecidos de plantas assintomáticas, inclusive em mincepas de diferentes espécies de eucalipto após quatro anos de terem sido inoculadas, independentemente do nível de resistência. Dentre as 71 mincepas avaliadas de oito espécies de *Corymbia* e *Eucalyptus*, *E. psidii* foi detectada nas brotações de uma minicepa de *E. sideroxylon*. Porém no caule, *E. psidii* foi detectada em 14 mincepas de cinco espécies distintas, enquanto que na raiz a bactéria foi detectada em 22 mincepas também em 5 espécies distintas, o que reforça a hipótese levantada por Montoya-Estrada *et al.* (2019a) de que *E. psidii* pode ser disseminada por mudas assintomáticas. Nesse estudo, a detecção da bactéria em mincepas foi realizada em uma única análise (4 anos após inoculação). Assim, avaliações sequenciais ao longo do tempo serão importantes para esclarecer a translocação da bactéria da minicepa para o broto já que é a principal estratégia de manejo da doença tem sido a seleção e plantio de clones de eucalipto resistentes (Caires *et al.* 2019). Conforme demonstrado nesse

estudo, *E. psidii* é capaz de sobreviver por vários anos em minicepas assintomáticas, as quais podem servir como veículo de disseminação do patógeno do viveiro para o campo. Contudo, novos estudos são necessários para investigar se a bactéria recuperada do sistema radicular após quatro anos da inoculação manteve sua patogenicidade.

O isolamento em meio de cultura, seguido de PCR espécie-específica tem sido um método de detecção seguro para estudos de sobrevivência de bactérias fitopatogênicas em amostras de tecido vegetal (Jiang *et al.* 2016). Entretanto, bactérias no estado viável, mas não cultivável (VBNC) não crescem em meios de cultura, mas podem constituir ameaça aos seus hospedeiros, já que podem se tornar virulentas após reativação (Xu *et al.* 1982, Maertens *et al.* 2021). O estado de VBNC foi relatado inicialmente em *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae* (Xu *et al.* 1982), mas desde então tem sido amplamente estudado e atualmente já foi reportado em aproximadamente 101 espécies de bactérias (Zhang *et al.* 2021). Quando no estado VBNC, as bactérias reduzem o metabolismo, a taxa de crescimento e o tamanho celular (Zhang *et al.* 2021) e reduz consequentemente sua necessidade de energia (Pinto *et al.* 2015, Bodor *et al.* 2020). O estado VBNC é considerado uma das principais estratégias de sobrevivência a longo prazo para bactérias fitopatogênicas e é induzido por diversos fatores como falta de nutrientes e estresses físicos, químicos e ambientais (Oliver 2005, 2010, 2016, Navarrete & De La Fuente 2014, Pinto *et al.* 2015, Jiang *et al.* 2016, Gamble *et al.* 2019). Para várias bactérias fitopatogênicas, uso de fontes de cobre tem sido constantemente associado à indução do estado VBNC (Grey & Steck 2001, Van Overbeek *et al.* 2004, Ordax *et al.* 2006, 2009, Del Campo *et al.* 2009, Santander *et al.* 2012, Jiang *et al.* 2016, Kan *et al.* 2019). VBNC é um estado reversível. Em condições favoráveis, as células bacterianas podem reativar seu metabolismo e se multiplicarem, saindo do estado VBNC e inclusive retomar sua patogenicidade (Santander *et al.* 2012, Pinto *et al.* 2015, Jiang *et al.* 2016, Kan *et al.* 2019). Em viveiros, principalmente em minijardim clonal e casas de crescimento e rustificação, fontes de cobre são comumente usadas como

micronutrientes via fertirrigação ou pulverização foliar, como também em aplicação de fungicidas cúpricos para manejo de doenças (Alfenas *et al.* 2009, Medeiros *et al.* 2021). Nesse estudo, observou-se que o número de plantas sintomáticas, mas que não foi possível detectar a bactéria, aumentou com o passar do tempo. Assim, é possível especular que a sobrevivência de *E. psidii* por longo período mesmo em minicepas resistentes, pode estar relacionada a esse mecanismo, comum em outras fitobactérias, incluindo *Erwinia amylovora* (Ordax *et al.* 2006, 2009, Santander *et al.* 2012). Portanto, estudos para elucidar a ocorrência de VBNC em *E. psidii* são relevantes, já que ainda não se sabe as consequências de se ter a bactéria alojada nas raízes, e uma vez que a bactéria está na planta, existe a possibilidade de transmissão por miniestaquia, podendo afetar a principal estratégia de manejo da doença em eucalipto, que consiste na seleção e no plantio de clones resistentes.

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- a) *Erwinia psidii* é capaz de migrar da parte aérea para as raízes de eucalipto, onde sobrevive por até 4 anos.
- b) *Erwinia psidii* foi detectada em mudas assintomáticas, o que indica a possibilidade de disseminação da doença no campo por meio do plantio de mudas infectadas, porém assintomáticas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Clonar Resistência a Doenças Florestais pela multiplicação e pelo cultivo do material vegetal, além da disponibilização das instalações de inoculação para condução experimental em condições controladas. À Claudia Montoya-Estrada pela revisão do

texto. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado à Camila R. Costa (Código financeiro 001).

REFERÊNCIAS

Alfenas AC and Mafia RG (2016) **Métodos em Fitopatologia**, 2nd ed. Editora UFV (ed). Viçosa, Brasil, 516p.

Alfenas AC, Zauza EA V., Mafia RG and Assis TF (2009) **Clonagem e Doenças do Eucalipto**, 1st ed. Editora UFV (ed). Viçosa, Brasil.

Arriel DAA, Fonseca NR, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Mafia RG, Borges Júnior N, de Souza HP and Alfenas AC (2014) Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. **Forest Pathology** **44**: 255–265.

Barak JD, Koike ST and Gilbertson RL (2002) Movement of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in the stems of lettuce and seed contamination. **Plant Pathology** **51**: 506–512.

Bodor A, Bounedjoum N, Vincze GE, Erdeiné Kis Á, Laczi K, Bende G, Szilágyi Á, Kovács T, Perei K and Rákhely G (2020) Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology** **2020 19:1** 19: 1–22.

Bogs J, Bruchmüller I, Erbar C and Geider K (1998) Colonization of Host Plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. **Phytopathology** **88**: 416–421.

Caires NP, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Rodrigues FA, Badel JL and Alfenas AC (2020) Bidirectional colonization and biofilm formation by *Erwinia psidii* in eucalypt plants. **Plant Pathology** **69**: 549–558.

Caires NP, Hermenegildo PS, Guimarães LMS, Mafia RG, Zauza EÂV, Júnior NB, Badel JL and Alfenas AC (2019) Host range of *Erwinia psidii* and genetic resistance of *Eucalyptus*

- and *Corymbia* species to this pathogen. **Forest Pathology** **49**: e12527.
- Costa CR (2017) Desenvolvimento e validação de primers específicos via PCR para detecção de *Erwinia psidii* em *Eucalyptus* spp. **Monografia** (Graduação em Engenharia Florestal) - Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 22.
- Coutinho TA, Brady CL, Vaart M Van Der, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Perez C and Wingfield MJ (2011) A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. **Australasian Plant Pathology** **40**: 55–60.
- Del Campo R, Russi P, Mara P, Mara H, Peyrou M, De León IP and Gaggero C (2009) *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. **FEMS Microbiology Letters** **298**: 143–148.
- Ferraz HGM, Demuner GA, Guimarães LMS, Arriel DAA, da Silva AC, Junior NB, Mafia RG and Alfenas AC (2016) Methods of inoculation and evaluation of *Erwinia psidii* in eucalypt. **Forest Pathology** **46**: 240–247.
- Freitas RG, Hermenegildo PS, Cascardo RS, Guimarães LMS, Santos SA, Badel JL, Alfenas-Zerbini P and Alfenas AC (2021) Validation and use of a qPCR protocol to quantify the spread of *Ralstonia solanacearum* in susceptible and resistant eucalypt plants. **Plant Pathology** **70**: 1708–1718.
- Gample SP, Agrawal S and Sarkar D (2019) Evidence of nitrite acting as a stable and robust inducer of non-cultivability in *Mycobacterium tuberculosis* with physiological relevance. **Scientific Reports** **9**: 1–12.
- Grey BE and Steck TR (2001) The Viable but Nonculturable State of *Ralstonia solanacearum* May Be Involved in Long-Term Survival and Plant Infection. **Applied and Environmental Microbiology** **67**: 3866–3872.
- Jiang N, Lv QY, Xu X, Cao YS, Walcott RR, Li JQ and Luo LX (2016) Induction of the viable but nonculturable state in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and in

- planta resuscitation of the cells on tomato seedlings. **Plant Pathology** **65**: 826–836.
- Kado CI and Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology** **60**: 969–976.
- Kan Y, Jiang N, Xu X, Lyu Q, Gopalakrishnan V, Walcott R, Burdman S, Li J and Luo L (2019) Induction and Resuscitation of the Viable but Non-culturable (VBNC) State in *Acidovorax citrulli*, the Causal Agent of Bacterial Fruit Blotch of Cucurbitaceous Crops. **Frontiers in Microbiology** **0**: 1081.
- Lanna-Filho R, Bieler FL and Junior NB (2021) Survival of *Erwinia psidii* in epiphytic, soil and eucalyptus leaf debris conditions. **Forest Pathology** e12710.
- Maertens L, Matroule J-Y and Van Houdt R (2021) Characteristics of the copper-induced viable-but-non-culturable state in bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** **37**: 1–9.
- Medeiros PL de, Pimenta AS, Silva GGC da, Oliveira EMM de, Júnior DN da S and Souza GLF de (2021) Efficiency of micronutrients and sodium use of a *Eucalyptus* clone as a function of planting density in short-rotation cropping. **Australian Forestry** **84**: 73–81.
- Meng Y, Li Y, Galvani CD, Hao G, Turner JN, Burr TJ and Hoch HC (2005) Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. **Journal of Bacteriology** **187**: 5560–5567.
- Montoya-Estrada CN, Costa CR, Badel JL, Guimarães LMS and Alfenas AC (2019a) Root infection and aerial colonization of eucalypt host plants by *Erwinia psidii*. **Tropical Plant Pathology** **44**: 251–257.
- Montoya-Estrada CN, Silva PF, Costa CR, Oliveira LL, Guimarães LMS, Badel JL and Alfenas AC (2019b) An agglutination test for fast and specific detection of *Erwinia psidii*. **Forest Pathology** **49**: 12549.

- Navarrete F and De La Fuente L (2014) Response of *Xylella fastidiosa* to zinc: Decreased culturability, increased exopolysaccharide production, and formation of resilient biofilms under flow conditions. **Applied and Environmental Microbiology** **80**: 1097–1107.
- Oliver JD (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews** **34**: 415–425.
- Oliver JD (2016) The Viable but Nonculturable State for Bacteria: Status Update. **Microbe** **11**: 159–164.
- Oliver JD (2005) The Viable but Nonculturable State in Bacteria. **Journal of Microbiology** **43**: 93–100.
- Ordax M, Biosca EG, Wimalajeewa SC, López MM and Marco-Noales E (2009) Survival of *Erwinia amylovora* in mature apple fruit calyces through the viable but nonculturable (VBNC) state. **Journal of Applied Microbiology** **107**: 106–116.
- Ordax M, Marco-Noales E, López MM and Biosca EG (2006) Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: Induction of the viable-but-nonculturable state. **Applied and Environmental Microbiology** **72**: 3482–3488.
- Pinto D, Santos MA and Chambel L (2015) Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. **Critical Reviews in Microbiology** **41**: 61–76.
- Rodrigues Neto J, Robbs CF and Yamashiro T (1987) A bacterial disease of guava (*Psidium guajava*) caused by *Erwinia psidii* sp. nov. **Fitopatologia Brasileira** **12**: 354–350.
- Santander RD, Català-Senent JF, Marco-Noales E and Biosca EG (2012) In planta recovery of *Erwinia amylovora* viable but nonculturable cells. **Trees** **26**: 75–82.
- Tattar TA and Tattar SJ (1999) Evidence for the downward movement of materials injected into trees. **Journal of Arboriculture** **25**: 325–332.
- Van Overbeek LS, Bergervoet JHW, Jacobs FHH and Van Elsas JD (2004) Ecology and

- Epidemiology The Low-Temperature-Induced Viable-But-Nonculturable State Affects the Virulence of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2. **Phytopathology** **94**: 469.
- Vrisman CM, Deblais L, Rajashekara G and Miller SA (2016) Differential Colonization Dynamics of Cucurbit Hosts by *Erwinia tracheiphila*. **Phytopathology** **6**: 684–692.
- Xu H-S, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ and Colwell RR (1982) Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. **Microbial Ecology** **8**: 313–323.
- Xu X, Miller SA, Baysal-Gurel F, Gartemann KH, Eichenlaub R and Rajashekara G (2010) Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. **Applied and Environmental Microbiology** **76**: 3978–3988.
- Zhang X-H, Ahmad W, Zhu X-Y, Chen J and Austin B (2021) Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms. **Marine Life Science & Technology** **3**: 189–203.

CAPÍTULO 2 - HERANÇA DA RESISTÊNCIA À SECA DE PONTEIROS CAUSADA POR *Erwinia psidii* EM *Eucalyptus* spp.

Camila R. Costa¹, Samuel A. Santos^{1,2}, Lúcio M.S. Guimarães³, Rodrigo S. Alves⁴, Rafael F. Alfenas¹, Norton Borges Júnior⁵, Acelino C. Alfenas^{1*}

¹ Laboratório de Patologia Florestal, Departamento de Fitopatologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, MG, Brasil.

² Plant Health Program, Research and Development, Asia Pacific Resources International Ltd. (APRIL), Pangkalan Kerinci, Riau 28300, Indonesia

³ Sanidade e Proteção Florestal, Suzano S.A., Itapetininga, SP, Brasil

⁴ Universidade Federal de Lavras, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café, Campus Universitário, 37200-900, Lavras, MG, Brasil

⁵ CMPC Celulose Riograndense, Pesquisa Florestal, 92703-470, Guaíba, RS, Brasil

* **Corresponding author.** Departamento de Fitopatologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, MG, Brasil.
E-mail: aalfenas@ufv.br (A.C. Alfenas).

RESUMO

A seca de ponteiros causadas por *Erwinia psidii* tem sido considerada uma importante doença em plantios comerciais de eucalipto (*Eucalyptus* spp.). O controle da doença é realizado por seleção e plantio de clones resistentes. Entretanto, o número de materiais genéticos de ponta e resistentes à bacteriose tem sido baixo. Uma alternativa para aumentar o número de clones resistentes é a realização de cruzamentos direcionados, sendo fundamental para o sucesso dessa estratégia o conhecimento da herança da resistência. Com esse objetivo, avaliou-se a resistência em 618 plantas, derivadas de sete famílias de irmãos-completos de *Eucalyptus* spp.. Plantas inoculadas das sete famílias variaram quanto à expressão dos sintomas, o que confirma que houve segregação para resistência a *E. psidii*. Seis modelos baseados nas hipóteses de herança monogênica ou controlada por dois ou três genes de efeito maior foram testados, entretanto nenhum deles explicou totalmente os padrões de segregação fenotípica observados. Dentre as sete famílias avaliadas, várias plantas não desenvolveram nenhum sintoma de infecção (resistência completa ou qualitativa), entretanto, um elevado número de plantas apresentou sintoma intermediário, que geralmente está associado à resistência quantitativa. Além disso, dentre os parâmetros genéticos estimados encontramos uma herdabilidade moderada ($0,15 < h_a^2 < 0,50$), o que reforça a hipótese de múltiplos genes envolvidos na resistência.

Palavras-chave: Resistência genética, melhoramento genético, eucalipto, cruzamentos interespecíficos, *dieback*.

INTRODUÇÃO

O eucalipto (*Eucalyptus* spp. L'Hér) é a essência florestal mais plantada no Brasil (IBÁ 2020). As plantações comerciais de eucalipto sustentam uma indústria multibilionária de produtos diversificados como polpa de celulose, papel, carvão para a indústria siderúrgica, dentre outros produtos sólidos (IBÁ 2020). Com a expansão da fronteira florestal e as mudanças climáticas, vários patógenos ganharam importância na eucaliptocultura ao longo dos anos. Dentre as principais doenças do eucalipto, destaca-se a seca de ponteiros causada por *Erwinia psidii*. A doença foi reportada pela primeira vez em eucalipto em 2011 na Argentina e no Uruguai (Coutinho *et al.* 2011). Subsequentemente, *E. psidii* também foi relatada causando danos em plantações de eucalipto no Brasil (Arriel *et al.* 2014). Desde então a doença tem ganhado importância e atualmente é considerada uma das principais doenças da cultura afetando as plantações comerciais de eucalipto no país.

Os principais sintomas observados em plantas de eucalipto são lesões necróticas arroxeadas ou bronzeadas no pecíolo e nervura principal das folhas jovens, morte dos ponteiros e perda da dominância apical (Arriel *et al.* 2014). *Erwinia psidii* coloniza os vasos do xilema, formando biofilme e é capaz de translocar acropetal e basipetalmente no caule (Caires *et al.* 2020). A bactéria também coloniza esclerênquima e parênquima de folhas e caule, entretanto não há relatos da colonização dos vasos do floema (Caires *et al.* 2020). Quando inoculada via sistema radicular, a bactéria também é capaz de penetrar nas raízes primárias e secundárias, atingindo o xilema (Montoya-Estrada *et al.* 2019). A colonização dos vasos, causa obstrução vascular e compromete o fluxo de água e sais minerais, causando a seca de ponteiros, principal sintoma da doença. Em casos de plantas altamente suscetíveis, o patógeno se multiplica rapidamente nos tecidos da planta causando redução do crescimento, seca de ponteiros que rapidamente evolui para morte descendente da planta, conhecida também como *die-back* (Coutinho *et al.* 2011).

Por se tratar de uma infecção sistêmica, uma vez que a planta está infectada não há medidas de controle curativo eficazes para a doença, podendo causar perdas significativas, devido à rápida multiplicação do patógeno nos tecidos e ausência de produtos químicos com eficácia comprovada. Em outras culturas, como a goiabeira, as principais medidas recomendadas para o controle de *E. psidii* são a poda e a queima dos ramos doentes (Marques *et al.* 2007). Entretanto, em eucalipto medidas de controle semelhantes são impraticáveis devido principalmente à grande extensão das áreas cultivadas e ao porte elevado das árvores. Sendo assim, a seleção e o plantio de materiais genéticos resistentes tem sido as alternativas mais eficientes de manejo da doença no campo.

A seleção de clones de *Eucalyptus* resistentes tem sido uma estratégia bem-sucedida no controle das principais doenças como ferrugem (*Austropuccinia psidii*), murcha de ceratocystis (*Ceratocystis fimbriata*), cancro do eucalipto (*Chrysophorte cubensis*) e murcha-bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) (Junghans *et al.* 2003, Guimarães *et al.* 2010, Mafia *et al.* 2014, Rosado *et al.* 2016). Para seca de ponteiros causada por *E. psidii*, considerada uma doença mais recente, já existem métodos eficazes de inoculação artificial em condições controlas e seleção de clones resistentes (Ferraz *et al.* 2016, Caires *et al.* 2019). Recentemente, fontes de resistência a *E. psidii* foram identificadas em múltiplas espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia*, o que indica potencial uso na introgressão de genes de resistência para o desenvolvimento de genótipos resistentes em materiais genéticos de importância econômica (Caires *et al.* 2019). Entretanto, atualmente a porcentagem de clones comerciais resistentes a *E. psidii* ainda é inferior a 25% (Lúcio M. S. Guimarães, Clonar Resistência a Doença Florestais, Cajuri, Brasil, comunicação pessoal), o que limita a escolha de clones disponíveis para plantio que sejam altamente produtivos, atendam à especificidade de cada ambiente e resistentes a *E. psidii*.

Uma alternativa para aumentar a frequência de clones resistentes a *E. psidii* seria direcionar cruzamentos com base no conhecimento do modelo de herança de resistência para

guiar os programas de melhoramento genético no desenvolvimento de materiais genéticos resistentes. Para elucidar esse patossistema, este trabalho objetivou estudar a herança da resistência a *E. psidii* em *Eucalyptus* spp. Para isso, avaliou-se a resistência a *E. psidii* em 618 plantas oriundas de cruzamentos interespecíficos entre quatro genitores de *Eucalyptus* spp., por meio de inoculação do patógeno em condições controladas e analisou-se o padrão de segregação fenotípica da resistência.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Os genitores utilizados nos cruzamentos foram previamente caracterizados quanto ao nível de resistência a *E. psidii* (Tabela 1), de acordo com escala de notas proposta por Ferraz *et al.* (2016). Os genitores AEC042 e 32864 foram considerados como resistentes (Ferraz *et al.* 2016; Lúcio M. S. Guimarães, Clonar Resistência a Doenças Florestais, Cajuri, Brasil, comunicação pessoal), enquanto os genitores 37350 e 37254 foram considerados suscetíveis (Ferraz *et al.* 2016). Todos os cruzamentos foram realizados no pomar de hibridação da CMPC Celulose Riograndense (Guaíba-RS, Brasil). Parte das sementes coletadas foi enviada à Clonar Resistência a Doenças Florestais LTDA (Cajuri, Minas Gerais, Brasil) para produção de mudas e inoculações em condições controladas.

Tabela 1. Genitores de *Eucalyptus* utilizados neste estudo e sua classificação quanto à resistência a *Erwinia psidii*

Genitor	Espécie/híbrido	Fenótipo
32864	<i>E. saligna</i>	Resistente
AEC0042	<i>E. urophylla</i>	Resistente
37254	<i>E. urophylla</i> × <i>E. maidenii</i>	Suscetível
37350	<i>E. urophylla</i> × <i>E. maidenii</i>	Suscetível

A semeadura foi realizada em tubetes, contendo substrato Tropstrato V6 (Vida Verde: composto de casca de pinus, fibra de coco, vermiculita, casca de arroz carbonizada, superfosfato simples, calcário, PG Mix 4.16.18 e nitrato de potássio), enriquecido com superfosfato simples (12g/kg) e Osmocote (12g/kg), acrescido de uma fina camada (aproximadamente 5 mm) de vermiculita. Os tubetes foram mantidos em casa de vegetação a 25 ± 3 °C. Trinta dias após a germinação, efetuou-se o desbaste, deixando apenas a muda mais vigorosa em cada tubete e repicando as mudas excedentes para novos tubetes, contendo o mesmo substrato. Após a repicagem, as mudas foram mantidas em casa de vegetação com nebulização intermitente e temperatura entre 25 a 32 °C por 30 dias. Em seguida, elas foram transferidas para casa de aclimação a 25 ± 3 °C, por 15 dias, quando foram novamente transferidas para a casa de crescimento e rustificação com temperatura média de 28 ± 5 °C, onde permaneceram durante 15 dias.

As mudas foram identificadas individualmente e transplantadas em sacola plástica com capacidade de 1 L, contendo o mesmo substrato descrito acima. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a 28 ± 5 °C por 30 dias até atingirem o ponto de inoculação. Foram obtidas 618 plantas de sete famílias provenientes de cruzamentos interespecíficos controlados (Tabela 2).

Tabela 2. Famílias oriundas dos cruzamentos controlados entre os genitores

Família	Cruzamento	Nº de plantas
A	AEC042 $\times$ 32864	97
B	32864 $\times$ AEC042	104
C	37350 $\times$ AEC042	88
D	AEC042 $\times$ 37350	94
E	37350 $\times$ 32864	100
F	AEC042 $\times$ 37254	101
G	37254 $\times$ 37254	34

Neste esquema de cruzamento, os cruzamentos recíprocos também foram realizados, representados pelas famílias A, B, C e D, para que pudéssemos avaliar o efeito materno na herança da resistência.

Inoculação

Utilizou-se o isolado LPF534 de *E. psidii* da coleção de cultura pura do Laboratório de Patologia Florestal – localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. Esse isolado foi obtido de *E. dunnii*, coletado em Guaíba, RS, Brasil, e previamente caracterizado por Arriel *et al.* (2014). Desde então, este tem sido o isolado mais utilizado em pesquisas do patossistema *Erwinia psidii* × *Eucalyptus* spp. (Arriel *et al.* 2014; Montoya-Estrada *et al.* 2019, Caires *et al.* 2020; Hermenegildo *et al.* 2021; Prereira *et al.* 2021).

Para inoculação, o isolado bacteriano foi reativado a partir de uma suspensão bacteriana, armazenada em glicerol (30%) a -80 °C, transferido para placa de Petri contendo meio de cultura sólido 523 (Kado & Heskett 1970). As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 28 °C por 48 h. A identidade das colônias bacterianas obtidas foi avaliada por meio de PCR de colônia usando o par de primers GapA 6F (CGTTTCGAAGGCACTGTTGAAGTC) GapA 6R (CGGTTTTCTGCGTTGCGCTAG), específico para *E. psidii* (Costa, 2017). Após a confirmação da identidade da cultura, as colônias puras foram multiplicadas e incubadas nas mesmas condições descritas acima. Em seguida, mudas de eucalipto aos 30 dias após o transplântio foram inoculadas seguindo protocolo proposto por Ferraz *et al.* (2016). Inicialmente fez-se um ferimento com alfinete estéril e em seguida impregnou-se as colônias bacterianas nas axilas de três pares de folhas do terço superior de cada planta, com o auxílio de um palito de madeira autoclavado. Plantas tratadas apenas com água destilada estéril foram usadas como testemunha. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação com

temperatura média de 28 ± 5 °C até o final do experimento. Plantas dos clones CLR360 (*E. urophylla* × *E. globulus*) e CLR375 (*E. grandis* × *E. urophylla*), previamente classificados como suscetíveis a *E. psidii* (Ferraz *et al* 2016; Lúcio M. S. Guimarães, Clonar Resistência a Doenças Florestais, Cajuri, Brasil, comunicação pessoal) foram utilizadas como comparadores de suscetibilidade.

Avaliação

A partir do sétimo dia após inoculação (dai), avaliou-se a severidade da doença a cada três dias, até aos 35 dai, usando-se uma escala de notas adaptada a partir de Ferraz *et al* (2016) contendo cinco classes de severidade (0, 1, 2, 3 e 4) de acordo com os diferentes sintomas causados por *E. psidii*, em que: Nota 0 = plantas assintomáticas ou imunes, Nota 1 = lesões nas folhas e/ou no pecíolo próximo ao ponto de inoculação sem afetar o crescimento da planta, Nota 2 = necrose ou cancro na haste principal sem afetar o crescimento, podendo ser observados também sintomas nas folhas, Nota 3 = perda da dominância apical sem morte do ponteiro, aumento do vigor das brotações laterais e/ou envassouramento, Nota 4 = morte apical e secado-ponteiro. As plantas classificadas com notas 0 ou 1 foram consideradas como resistentes, enquanto as plantas classificadas com as notas 2, 3 ou 4 foram consideradas como suscetíveis a *E. psidii*.

Re-inoculação

Para a confirmação dos resultados obtidos e evitar possível escape à doença, plantas classificadas como resistentes (notas 0 e 1) na primeira inoculação foram reconduzidas, podando-se ramos basais para redução da copa e fertilizadas com aproximadamente 100 mL da solução fertilizante Biofert Universal® diluído em água (1:100). Após 15 dias da última avaliação de severidade da doença, as plantas foram inoculadas novamente sob as mesmas

condições descritas anteriormente. A avaliação da severidade dessa nova inoculação também ocorreu como detalhado no tópico acima. Considerou-se o fenótipo final de cada planta, o observado na última avaliação da primeira inoculação para as plantas suscetíveis e o observado ao final da avaliação da segunda inoculação, para as plantas que foram anteriormente classificadas como resistentes.

Modelos de herança da resistência - mono ou oligogênica

Na tentativa de explicar a herança da resistência a *E. psidii* em *Eucalyptus* spp. foram testadas diferentes hipóteses de herança genética da resistência como o modelo monogênico, ou controlada por dois ou três genes de efeito maior. Assim, no modelo 1 considerou-se a característica como monogênica, sendo controlada por um gene dominante com dois alelos. Neste cenário, assumiu-se que os genitores resistentes AEC0042 e 32864 seriam heterozigotos (Aa), enquanto os genitores suscetíveis 37350 e 37254 seriam homozigotos recessivos (aa) (Tabela 2). No modelo 2, assumiu-se que a resistência a *E. psidii* tem herança monogênica recessiva, controlada por um gene com dois alelos, em que os genitores resistentes seriam homozigotos recessivos (aa) e os genitores suscetíveis seriam heterozigotos (Aa). Adicionalmente, nos modelos 3 e 4 assumiu-se que a herança é controlada por dois genes com dois alelos cada, sendo no terceiro modelo a resistência controlada por dois genes dominantes e complementares (A e B) e no quarto modelo a resistência é controlada por um gene dominante (A) e um gene recessivo (bb). Por fim, nos modelos 5 e 6 foi considerada herança controlada por três genes com dois alelos cada, sendo considerado como resistentes os indivíduos de genótipos com três genes dominantes complementares (A, B e C) no quinto modelo, enquanto para o sexto modelo a herança é controlada por dois genes dominantes (A e B) e um gene recessivo (cc) (Tabela 3).

Tabela 3. Modelos de herança genética da resistência a *Erwinia psidii* em *Eucalyptus* spp. testados.

Genes	Modelo	Genes envolvidos na resistência	Genótipo hipotético das plantas resistentes*
Um gene	1	Um gene dominante (A)	A_
	2	Um gene recessivo (a)	aa
Dois genes	3	Dois genes dominantes complementares (A e B)	A_B_
	4	Um gene dominante (A) e um gene recessivo (b)	A_bb
Três genes	5	Três genes dominantes complementares (A, B e C)	A_B_C_
	6	Dois genes dominantes (A e B) e um gene recessivo (c)	A_B_cc

*Em negrito, supostos genótipos de *Eucalyptus* spp. com genes de resistência a *E. psidii*.

Para cada modelo genético testado, calculou-se o valor de qui-quadrado (χ^2) a 5% de probabilidade usando o software GENES (Cruz 2013). Para a simulação dos modelos de herança da resistência, consideramos a Nota 2 como resistente, embora anteriormente tenha sido classificada como suscetível por Ferraz *et al.* (2016), uma vez que os sintomas classificados como Nota 2 não comprometeu o desenvolvimento das plantas avaliadas neste trabalho.

Modelos de herança da resistência - poligênica

Os componentes de variância e os parâmetros genéticos foram estimados pelo método Máxima Verossimilhança Restrita (REML) (Patterson & Thompson 1971); e os valores genotípicos (u+a+d) foram preditos pelo método Melhor Predição Linear não Viciada (BLUP) (Henderson 1975) usando o software Selegen-REML/BLUP (Resende 2016).

O modelo linear misto (escala de notas, levando em consideração cinco classes) e o modelo linear misto generalizado (levando em consideração o fenótipo resistente ou suscetível) associado à avaliação de famílias de irmãos completos, em delineamento inteiramente casualizado, foi determinado pela seguinte equação:

$$y = Xu + Zg + e,$$

em que y é o vetor de dados fenotípicos; u é o escalar referente à média geral; g é o vetor dos efeitos genotípicos individuais (assumidos como aleatórios) [$g \sim N(0, \sigma_g^2)$], em que σ_g^2 é a variância genotípica entre famílias de irmãos completos]; e e é o vetor de resíduos (aleatórios) [escala de notas: $e \sim Normal(0, \sigma_e^2)$; fenótipo: $e \sim Binomial(0, \sigma_e^2)$, em que σ_e^2 é a variância residual]. As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos.

A variância fenotípica individual ($\hat{\sigma}_p^2$), a herdabilidade individual no sentido restrito, obtida ignorando-se a fração (1/4) da variância genética de dominância (h_a^2), a herdabilidade da média de famílias, assumindo sobrevivência completa (h_{mp}^2) e a acurácia da seleção de famílias, assumindo sobrevivência completa (r_{gg}) foram obtidas pelas seguintes equações:

$$\hat{\sigma}_p^2 = \hat{\sigma}_g^2 + \sigma_e^2,$$

$$h_a^2 = 2\sigma_g^2/\sigma_p^2,$$

$$h_{mp}^2 = \sigma_g^2/[\sigma_g^2 + (\sigma_e^2/r)],$$

$$r_{gg} = \sqrt{h_{mp}^2},$$

em que r é o número de repetições.

RESULTADOS

Sintomas característicos das cinco classes de severidade da seca de ponteiros causada por *E. psidii* foram observados entre as plantas (Figura 1).

Com a exceção da progênie oriunda da autofecundação do genitor 37534 (G), em que todos os indivíduos foram suscetíveis, as demais famílias segregaram para resistência a *E. psidii* (Figura 2). Em todos os cruzamentos, o número de plantas suscetíveis foi maior que o de plantas resistentes, mesmo nas famílias A e B, as quais são oriundas de cruzamentos de genitores resistentes à doença (Figura 2).

Após projeção para cada um dos cenários propostos, observamos que os modelos 1 e 2 (monogênico dominante e monogênico recessivo) apresentaram bom ajuste para as famílias C, D e F, porém falharam para as demais famílias especialmente o modelo 2 nas famílias A e B (Tabela 4). Dentre os demais modelos testados, o modelo 3 que considera dois genes dominantes complementares e o modelo 6 que considera a herança controlada por três genes, se ajustaram apenas a família B, com mesma probabilidade. Nenhum modelo testado foi capaz de prever os padrões de segregação observados nas famílias A, E e G (Tabela 4).

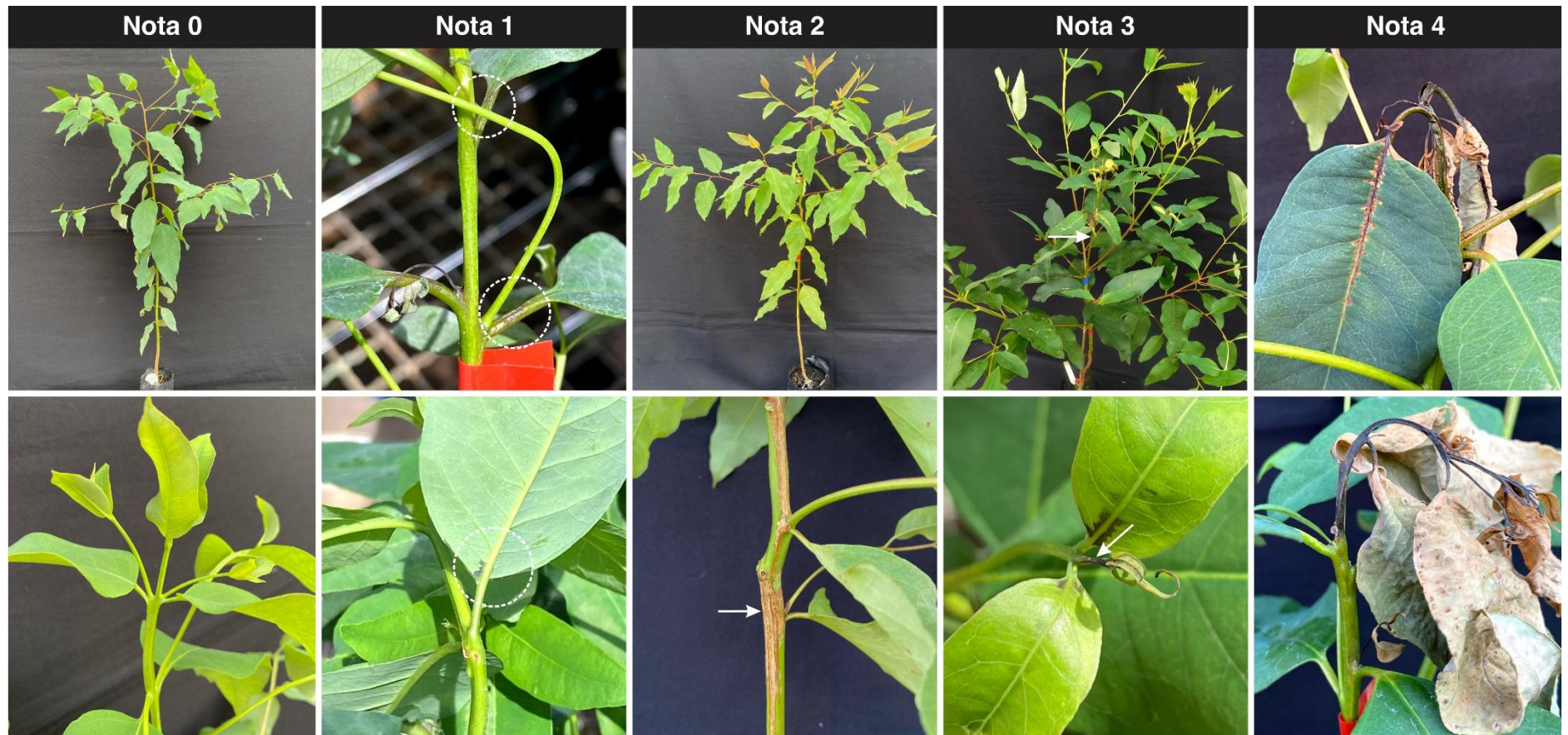


Figura 1. Sintomas observados em plantas de sete famílias de irmãos-completos oriundas de cruzamentos controlados entre quatro genitores de *Eucalyptus* spp. inoculadas com *Erwinia psidii*: Nota 0 = ausência de sintomas; Nota 1 = lesões nas folhas e/ou no pecíolo próximo ao ponto de inoculação sem afetar o crescimento da planta; Nota 2 = cancro na haste principal sem afetar o crescimento; Nota 3 = paralisação de crescimento do ponteiro apical (setas) e perda de dominância, aumento do vigor das brotações laterais e/ou envassouramento; Nota 4 = morte apical e seca-do-ponteiro.

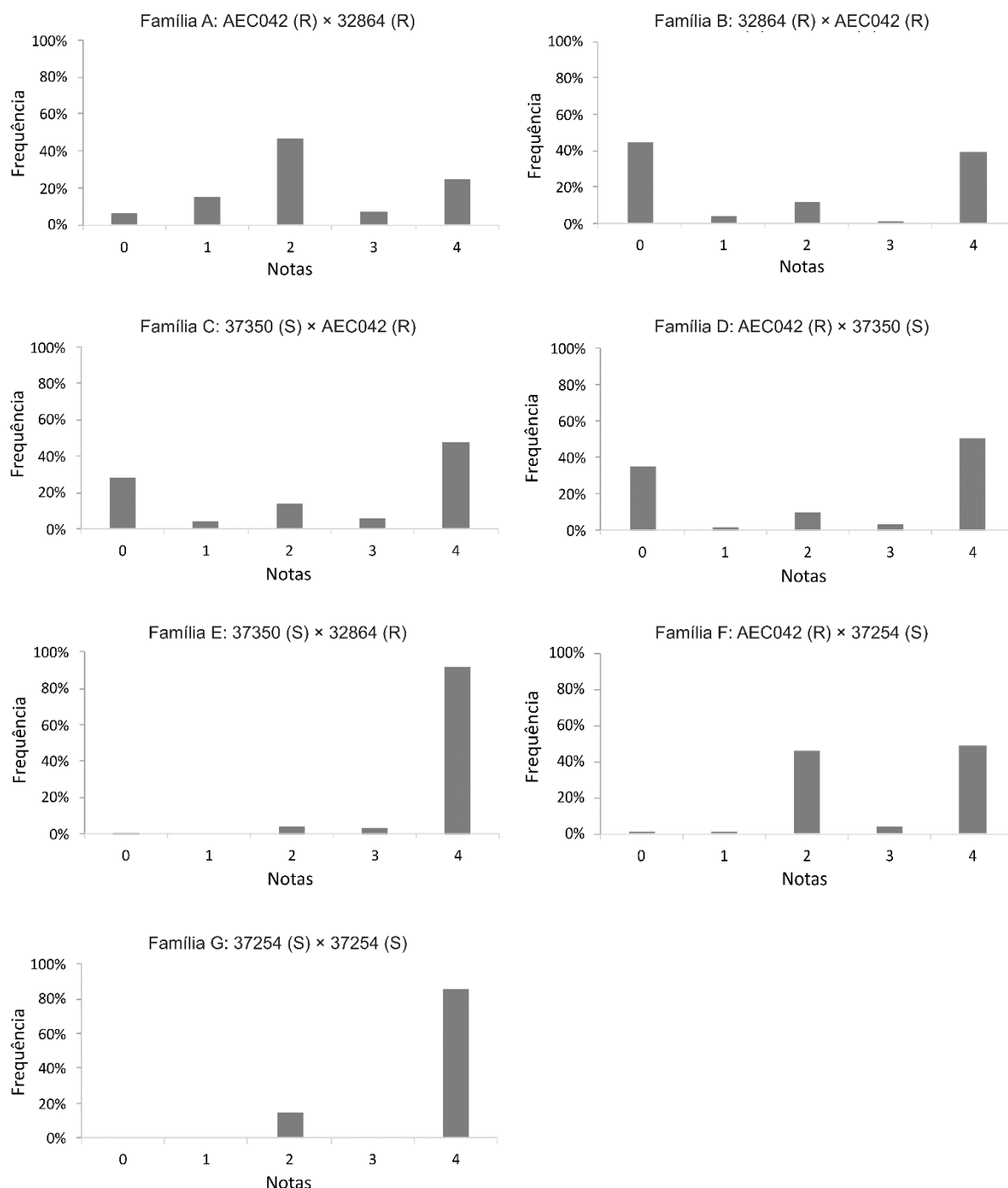


Figura 2. Distribuição fenotípica da resistência a *Erwinia psidii* observada em plantas de sete famílias de irmãos-completos oriundas de cruzamentos controlados entre quatro genitores de *Eucalyptus* [AEC042 = *E. urophylla*; 32864 = *E. saligna*; 37254 = *E. urophylla* × *E. globulus* subsp *maidenii*; e 37350 = *E. urophylla* × *E. globulus* subsp *maidenii*], previamente classificados como resistentes (R) e suscetíveis (S) (Ferraz *et al.* 2016; Lúcio M. S. Guimarães, Clonar Resistência a Doença Florestais, Cajuri, Brasil, comunicação pessoal).

Tabela 4. Avaliação da herança da resistência a *Erwinia psidii* em famílias de *Eucalyptus* spp. de acordo com seis modelos genéticos.

(continua)

Modelo 1: Monogênico dominante (A)									
Família	Cruzamento	N	Genótipo Hipotético	Hipótese	Observado		Esperado	χ^2	P (%)
					R (0 + 1 + 2)	S (3 + 4)	R : S		
A	AEC042 (R) × 32864 (R)	97	Aa × Aa	3:1	66	31	73 : 24	2,5	11,35
B	32864 (R) × AEC042 (R)	104	Aa × Aa	3:1	62	42	78 : 26	13,12	0
C	37350 (S) × AEC042 (R)	88	aa × Aa	1:1	41	47	44 : 44	0,41	52,24
D	AEC042 (R) × 37350 (S)	94	Aa × aa	1:1	43	51	47 : 47	0,68	40,92
E	37350 (S) × 32864 (R)	100	aa × Aa	1:1	5	95	50 : 50	81	0
F	AEC042 (R) × 37254 (S)	101	Aa × aa	1:1	48	53	50,5 : 50,5	0,24	61,88
G	37254 (S) × 37254 (S)	34	aa × aa	0:1	5	29	0 : 34	-	-
Modelo 2: Monogênico recessivo (a)									
Família	Cruzamento	N	Genótipo Hipotético	Hipótese	Observado		Esperado	χ^2	P (%)
					R (0 + 1 + 2)	S (3 + 4)	R : S		
A	AEC042 (R) × 32864 (R)	97	aa × aa	1:0	66	31	97 : 0	-	-
B	32864 (R) × AEC042 (R)	104	aa × aa	1:0	62	42	104 : 0	-	-
C	37350 (S) × AEC042 (R)	88	Aa × aa	1:1	41	47	44 : 44	0,41	52,24
D	AEC042 (R) × 37350 (S)	94	aa × Aa	1:1	43	51	47 : 47	0,68	40,92
E	37350 (S) × 32864 (R)	100	Aa × aa	1:1	5	95	50 : 50	81	0
F	AEC042 (R) × 37254 (S)	101	aa × Aa	1:1	48	53	50,5 : 50,5	0,24	61,88
G	37254 (S) × 37254 (S)	34	Aa × Aa	1:3	5	29	8 : 26	1,92	16,57

Tabela 4. Avaliação da herança da resistência a *Erwinia psidii* em famílias de *Eucalyptus* spp. de acordo com seis modelos genéticos.
(continuação)

Modelo 3: Dois genes dominantes complementares (A e B)									
Família	Cruzamento	N	Genótipo Hipotético	Hipótese	Observado		Esperado	χ^2	P (%)
					R (0 + 1 + 2)	S (3 + 4)	R : S		
A	AEC042 (R) × 32864 (R)	97	AaBb X AaBb	9:7	66	31	55 : 42	5,48	1,92
B	32864 (R) × AEC042 (R)	104	AaBb X AaBb	9:7	62	42	58 : 46	0,47	48,9
C	37350 (S) × AEC042 (R)	88	aabb x AaBb	1:3	41	47	22 : 66	21,88	0,02
D	AEC042 (R) × 37350 (S)	94	AaBb x aabb	1:3	43	51	24 : 70	21,57	0,03
E	37350 (S) × 32864 (R)	100	aabb x AaBb	1:3	5	95	25 : 75	21,33	0,03
F	AEC042 (R) × 37254 (S)	101	AaBb x aaBb	1:3	48	53	25 : 76	27,33	0
G	37254 (S) × 37254 (S)	34	aabb x aabb	0:1	5	29	0 : 34	-	-
Modelo 4: Um gene dominante (A) e um gene recessivo (b)									
Família	Cruzamento	N	Genótipo Hipotético	Hipótese	Observado		Esperado	χ^2	P (%)
					R (0 + 1 + 2)	S (3 + 4)	R : S		
A	AEC042 (R) × 32864 (R)	97	Aabb X Aabb	3:1	66	31	73 : 24	2,51	11,35
B	32864 (R) × AEC042 (R)	104	Aabb X Aabb	3:1	62	42	78 : 26	13,13	0,29
C	37350 (S) × AEC042 (R)	88	aaBb x Aabb	1:3	41	47	22 : 66	21,88	0,02
D	AEC042 (R) × 37350 (S)	94	Aabb x aaBb	1:3	43	51	24 : 70	21,57	0,03
E	37350 (S) × 32864 (R)	100	aaBb x Aabb	1:3	5	95	25 : 75	21,33	0,03
F	AEC042 (R) × 37254 (S)	101	Aabb x aaBb	1:3	48	53	25 : 76	27,33	0
G	37254 (S) × 37254 (S)	34	aaBb x aaBb	0:1	5	29	00:34	-	-

Tabela 4. Avaliação da herança da resistência a *Erwinia psidii* em famílias de *Eucalyptus* spp. de acordo com seis modelos genéticos.
(continuação)

Modelo 5: Três genes dominantes complementares (A, B e C)									
Família	Cruzamento	N	Genótipo Hipotético	Hipótese	Observado		Esperado	χ^2	P (%)
					R (0 + 1 + 2)	S (3 + 4)	R : S		
A	AEC042 (R) × 32864 (R)	97	AaBbCc x AaBbCc	27:37	66	31	41 : 56	26,58	0
B	32864 (R) × AEC042 (R)	104	AaBbCc x AaBbCc	27:37	62	42	44 : 60	12,95	0,03
C	37350 (S) × AEC042 (R)	88	aabbcc x AaBbCc	1:7	41	47	11 : 77	93,51	0
D	AEC042 (R) × 37350 (S)	94	AaBbCc x aabbcc	1:7	43	51	12 : 82	94,98	0
E	37350 (S) × 32864 (R)	100	aabbcc x AaBbCc	1:7	5	95	12 : 88	5,14	2,33
F	AEC042 (R) × 37254 (S)	101	AaBbCc x aabbcc	1:7	48	53	13 : 88	113,28	0
G	37254 (S) × 37254 (S)	34	aabbcc x aabbcc	0:1	5	29	0 : 34	-	-
Modelo 6: Dois genes dominantes (A e B) e um gene recessivo (cc)									
Família	Cruzamento	N	Genótipo Hipotético	Hipótese	Observado		Esperado	χ^2	P (%)
					R (0 + 1 + 2)	S (3 + 4)	R : S		
A	AEC042 (R) × 32864 (R)	97	AaBbcc x AaBbcc	9:7	66	31	55 : 42	5,48	1,29
B	32864 (R) × AEC042 (R)	104	AaBbcc x AaBbcc	9:7	62	42	58 : 46	0,48	48,9
C	37350 (S) × AEC042 (R)	88	aabbCc x AaBbcc	1:7	41	47	11 : 77	93,51	0
D	AEC042 (R) × 37350 (S)	94	AaBbcc x aabCc	1:7	43	51	12 : 82	94,98	0
E	37350 (S) × 32864 (R)	100	aabbCc x AaBbcc	1:7	5	95	12 : 88	5,14	2,33
F	AEC042 (R) × 37254 (S)	101	AaBbcc x aabbCc	1:7	48	53	13 : 88	113,28	0
G	37254 (S) × 37254 (S)	34	aabbCc x aabbCc	0:1	5	29	0 : 34	-	-

N = número de plantas; R = resistente; S = suscetível; χ^2 = valor de qui-quadrado; P = probabilidade.

A família B apresentou o menor valor genotípico para as características escala de notas e fenótipo (Tabela 5), o que indica que essa família é a mais adequada para a seleção de plantas resistentes a *E. psidii*. Em contrapartida, a família E foi a que teve o maior valor genotípico para as duas características avaliadas (Tabela 5), o que a caracteriza como a menos indicada para obtenção de plantas resistentes.

Tabela 5. Valores genotípicos e acurácias para as características: escala de notas e fenótipo quanto a resistência a *Erwinia psidii* avaliadas em sete famílias de irmãos-completos de *Eucalyptus* spp.

Família	Cruzamento ^a	Escala de notas		Fenótipo	
		u+a+d ^b	r _{gg} ^c	u+a+d	r _{gg}
A	AEC042 (R) × 32864 (R)	2,31	0,91	1,18	0,91
B	32864 (R) × AEC042 (R)	1,91	0,91	0,12	0,91
C	37350 (S) × AEC042 (R)	2,41	0,91	0,72	0,91
D	AEC042 (R) × 37350 (S)	2,36	0,91	0,59	0,91
E	37350 (S) × 32864 (R)	3,81	0,91	2,13	0,91
F	AEC042 (R) × 37254 (S)	2,97	0,91	2,09	0,91
G	37254 (S) × 37254 (S)	3,61	0,88	2,12	0,88

^a Genitores previamente classificados como resistentes (R) e suscetíveis (S) (Ferraz *et al.* 2016, Lúcio M. S. Guimarães, Clonar Resistência a Doença Florestais, Cajuri, Brasil, comunicação pessoal): AEC0042 = *E. urophylla*; 32864 = *E. saligna*; 37254 = *E. urophylla* × *E. globulus* subsp. *maidenii*; e 37350 = *E. urophylla* × *E. globulus* subsp. *maidenii*.

^b u+a+d = valor genotípico.

^c r_{gg} = acurácia

Como nenhum dos modelos de herança genética conseguiu explicar os padrões de segregação observados nas sete famílias estudadas, para avaliar o papel de genes de efeito menor na resistência a *E. psidii* em *Eucalyptus* spp., diferentes parâmetros genéticos foram estimados (Tabela 6). A herdabilidade no sentido restrito (h_a^2) da resistência a *E. psidii* foi estimada em 43% para escala de notas e em 28% para o fenótipo (Tabela 6). Para ambas as estimativas, encontrou-se uma elevada acurácia com valores de 98 e 99% (Tabela 6).

Tabela 6. Componentes de variância e parâmetros genéticos para as características: escala de notas e classificação quanto a resistência a *Erwinia psidii* avaliadas em sete famílias de irmãos-completos de *Eucalyptus* spp.

Componente/parâmetro ^a	Escala de notas ^b	Fenótipo ^c (R ou S)
$\hat{\sigma}_g^2$	0,5410	0,7349
$\hat{\sigma}_e^2$	2,0022	1,9275
$\hat{\sigma}_p^2$	2,5432	2,6625
h_a^2	0,43	0,28
h_{mp}^2	0,97	0,98
r_{gg}	0,98	0,99
μ	2,77	1,28 [†]

^a $\hat{\sigma}_g^2$: variância genotípica entre famílias de irmãos completos; $\hat{\sigma}_e^2$: variância residual; $\hat{\sigma}_p^2$: variância fenotípica; h_a^2 : herdabilidade individual no sentido restrito; h_{mp}^2 : herdabilidade da média de famílias; r_{gg} : acurácia da seleção de famílias; e μ : é a média geral. [†]: escala latente.

^b Estimativa baseada na classe de severidade conforme escala proposta por (Ferraz *et al.* 2016).

^c Estimativa baseado na classificação final do fenótipo: resistente (R) ou suscetível (S).

DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho sobre a herança da resistência à seca de ponteiros causada por *Erwinia psidii* em *Eucalyptus*.

Seis modelos baseados na hipótese de herança genética da resistência, controlada por um, dois ou três genes de efeito maior foram utilizados na tentativa de explicar a resistência a *E. psidii*. Embora alguns modelos apresentassem bom ajuste para determinadas famílias, nenhum deles conseguiu explicar totalmente os padrões de segregação fenotípica observados para todas as famílias estudadas, indicando que a resistência a *E. psidii* pode ter a influência de genes de efeito menor na resistência.

Dentre os parâmetros genéticos estimados, encontramos uma herdabilidade moderada ($0,15 < h_a^2 < 0,50$) associada a um elevado valor de acurácia (>98%), o que reforça a hipótese de múltiplos genes envolvidos na resistência (Resende & Alves 2020). É importante ressaltar que quanto maior o valor da acurácia, maior é a precisão de seleção e, conseqüentemente, maior o ganho genético (Resende & Duarte 2007). Outra observação que corrobora essa hipótese é o

elevado número de plantas com nota 2 observado nas famílias estudadas, especialmente nas famílias A e F. A nota 2 é considerada uma classe intermediária de resistência, caracterizada por lesão foliar e necrose ou cancro na haste principal, mas sem afetar o crescimento da planta (Ferraz *et al.* 2016).

Resistência quantitativa geralmente é controlada por vários genes associados a locos de característica quantitativa (QTLs) e confere um nível parcial de resistência, reduzindo a multiplicação do patógeno e/ou gravidade dos sintomas (Pilet-Nayel *et al.* 2017). Assim, de acordo com nossos resultados é plausível considerar que a resistência a *E. psidii* em *Eucalyptus* spp. é um fenômeno complexo controlada por múltiplos genes de efeito aditivo e não-aditivo (epistasia).

Epistasia tem sido frequentemente reportada em eucalipto para resistência a diferentes patógenos. Para *Chrysosporthe cubensis*, agente causal do cancro do eucalipto, genótipos de *E. grandis* e *E. urophylla* apresentaram estimativas individuais de herdabilidade no sentido restrito e amplo de 17 e 81%, respectivamente, sugerindo que a resistência ao cancro é quantitativa e altamente dependente de dominância e epistasia (Guimarães *et al.* 2010). Para a murcha de ceratocystis, causada por *Ceratocystis fimbriata*, uma das principais doenças da cultura, família oriunda de cruzamento controlado entre dois híbridos (*E. grandis* × *E. dunnii*) × (*E. urophylla* × *E. globulus*) apresentou alto grau de controle genético e baixa dominância alélica da característica e cinco QTLs relacionados à resistência foram mapeados (Rosado *et al.* 2016). Para a ferrugem causada por *Austropuccinia psidii*, estudos tem mapeado múltiplos QTLs em *Eucalyptus* spp. e *Corymbia* spp., indicando que o controle genético da resistência à ferrugem é complexo e dependente de múltiplos genes de efeito menor (Rosado *et al.* 2010, Lima *et al.* 2011, Alves *et al.* 2012, Santos *et al.* 2014, Butler *et al.* 2016, 2019, Yong *et al.* 2021). Além disso, estudos de expressão gênica por RNA-Seq em genótipos de *E. grandis* e *E. obliqua* contrastantes em relação ao nível de resistência a *A. psidii*, relataram expressão diferencial de

vários genes envolvidos em diversas rotas metabólicas relacionadas à defesa de plantas ao ataque de patógenos nos genótipos resistentes comparado aos suscetíveis (Santos *et al.* 2020, Sekiya *et al.* 2021, Yong *et al.* 2021).

Outra hipótese que pode explicar o padrão de segregação mais complexo observado nas famílias é a distorção de segregação (DS) das proporções fenotípicas esperadas, a qual é caracterizada como o desvio das frequências genotípicas observadas do valor esperado de Mendel (Lu *et al.* 2002). Esse fenômeno tem sido frequentemente observado em *Eucalyptus* e em maior proporção em famílias oriundas de cruzamentos interespecíficos (Verhaegen & Plomion 1996, Myburg *et al.* 2003, Brondani *et al.* 2006, Rosado *et al.* 2011, 2016, Kullán *et al.* 2012, Bartholomé *et al.* 2015), comparado à cruzamentos intraespecíficos (Bundock *et al.* 2000, Thamarus *et al.* 2002, Freeman *et al.* 2006, Hudson *et al.* 2012). Geralmente, a DS pode estar relacionada a diferentes fatores fisiológicos e genéticos, como a competição do tubo polínico (Arnold *et al.* 1993, Rahmé *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2011), incompatibilidade entre pólen e pistilo (Gore *et al.* 1990, Ellis *et al.* 1991, Dickinson *et al.* 2012), interações epistáticas negativas entre alelos (Törjék *et al.* 2006, Bikard *et al.* 2009), além da presença de genes letais em um estado homozigoto (Maheshwari & Barbash 2011). Desta forma, a hibridação aumenta a maioria desses fatores (Rieseberg & Carney 1998, Potts & Dungey 2004, Maheshwari & Barbash 2011), o que afeta a taxa de segregação fenotípica esperada em famílias provenientes de cruzamentos interespecíficos, conforme observado aqui. No presente estudo, dentre as sete famílias avaliadas apenas duas são oriundas de cruzamentos interespecíficos entre genitores de espécies puras (Famílias A e B), enquanto as demais são provenientes de cruzamentos entre espécie pura vs. híbrido (Famílias C, D, E, F) ou híbrido vs. híbrido (Família G) o que pode ter contribuído para a ocorrência da DS.

Diante do exposto, nossos resultados sugerem que a herança de *Eucalyptus* spp. a *E. psidii* é um fenômeno complexo, dependente de múltiplos genes de efeito aditivo e não-aditivos

(epistasia). Entretanto, estudos mais detalhados envolvendo mais famílias de *Eucalyptus* spp., bem como o mapeamento de QTLs serão importantes para melhor entendimento da complexidade do modo de herança da resistência a *E. psidii*.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho sugerem que a herança da resistência de *Eucalyptus* spp. a *E. psidii* é complexa e dependente de múltiplos genes de efeitos aditivos e não-aditivos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Clonar Resistência a Doenças Florestais pela multiplicação e cultivo do material vegetal, além da disponibilização das instalações de inoculação para condução experimental em condições controladas. A CMPC Celulose Riograndense, pelo fornecimento das sementes provenientes dos cruzamentos utilizadas neste experimento. À Claudia Montoya-Estrada pela revisão do texto. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado à Camila R. Costa (Código financeiro 001). A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa de pós-doutorado à Rodrigo S. Alves.

REFERÊNCIAS

- Alves AA, Rosado CCG, Faria DA, da Silva Guimarães LM, Lau D, Brommonschenkel SH, Grattapaglia D and Alfenas AC (2012) Genetic mapping provides evidence for the role of additive and non-additive QTLs in the response of inter-specific hybrids of *Eucalyptus* to *Puccinia psidii* rust infection. **Euphytica** **183**: 27–38.
- Arnold ML, Hamrick JL and Bennett BD (1993) Interspecific Pollen Competition and Reproductive Isolation in Iris. **Journal of Heredity** **84**: 13–16.

- Arriel DAA, Fonseca NR, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Mafia RG, Borges Júnior N, de Souza HP and Alfenas AC (2014) Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. **Forest Pathology** **44**: 255–265.
- Bartholomé J, Mandrou E, Mabiala A, Jenkins J, Nabihoudine I, Klopp C, Schmutz J, Plomion C and Gion J-M (2015) High-resolution genetic maps of *Eucalyptus* improve *Eucalyptus grandis* genome assembly. **New Phytologist** **206**: 1283–1296.
- Bikard D, Patel D, Metté C Le, Giorgi V, Camilleri C, Bennett MJ and Loudet O (2009) Divergent Evolution of Duplicate Genes Leads to Genetic Incompatibilities Within *A. thaliana*. **Science** **323**: 623–626.
- Brondani RP, Williams ER, Brondani C and Grattapaglia D (2006) A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. **BMC Plant Biology** **6**: 1–16.
- Bundock PC, Hayden M, Vaillancourt RE, Hayden M and Vaillancourt RE (2000) Linkage maps of *Eucalyptus globulus* using RAPD and microsatellite markers. **Silvae Genetica** **49**: 223–232.
- Butler JB, Freeman JS, Vaillancourt RE, Potts BM, Glen M, Lee DJ and Pegg GS (2016) Evidence for different QTL underlying the immune and hypersensitive responses of *Eucalyptus globulus* to the rust pathogen *Puccinia psidii*. **Tree Genetics & Genomes** **12**: 1–13.
- Butler JB, Potts BM, Vaillancourt RE, Lee DJ, Pegg GS and Freeman JS (2019) Independent QTL underlie resistance to the native pathogen *Quambalaria pitereka* and the exotic pathogen *Austropuccinia psidii* in *Corymbia*. **Tree Genetics & Genomes** **15**: 1–15.
- Caires NP, Guimarães LMS, Hermenegildo PS, Rodrigues FA, Badel JL and Alfenas AC (2020) Bidirectional colonization and biofilm formation by *Erwinia psidii* in eucalypt plants. **Plant Pathology** **69**: 549–558.

- Caires NP, Hermenegildo PS, Guimarães LMS, Mafia RG, Zauza EÂV, Júnior NB, Badel JL and Alfenas AC (2019) Host range of *Erwinia psidii* and genetic resistance of *Eucalyptus* and *Corymbia* species to this pathogen. **Forest Pathology** **49**: e12527.
- Coutinho TA, Brady CL, Vaart M Van Der, Venter SN, Telechea N, Rolfo M, Perez C and Wingfield MJ (2011) A new shoot and stem disease of eucalyptus species caused by *Erwinia psidii*. **Australasian Plant Pathology** **40**: 55–60.
- Cruz CD (2013) GENES - Software para análise de dados em estatística experimental e em genética quantitativa. **Acta Scientiarum - Agronomy** **35**: 271–276.
- Dickinson GR, Lee DJ and Wallace HM (2012) The influence of pre- and post-zygotic barriers on interspecific *Corymbia* hybridization. **Annals of Botany** **109**: 1215–1226.
- Ellis MF, Sedgley M and Gardner JA (1991) Interspecific Pollen-Pistil Interaction in *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae): The Effect of Taxonomic Distance. **Annals of Botany** **68**: 185–194.
- Ferraz HGM, Demuner GA, Guimarães LMS, Arriel DAA, da Silva AC, Junior NB, Mafia RG and Alfenas AC (2016) Methods of inoculation and evaluation of *Erwinia psidii* in eucalypt. **Forest Pathology** **46**: 240–247.
- Freeman JS, Potts BM, Shepherd M and Vaillancourt RE (2006) Parental and consensus linkage maps of *Eucalyptus globulus* using AFLP and microsatellite markers. **Silvae Genetica** **55**: 202–217.
- Gore P, Potts B, Volker P and Megalos J (1990) Unilateral Cross-Incompatibility in *Eucalyptus*: the Case of Hybridisation Between *E. globulus* and *E. nitens*. **Australian Journal of Botany** **38**: 383–394.
- Grattapaglia D and Kirst M (2008) *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist** **179**: 911–929.
- Guimarães LM da S, Resende MDV de, Lau D, Rosse LN, Alves AA and Alfenas AC (2010)

- Genetic control of *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* resistance to canker caused by *Chrysosporthe cubensis*. **Genetics and Molecular Biology** **33**: 525–531.
- Henderson CR (1975) Best Linear Unbiased Estimation and Prediction under a Selection Model. **Biometrics** **31**: 447.
- Hermenegildo PDS, Guimarães LMS, Badel JL, Marques AS, Alfenas AC, Velloso-Ferreira MA (2021) Improved evaluation of the genetic variability of Brazilian strains of *Erwinia psidii* with newly developed microsatellite markers. **Plant Pathology** **70**: 922–931.
- Hudson CJ, Kullán ARK, Freeman JS, Faria DA, Grattapaglia D, Kilian A, Myburg AA, Potts BM and Vaillancourt RE (2012) High synteny and colinearity among *Eucalyptus* genomes revealed by high-density comparative genetic mapping. **Tree Genetics & Genomes** **8**: 339–352.
- IBÁ - Indústria Brasileira de Árvores (2020) **Relatório Anual**. São Paulo, Brasil, p. 123. Available at <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-iba-2020.pdf>> Accessed on July 1, 2021.
- Junghans DT, Alfenas AC, Brommonschenkel SH, Oda S, Mello EJ and Grattapaglia D (2003) Resistance to rust (*Puccinia psidii* Winter) in *Eucalyptus*: mode of inheritance and mapping of a major gene with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics** **108**: 175–180.
- Kado CI and Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology** **60**: 969–976.
- Kullán ARK, van Dyk MM, Jones N, Kanzler A, Bayley A and Myburg AA (2012) High-density genetic linkage maps with over 2,400 sequence-anchored DArT markers for genetic dissection in an F2 pseudo-backcross of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*. **Tree Genetics and Genomes** **8**: 163–175.

- Lima BM, Teixeira JE, Gazaffi R, Garcia AA, Grattapaglia D, Valle RK and Camargo LE (2011) Identification of a novel QTL contributing to rust resistance in *Eucalyptus*. **BMC Proceedings** **5**: 1–3.
- Lu H, Romero-Severson J and Bernardo R (2002) Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. **Theoretical and Applied Genetics** **105**: 622–628.
- Mafia RG, Alfenas AC and Ferreira MA (2014) Avaliação da resistência do eucalipto à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. **Revista Árvore** **38**: 649–656.
- Maheshwari S and Barbash DA (2011) The Genetics of Hybrid Incompatibilities. **Annual Review of Genetics** **45**: 331–355.
- Marques ASA, Coelho MVS, Ferreira MÁ silva V, Damasceno JPS, Mendes AP and Vieira TM (2007) Seca dos ponteiros da goiabeira causada por *Erwinia psidii*: níveis de incidência e aspectos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Fruticultura** **29**: 488–493.
- Montoya-Estrada CN, Costa CR, Badel JL, Guimarães LMS and Alfenas AC (2019) Root infection and aerial colonization of eucalypt host plants by *Erwinia psidii*. **Tropical Plant Pathology** **44**: 251–257.
- Myburg AA, Griffin AR, Sederoff RR and Whetten RW (2003) Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F1 hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach. **Theoretical and Applied Genetics** **107**: 1028–1042.
- Patterson HD and Thompson R (1971) Recovery of inter-block information when block sizes are unequal. **Biometrika** **58**: 545–554.
- Pereira IC, Badel JL, Vidigal PMP, Sousa AA, Santos SA, Guimarães LMS, and Alfenas AC (2021) Prediction, structure characterization, and evolutionary analysis of *Erwinia psidii* putative type III effectors. **Plant Pathology** **70**: 555–566.

- Pilet-Nayel M-L, Moury B, Caffier V, Montarry J, Kerlan M-C, Fournet S, Durel C-E and Delourme R (2017) Quantitative Resistance to Plant Pathogens in Pyramiding Strategies for Durable Crop Protection. **Frontiers in Plant Science** 0: 1838.
- Potts BM and Dungey HS (2004) Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. **New Forests** 27: 115–138.
- Rahmé J, Widmer A and Karrenberg S (2009) Pollen competition as an asymmetric reproductive barrier between two closely related *Silene* species. **Journal of Evolutionary Biology** 22: 1937–1943.
- Resende MDV (2016) Software Selegen-REML/BLUP: A useful tool for plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 16: 330–339.
- Resende MDV and Alves RS (2020) Linear, generalized, hierarchical, bayesian and random regression mixed models in genetics/genomics in plant breeding. **Functional Plant Breeding Journal** 2: 1–31.
- Resende MDV and Duarte JB (2007) Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 37: 182–194.
- Rieseberg LH and Carney SE (1998) Plant hybridization. **New Phytologist** 140: 599–624.
- Rosado CCG, da Silva Guimarães LM, Faria DA, de Resende MDV, Cruz CD, Grattapaglia D and Alfenas AC (2016) QTL mapping for resistance to *Ceratocystis* wilt in *Eucalyptus*. **Tree Genetics & Genomes** 12: 1–10.
- Rosado TB, Tomaz RS, Ribeiro Junior MF, Rosado AM, Guimarães LM da S, Araújo EF de, Alfenas AC and Cruz CD (2010) Detection of QTL associated with rust resistance using IBD-based methodologies in exogamic *Eucalyptus* spp. populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 10: 321–328.
- Rosado TB, Tomaz RS, Rocha RB, Rosado AM, Alves AA, Araújo EF de, Alfenas AC and Cruz CD (2011) Detection and mapping of a lethal locus in a eucalyptus hybrid

- population. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **46**: 1021–1028.
- Santos MR, Guimarães LM da S, Resende MDV de, Rosse LN, Zamprogno KC and Alfenas AC (2014) Resistance of *Eucalyptus pellita* to rust (*Puccinia psidii*). **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **14**: 244–250.
- Santos SA, Vidigal PMP, Guimarães LMS, Mafia RG, Templeton MD and Alfenas AC (2020) Transcriptome analysis of *Eucalyptus grandis* genotypes reveals constitutive overexpression of genes related to rust (*Austropuccinia psidii*) resistance. **Plant Molecular Biology** **104**: 339–357.
- Sekiya A, Marques FG, Leite TF, Cataldi TR, de Moraes FE, Pinheiro ALM, Labate MTV and Labate CA (2021) Network Analysis Combining Proteomics and Metabolomics Reveals New Insights Into Early Responses of *Eucalyptus grandis* During Rust Infection. **Frontiers in Plant Science** **0**: 2165.
- Thamarus KA, Groom K, Murrell J, Byrne M and Moran GF (2002) A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre, and floral traits. **Theoretical and Applied Genetics** **2002 104:2 104**: 379–387.
- Törjék O, Witucka-Wall H, Meyer RC, von Korff M, Kusterer B, Rautengarten C and Altmann T (2006) Segregation distortion in *Arabidopsis* C24/Col-0 and Col-0/C24 recombinant inbred line populations is due to reduced fertility caused by epistatic interaction of two loci. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik** **113**: 1551–1561.
- Verhaegen D and Plomion C (1996) Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers. **Genome** **39**: 1051–1061.
- Yong WTL, Ades PK, Runa FA, Bossinger G, Sandhu KS, Potts BM and Tibbits JFG (2021) Genome-wide association study of myrtle rust (*Austropuccinia psidii*) resistance in *Eucalyptus obliqua* (subgenus *Eucalyptus*). **Tree Genetics & Genomes** **17**: 1–18.

Zhang X-L, Li X-X, Ni L-Y and Guo Y-H (2011) When interspecific prezygotic barriers break down: hybridization between two *Potamogeton* species (*P. wrightii* and *P. perfoliatus*) and comparison of the artificial and natural hybrids. **Plant Systematics and Evolution** **295**: 119–128.