

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Fenotipagem para resistência à mancha bacteriana em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

Jéssica Eliana Nogueira de Souza

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2022**

Jéssica Eliana Nogueira de Souza
Engenheira Agrônoma

**Fenotipagem para resistência à mancha bacteriana em tomateiro (*Solanum lycopersicum*
L.)**

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO ANGELO PIOTTO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento
de Plantas

Piracicaba
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Souza, Jéssica Eliana Nogueira de

Fenotipagem para resistência à mancha bacteriana em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) / Jéssica Eliana Nogueira de Souza. - - Piracicaba, 2022.

87p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Fenotipagem. 2. Análise de imagens. 3. Melhoramento de plantas. 4. Interação planta-patógeno. 5. Bacteriose 6. Hortaliças I. Título

Á Deus,
Ofereço.

Aos meus pais, Rose e Robson, e meus irmãos, Sthéfani e Nicolas,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus por me conceder os dons do Teu Espírito Santo, me acompanhar e me agraciar todos os dias com o dom da vida e a capacidade de ir atrás de meus sonhos, além de cuidar tão bem deles. À Nossa Senhora Aparecida e Santa Terezinha, por cuidar dos meus caminhos, me direcionando e abençoando sempre.

Agradeço à minha família, meus pais Rose e Robson, e meus irmãos, Sthefani e Nicolas por serem meu porto seguro e alento nas horas difíceis, minha âncora quando me senti perdida. Obrigada pelo incentivo, pelo amor e pelo grande exemplo que tenho. Obrigada por se alegrarem com minhas conquistas e estarem sempre presentes em minha vida! Vocês têm papel imensurável nessa conquista.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Angelo Piotto, que além do papel acadêmico, de direcionamento e instrução, tem um papel enorme de amizade e exemplo de ser humano que vou levar comigo. Obrigada por todos os ensinamentos, por me conduzir cientificamente e me apoiar e estar sempre presente, tanto no desenvolvimento dos trabalhos, como na vida pessoal.

Ao meu namorado, Luis Guilherme, por estar ao meu lado, ser paciente e compreensivo, me proporcionar apoio e alento nos momentos mais difíceis dessa caminhada, e por dividir as alegrias comigo e sempre me incentivar a permanecer firme e perseverante.

Aos meus amigos, Filipe Inácio, Felipe Couto, Mariana Vianna, Luciana Villela, Bruna Inforçato, Lais Mesquita, Laura Avancici, Brunna Melo, Ana Letycia Basso, que sempre estiveram ao meu lado não somente na jornada acadêmica, mas na vida, me apoiaram, foram compreensivos e incentivadores do meu crescimento. Obrigada por tudo!

Aos meus colegas de laboratório, João, Gustavo, Hellen, Mariana, Renata, Leonardo, Roberta, que contribuíram com conhecimento adquirido, pela colaboração para conseguir conduzir e concluir meu projeto. Aos técnicos do Laboratorio de Melhoramento de Hortaliças da ESALQ/USP, José Carmezini, Gustavo e Amaral pelo apoio nas conduções das atividades. Sem vocês este trabalho não se realizaria. Obrigada pela essencial contribuição de cada um.

Um agradecimento especial ao GVENCK, pela oportunidade de ser membro deste grupo que proporcionou desenvolvimento de habilidades e competências essenciais para minha carreira e para minha vida. Obrigada a todos os meus colegas do grupo, por todo trabalho realizado junto e pelas lições e experiências vividas.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro à minha pesquisa nesse período.

A todos os que esteve ao meu lado, minha eterna gratidão e amizade. Essa vitória é nossa!

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

~ *Isaac Newton*

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO	11
Referências.....	18
2 ESTRATÉGIAS DE FENOTIPAGEM PARA MANCHA-BACTERIANA EM TOMATEIRO	25
Resumo.....	25
Abstract	25
2.1. Introdução	26
2.2. Materiais e Métodos	29
2.2.1. Local do experimento e condições climáticas	29
2.2.2. Material vegetal	29
2.2.3. Material microbiano e inoculação.....	30
2.2.4. Instalação, condução e avaliação do experimento	31
2.2.5. Processamento de imagens para quantificação de sintomas nas folhas.....	34
2.2.6. Análises e modelo estatístico.....	38
2.2.7. Análise de correlação entre as variáveis.....	39
2.3. Resultados e Discussão.....	40
2.4. Conclusões	50
Referências.....	51
3 ESTIMATIVA DE PARÂMETROS GENÉTICOS RELATIVOS À RESISTÊNCIA A MANCHA BACTERIANA EM TOMATEIRO	57
Resumo.....	57
Abstract	57
3.1. Introdução	58
3.2. Materiais e Métodos	60
3.2.1. Condições e local dos experimentos.....	60
3.2.2. Material vegetal, inoculação e condução do experimento	60
3.2.3. Avaliação e análise de imagens	61
3.2.4. Procedimento de filtragem dos dados	61
3.2.5. Análises estatísticas e estimação dos parâmetros genéticos.....	61
3.3. Resultados e Discussão.....	62
3.4. Conclusões	70

Referências 70
ANEXOS..... 75

RESUMO

Fenotipagem para resistência à mancha bacteriana em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

O tomateiro é uma cultura bastante afetada por fatores bióticos e abióticos, devido ao seu processo evolutivo de domesticação que gerou grande afinamento de sua base genética. Dentre os fatores bióticos, a resistência a doenças é foco de muitas pesquisas, sendo a mancha bacteriana, causada por bactérias do gênero *Xanthomonas*, uma das doenças de maior importância para a espécie. No Brasil, as condições climáticas favorecem o desenvolvimento dessa doença, uma vez que elevadas temperaturas e umidade relativa contribuem para o estabelecimento da mancha bacteriana nos campos de produtores, ocasionando muitas perdas econômicas e em qualidade do produto. Essa relevância se deve ao fato de não haver métodos de controle eficazes e a inexistência de cultivares resistentes no mercado, dificultando o controle desta doença. Nos programas de melhoramento, o processo de avaliação e estimativa dos sintomas nas folhas ocorre de maneira visual, através do uso de escalas de notas ou diagramáticas, com intuito de distinguir e selecionar genótipos promissores. Entretanto, essa forma mensuração possui vieses que levam a uma baixa precisão dessas estimativas de área de lesão. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar diferentes estratégias de avaliação da incidência da mancha bacteriana em tomateiro e estruturar uma metodologia de fenotipagem mais precisa para suportar estudos genômicos e fenômicos a fim de encontrar uma cultivar com bom nível de resistência. Para isso, três avaliadores aplicaram três escalas visuais, sendo também realizada avaliação de imagens usando duas abordagens para estimar o nível de doença nos três acessos de tomateiro estudados, e assim realizar correlações e inferências sobre o comportamento e efeitos inseridos neste modelo. Em um segundo momento, em um ensaio maior, aplicamos a metodologia de análise de imagens para estimar componentes genéticos e entender o comportamento real dos genótipos em relação à doença e identificar aqueles com melhor desempenho. No primeiro estudo pudemos perceber que a avaliação visual é eficiente para realizar seleção massal e distinguir grupos característicos em populações grandes ou fases iniciais de um programa de melhoramento. Essa metodologia apresenta vieses que reduzem sua precisão, como efeito de avaliadores, subjetividade, incapacidade de o olho humano quantificar área lesionada de maneira acurada. Quando utilizamos da análise de imagens, podemos perceber que a etapa inicial de obtenção das imagens se faz extremamente importante uma vez que, obter imagens com boa qualidade, condições homogêneas de ambiente, deve gerar menos ruídos durante o processamento das mesmas. Devido a este fato, uma filtragem se fez necessária para eliminar dados superestimados. Assim, verificamos que a análise de imagens para fenotipagem da mancha bacteriana no tomateiro é uma alternativa viável, que pode ser implementada sem investimentos altos e que traz maior precisão às estimativas para suportar tomadas de decisões mais assertivas.

Palavras-chave: Melhoramento genético, Seleção visual, Análise de imagens, Precisão

ABSTRACT

Phenotyping for bacterial spot resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

The tomato plant is a crop greatly affected by biotic and abiotic factors, due to its evolutionary process of domestication that generated a large tapering of its genetic base. Among the biotic factors, resistance to diseases is the focus of much research, and bacterial spot, caused by bacteria of the genus *Xanthomonas*, is one of the most important diseases for the species. In Brazil, the climatic conditions favor the development of this disease, since high temperatures and relative humidity contribute to the establishment of bacterial spot in the fields of producers, causing many economic losses and in product quality. This is due to the fact that there are no effective control methods and there are no resistant cultivars in the market, making it difficult to control this disease. In breeding programs, the process of evaluation and estimation of leaf symptoms occurs visually, through the use of scoring scales or diagrammatic scales, in order to distinguish and select promising genotypes. However, this form of measurement has biases that lead to low precision in lesion area estimates. Therefore, the objective of this work was to analyze different strategies to evaluate the incidence of bacterial spot in tomato and to structure a more accurate phenotyping methodology to support genomic and phenomic studies in order to find a cultivar with a good level of resistance. To this end, three evaluators applied three visual scales, and image evaluation was also performed using two approaches to estimate the level of disease in the three tomato accessions studied, and thus perform correlations and inferences about the behavior and effects embedded in this model. In a second moment, in a larger trial, we applied the image analysis methodology to estimate genetic components and understand the real behavior of the genotypes in relation to disease and identify those with better performance. In the first trial we could see that visual evaluation is efficient to perform mass selection and to distinguish characteristic groups in large populations or early phases of a breeding program. This method has biases that reduce its accuracy, such as the effect of evaluators, subjectivity, and the inability of the human eye to quantify the injured area accurately. When we use image analysis, we can realize that the initial stage of image acquisition is extremely important, since obtaining images with good quality, homogeneous environmental conditions, should generate less noise during processing. Due to this fact, filtering was necessary to eliminate overestimated data. Thus, we verified that image analysis for bacterial spot phenotyping in tomato is a viable alternative, which can be implemented without high investments and that brings greater accuracy to the estimates to support more assertive decision making.

Keywords: Plant breeding, Visual selection, Image analysis, Precision

1. INTRODUÇÃO

Dentre as espécies olerícolas comerciais cultivadas, o tomateiro (*Solanum lycopersicum*) possui grande destaque, sendo uma *Solanaceae* de fundamental importância no cenário de produção de alimentos. É uma hortaliça muito sensível ao ataque de insetos e doenças, o que tem como consequência a redução de produção (ALVARENGA, 2013). Sua popularidade também se deve por estar relacionado á hábitos alimentares mais saudáveis, com elevado teor de compostos que trazem grandes benefícios à saúde, como vitaminas, sais minerais, carotenoides, como o licopeno, antioxidantes e substâncias que atuam prevenindo doenças (SOUZA et al., 2011; PALOMO et al., 2010).

Em uma visão mais histórica da cultura sabe-se que seu centro de origem é a região ocidental da América do Sul, compreendendo o norte do Equador, o sul do Chile, oeste pelo Oceano Pacífico e a leste pela Cordilheira dos Andes. Sua descoberta se deu no século XVI e a partir de então passou a ser cultivada na Europa como planta de ornamentação de jardins, sendo levada por colonizadores europeus que exploravam o continente sul-americano. Após, houve uma dispersão desta espécie pelo mundo, e cuja introdução no Brasil ocorreu no período que precedeu a primeira Guerra Mundial, através de imigrantes europeus que chegavam ao nosso país (ALVARENGA, 2013). O tomateiro era componente da dieta alimentícia dos povos de origem Asteca que habitavam partes do México (CHETELAT et al., 2009).

É uma espécie cultivada em todo mundo e sua cadeia produtiva apresenta dois grupos de importância econômica, sendo eles os destinados à indústria ou para o consumo *in natura*, que se particularizam em relação ao tipo de cultivo e cultivar, beneficiamento, comercialização, processamento e consumo (SANTOS, 2009). O segmento de maior concentração de produção são os frutos direcionados ao consumo *in natura*, alcançando valores produtivos de mais de dois milhões de toneladas, cerca de 77% de tudo que é produzido no Brasil.

O tomateiro possui uma grande importância no cenário mundial, tendo seu cultivo estendido a todo o mundo, sendo que nos últimos trinta anos a produção dobrou em escala mundial, o que pode estar relacionado com o aumento do consumo e também com as melhores condições e novas tecnologias empregadas no sistema produtivo da cultura. China, Índia, Estados Unidos e Turquia são os maiores produtores de tomate do mundo. A produção mundial de tomate ultrapassou as 180 milhões de toneladas em 2019, com o Brasil ocupando a 10ª colocação frente ao cenário mundial em relação à produção dessa hortaliça, detendo cerca 45% do total produzido no mundo (aproximadamente 4 milhões de toneladas) (FAOSTAT, 2021). Em um período de 22 anos (1983-2005) a produção *per capita* de tomate no mundo teve um incremento de 36%, enquanto que o consumo *per capita* apresentou um aumento de cinco quilos neste

período (de 14 kg.ano⁻¹ para 19 kg.ano⁻¹). Já entre os anos de 2006 e 2013 houve um aumento de 20% na produção e, em relação à área plantada, esse incremento foi de 10% somente, levando a um acréscimo de 10% na produtividade média de tomate (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007)

O ciclo de produção do tomate tem um impacto de R\$ 2 bilhões no agronegócio do Brasil, o que equivale a cerca de 16% do PIB produzidos pelo cultivo de hortaliças no país. Além disso, há outro fator econômico em que a cultura traz benefícios, que é a rede de empregos que ela gera, sendo uma fonte de renda importante para a movimentação econômica brasileira. Os estados que detêm a maior parte da produção no país são Goiás, Minas Gerais e São Paulo (ABCSEM, 2012; MATES, 2017). O tomateiro também é uma das espécies mais cultivadas em ambiente protegido, demandando um investimento inicial de cerca de R\$ 137 mil.ha⁻¹ de estufa, sendo que a produtividade pode alcançar 122 t.ha⁻¹, com um lucro em torno de 53% (AGRIANUAL, 2016). Já para o estabelecimento da cultura em campo este valor ainda é bastante elevado para instalação e gerenciamento da cultura durante seu ciclo, podendo ultrapassar o custo de R\$ 100 mil.ha⁻¹ (PAGLIUCA; DELEO, 2016).

O tomateiro é uma hortaliça de grande importância, porém é altamente sensível ao ambiente e por isso é considerada uma cultura de alto risco (CARVALHO et al., 2012). No Brasil, o tomateiro é cultivado, principalmente, em campo aberto, ficando expostas as adversidades ambientais, bem como ataque de pragas e doenças. Isso pode ser explicado em parte pelo próprio processo de domesticação da cultura, o qual levou ao estreitamento da base da genética da mesma e à perda de alelos de genes que poderiam ser importantes para sua adaptação ambiental.

O tomateiro teve seu processo de domesticação longe de seu centro de origem, o que somado ao fato de poucas plantas terem sido levadas para a Europa (tamanho efetivo reduzido), além e o próprio melhoramento genético, conduziram a cultura, em conjunto, à redução da sua base genética, ou seja, uma diminuição da variabilidade existente na espécie (BAI; LINDHOUT, 2007), sendo que menos de 10% da diversidade genética total está representada na espécie cultivada *S. lycopersicum* (MILLER; TANKSLEY, 1990; BAI; LINDHOUT, 2007; TAMBURINO, 2020). Em estudo, que observou a distribuição de SNPs ao longo do genoma da espécie cultivada *S. lycopersicum* e da espécie selvagem *S. pimpinellifolium*, foi relatado molecularmente este gargalo genético, ocorrido durante os processos de domesticação e seleção (LIN et al., 2014; BLANCA et al., 2015).

Sendo assim, ampliar essa base genética, incluindo espécies selvagens nos ciclos de cruzamentos, pode ajudar a injetar variabilidade aos programas de melhoramento (BERGOUGNOUX, 2014). Para tanto, estudos de diversidade em bancos de germoplasma,

aliando informações fenotípicas e moleculares dos genótipos, auxiliam na identificação e seleção de genitores para futuros cruzamentos (SOUSA et al., 2015). Conhecer a variância genética encontrada em um banco de germoplasma se faz altamente necessário em um programa de melhoramento cujo objetivo seja, por exemplo, produzir variedades de elevada produtividade e qualidade, aumentar a resistência a pragas e doenças e a tolerância a fatores abióticos (HERISON et al., 2017).

Dentre os estresses bióticos críticos para a cultura do tomateiro, a mancha bacteriana, causada por bactérias do gênero *Xanthomonas*, é uma das principais doenças que afetam cultivos desta hortaliça no Brasil. Os primeiros estudos desta doença apontaram que a mancha bacteriana era causada por uma única espécie denominada *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (STALL et al., 1994; VAUTERIN et al., 1995). Em estudos posteriores foi possível constatar que tal doença é causada por um complexo de bactérias do gênero *Xanthomonas* que compreende quatro espécies importantes, sendo elas: *Xanthomonas euvesicatoria* (raça T1), *X. vesicatoria* (raça T2), *X. gardneri* (raça T2) e *X. perforans* (raça T3) (JONES et al., 2004).

Esta doença foi relatada pela primeira vez na África do Sul, em 1914 (DOIDGE, 1921), sendo descrita no Brasil pela primeira vez por Ciccarone & Dowson, no ano de 1959 no Estado de São Paulo (RODRIGUES NETO et al., 1984). Segundo Araújo et al. (2017), a espécie *Xanthomonas perforans* é aquela que vem causando maiores prejuízos em cultivos de tomate no país, com relatos de menor frequência das raças T1, T2 e T3 (QUEZADO-DUVAL et al., 2005).

De forma complementar, ARAÚJO et al. (2017) e PEREIRA (2010), demonstraram também que a espécie mais abundante e com distribuição mais ampla no Brasil é a *Xanthomonas perforans*. Em um estudo, no qual 352 isolados de *Xanthomonas* spp. foram coletados nas maiores regiões de produção de tomate para processamento industrial no país, os resultados encontrados mostraram que 67,25% do total de isolados amostrados era da espécie *X. perforans* (ARAÚJO et al., 2011). Posteriormente, estes mesmos autores confirmaram seus resultados anteriores em outro estudo, em que em 92% dos isolados coletados em plantações de tomateiro do Brasil eram também de *X. perforans*. Também foi apontado pelo estudo que este predomínio de *X. perforans* nos locais estudados podem ser explicados devido à capacidade desta espécie em se adaptar em diversos ambientes e resistir a adversidades ambientais (ARAÚJO et al., 2017).

Os sintomas da mancha bacteriana podem ser observados na parte aérea em diversos estágios de desenvolvimento da planta (GITAITIS et al., 1992), sendo que os sintomas surgem inicialmente nas folhas mais velhas. As lesões são caracterizadas por pequenas manchas de aspecto encharcado (quanto maior a umidade mais evidente será este aspecto), de forma irregular e com as bordas definidas, e com o progresso da doença essas lesões podem se tornar deprimidas

e alterando sua cor, de verde-clara a um marrom-escuro, levando então a necrose dos tecidos afetados (GOODE, SASSER, 1980), e também as mesmas podem coalescer e as folhas podem secar e, sendo assim, os frutos ficarão expostos ao sol, levando a ocorrência de queimaduras. Quando a doença atinge a planta na fase de floração pode acarretar em queda de produção, uma vez que as flores caem da planta (LOPES, QUEZADO-SOARES, 1997).

As condições ideais para o estabelecimento da doença na cultura são umidade elevada e altas temperaturas (em torno de 20-30 °C), além de lugares onde há ventos mais fortes, fato este que favorece a disseminação do patógeno pela área. Porém, a espécie *X. gardneri* ocorre mais em temperaturas mais baixas (JONES et al., 1986), causando maior severidade a uma faixa de temperatura de 20 °C quando comparada com as demais espécies (ARAÚJO et al., 2010). A bactéria é introduzida no campo através de sementes contaminadas e mudas já doentes, havendo contaminação também por ervas daninhas e cultivo de campos infestados próximos (ABRAHAMIAN et al., 2019; JONES et al., 1986). A disseminação da doença no campo ocorre através da água da chuva e ventos e também através de operações mecânicas como enxertia, corte, amarrão, colheita, pulverização de produtos químicos (LINDEMANN; UPPER, 1985; McINNIS et al., 1988).

A mancha bacteriana causa grandes prejuízos econômicos pois, além de gerar perdas em produção, o custo com defensivos químicos é bastante alto havendo pouca eficiência dos mesmos, uma vez que existem alguns isolados de *Xanthomonas* spp. que apresentam resistência ao cobre, ingrediente ativo dos produtos aplicados nas lavouras (GRIFFIN et al., 2017; STRAYER-SCHERER et al., 2018). Outro ponto que dificulta o controle da doença é que a disseminação da mesma é altamente favorecida, quando em ambientes com condições ideais de desenvolvimento da bactéria, além de possuir outro canal de transmissão, através de sementes contaminadas.

Diante do cenário exposto acima, temos que as pesquisas visando desenvolvimento de cultivares resistentes têm sido o melhor caminho para controle dessa bacteriose. A resistência à mancha bacteriana mediada por genes de resistência (*R*) apresenta uma relação interdependente com genes de avirulência (*Avr*) presentes no patógeno (POTNIS et al., 2015), seguindo modelo de Teoria gene a gene proposto por FLOR (1971). Porém, esse tipo de resistência pode não ser eficiente pois as populações de bactérias evoluem constantemente, afetando a durabilidade da resistência nas plantas.

Uma alternativa mais durável seria buscar genótipos com resistência quantitativa à mancha bacteriana (POTNIS et al., 2015). Há genótipos que possuem alguns genes e QTLs de efeito maior conferindo resistência a mancha bacteriana. Em um trabalho feito por Yang et al. (2005), pode-se observar a complexidade da resistência a esta doença, uma vez que foi detectado

que o *locus* Rx3 descreve 41% da resistência à raça T1, e os *loci* Rx1 e Rx2 explicam uma porção menor da variação total. Foram ainda detectados outros *loci* diferentes dos acima citados que conseguiram explicar cerca de 11% da resistência.

Alguns de genes que conferem resistência à mancha bacteriana são conhecidos, porém não são efetivamente usados nos programas de melhoramento devido à escassez de marcadores moleculares para tal e pela constante evolução de *Xanthomonas* spp. (ADHIKARI et al., 2020). Além disso, a herança poligênica no controle da resistência à esta doença e a existência de genes com efeitos não-aditivos dificultam a elucidação em tais pesquisas (HUTTON et al., 2010).

As análises e ferramentas ômicas possibilitaram a descoberta de muitos genes candidatos, bem como a edição dos mesmos (BARRANGOU; DOUDNA, 2016) e o estudo da variabilidade genética natural (HUANG; HAN, 2014), se tornando um campo de extremo valor na ciência de identificação e seleção de novos alelos para o melhoramento (TESTER; LANGRIDGE, 2010). Esforços genômicos têm sido constantemente aplicados e aprimorados com intuito de desenvolver uma cultivar comercial com resistência satisfatória e durável. Em um recente estudo de associação genômica (GWAS) no tomateiro, foram combinados dados fenotípicos oriundos de análises de imagens e avaliação por escalas de notas, juntamente com dados moleculares obtidos através de GBS e de um chip *SolCAP Infinium Array*, no qual Niederheitmann (2021) encontrou 25 SNPs relacionados a resistência a mancha bacteriana, sendo que 15 deles nunca haviam sido citados em estudos anteriores. Do total de SNPs descobertos, a maioria estava relacionada aos dados de análise de imagens. Este trabalho foi o pioneiro no Brasil, utilizando genotipagem em um grande painel de acessos na cultura do tomateiro.

Ao longo do tempo, pesquisas envolvendo integração desses dados moleculares com informação em nível de fenótipo, permitiu estudos que conectam esses elementos, possibilitando um melhor entendimento acerca da associação entre genótipo-fenótipo. O estudo pioneiro que investigou a arquitetura genética em um painel de tomateiro, composto por *S. lycopersicum*, *S. lycopersicum* var *cerasiforme* e *S. pimpinellifolium*, mapeou regiões genômicas relacionadas a composição metabólicas de frutos (SAUVAGE et al., 2014) e pôde integrar de maneira prática dados em nível molecular com informações de fenótipo.

A seleção visual de genótipos superiores já é algo feito há muito tempo, porém apenas para uma ou algumas características específicas dada uma certa condição, não apresentando análises mais aprofundadas dos componentes que ligam genótipo ao fenótipo (PRATAP et al., 2019). Com o surgimento de novas tecnologias, tais como a análise de imagens, um novo campo se abre para novas estratégias de avaliação dos fenótipos, reduzindo a subjetividade da avaliação visual. Contudo, é necessário que haja variabilidade genética e

morfológica disponível para que estudos de diversidade e sejam realizados em uma população de base genética ampla.

De maneira geral, estes estudos devem ter início pelas coleções de germoplasma, as quais são armazenadas nos bancos de germoplasmas, cuja função é de manter genes com potencial para serem utilizados nos programas de melhoramento (CABRAL et al., 2010). De forma, realizar estudos de caracterização dos acessos de um banco de germoplasma seria uma estratégia de grande importância para manipular recursos genéticos (NEITZKE et al., 2010; FARIA et al., 2013).

Estudos de diversidade e caracterização em bancos de germoplasma, aliando informações fenotípicas e moleculares dos genótipos, auxiliam na identificação e seleção de genitores para futuros cruzamentos (SOUSA et al., 2015). Sendo assim, conhecer a variância genética encontrada em um banco de germoplasma se faz altamente necessário em um programa de melhoramento cujo objetivo seja, por exemplo, desenvolver genótipos com elevada produtividade e qualidade, resistência à pragas, doenças e estresses abióticos (HERISON et al., 2017).

Assim, estudar os parâmetros genéticos de uma população é fundamental para estabelecer qual método de melhoramento melhor se adequa àquela população, proporcionando maior eficiência no processo de seleção, tanto em fases iniciais como em etapas avançadas do programa. O conhecimento desses parâmetros é relevante, dada sua relação com genes que controlam caracteres quantitativos (CRUZ, CARNEIRO, 2006), permitindo o entendimento da arquitetura genética da população, a estimativa do ganho com a seleção, por meio das estimativas das variâncias genéticas e ambientais. De maneira geral, temos que variação fenotípica é decorrente da ação conjunta do efeito de genótipos mais o ambiente, e sendo assim, o fator ambiental pode encobrir o real efeito genético (BORÉM, 1998).

Atualmente, para avaliar a severidade da ocorrência da mancha bacteriana em tomateiro é utilizada a avaliação visual qualitativa ou quantitativa, feita através do uso de escalas de notas ou chaves de avaliação (COBB, 1892; HORSFALL E BARRATT, 1945; CHESTER, 1950; JAMES, 1971). Entretanto, esses métodos podem ser considerados empíricos e variáveis, visto que depende da capacidade de percepção de cada avaliador, bem como experiência e conhecimento dos sintomas da doença. Essa inconsistência na fenotipagem utilizando escalas de notas pode gerar falso-positivos quanto a análises quantitativas e nas técnicas de melhoramento, bem como em sua associação com dados genômicos (ADHIKARI et al., 2020).

Nos últimos anos, grandes passos foram dados a fim de buscar melhor entender e avaliar sintomas de doenças em plantas, através da aplicação de novas tecnologias, como o uso de

imagens para uma fenotipagem mais precisa e melhor resolução. O processo de fenotipagem precisa obter dados de qualidade e com a maior precisão possível, além de minimizar os custos com mão de obra através de processos automatizados, sensoriamento remoto e integração de dados, criando assim uma nova tendência na fenotipagem de plantas (COBB et al., 2013). Hoje já existem muitas pesquisas acerca deste tema, e plataformas e ferramentas foram desenvolvidas para uma fenotipagem mais precisa e de alto rendimento para aplicação em estudos genômicos (MIR et al., 2015).

A fenotipagem de alto rendimento (*high throughput plant phenotyping* – HTPP) tem evoluído consideravelmente, através do uso de tecnologias não invasivas (FURBANK et al., 2009; BERGER; PARENT; TESTER, 2010). Essas plataformas conseguem capturar e analisar dados em massa de maneira mais precisos. A implementação de fotos para detectar doenças começou na década de 1920, com utilização de imagem aérea (NEBLETTE, 1927), tendo seu uso persistindo e continuamente sendo desenvolvido e utilizado para tal finalidade (COLWELL, 1956; MANZER et al., 1967; WALLEN; JACKSON, 1971; JOHNSON et al., 2003).

O uso de imagens para detectar severidade no nível de ataque de doenças em plantas tem sido proposto, utilizando a refletância de ondas, tais como análises de imagens no espectro do visível (RGB), hiperespectrais, termográficas e baseados na fluorescência da clorofila (GIGLIOTTI et al., 2015). O grande pioneiro nos estudos nessa área foi Nilsson (1980, 1995), que coordenou pesquisas aplicando sensoriamento remoto e análises de imagens na avaliação de doenças (BOCK et al., 2010). Essa abordagem já vem mostrando resultados satisfatórios com estimativas que denotam confiabilidade e precisão quanto a severidade da doença (LINDOW; WEBB, 1983; MARTIN; RYBICKI, 1998). Em outro estudo, Bock et al. (2008) também obtiveram resultados consideravelmente confiáveis, com alto grau de correlação com nível de infecção para o cancro cítrico.

A fenômica para detectar mancha bacteriana permitirá, além de dados mais acurados ou quantificação da variação mais precisos, também obter dados que são reproduzíveis. Tais fatos permite que a arquitetura genética implícita da resistência a esta doença seja melhor entendida para os estudos de mapeamento associativo, genômica e mapeamentos de QTL (ADHIKARI et al., 2020). Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência de diferentes métodos de fenotipagem para nível de sintomas de mancha bacteriana em tomateiro, utilizando escalas de notas e fenotipagem por análise de imagens.

Referências

- ABRAHAMIAN, Peter; JONES, Jeffrey B.; VALLAD, Gary E. Efficacy of copper and copper alternatives for management of bacterial spot on tomato under transplant and field production. **Crop Protection**, v. 126, p. 104919, 2019.
- ADHIKARI, Pragya et al. Advances and challenges in bacterial spot resistance breeding in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1734, 2020.
- AGRIBUS. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2016. 502 p.
- ALVARENGA, M. A. R. Produção em campo, casa de vegetação e hidroponia. 2ª Ed. Lavras. **Editora Universitária de Lavras**, p. 49- 59, 2013.
- ARAÚJO, E. R.; PEREIRA, R. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; CAFÉ-FILHO, A. C.; MOITA, A. W.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*. *Acta Horticulturae*, The Hague, v. 914, p. 39-42, 2011.
- ARAÚJO, E. R. et al. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*. In: **III International Symposium on Tomato Diseases 914**. 2010. p. 39-42.
- ARAÚJO, E. R. et al. Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, p. 159-168, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMERCIO DE SEMENTES E MUDAS (ABCSEM). 6 ° Seminário nacional: tomate de mesa. 2012. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br>. Acesso em 15 abril 2021.
- BAI, Yuling; LINDHOUT, Pim. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? **Annals of botany**, v. 100, n. 5, p. 1085-1094, 2007.
- BARRANGOU, R.; DOUDNA, J. A. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 933-941, 2016.
- BERGER, Bettina; PARENT, Boris; TESTER, Mark. High-throughput shoot imaging to study drought responses. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 13, p. 3519-3528, 2010.
- BERGOUGNOUX, Véronique. The history of tomato: from domestication to biopharming. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 1, p. 170-189, 2014.
- BLANCA, José et al. Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 1-19, 2015.

- BOCK, C. H. et al. Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. **Critical reviews in plant sciences**, v. 29, n. 2, p. 59-107, 2010.
- BOCK, C. H. et al. Visual rating and the use of image analysis for assessing different symptoms of citrus canker on grapefruit leaves. **Plant Disease**, v. 92, n. 4, p. 530-541, 2008.
- BORÉM, A. Melhoria de Plantas. 2.ed. Viçosa: Editora UFV, 1998, 453p.
- CABRAL, Pablo Diego Silva et al. Quantification of the diversity among common bean accessions using Ward-MLM strategy. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 10, p. 1124-1132, 2010.
- CARVALHO, J.L.; PAGLIUCA, L.G. Tomate, um mercado que não pára de crescer globalmente. Hortifruti Brasil, p. 6-14, junho. 2007.
- CARVALHO, J. R. et al. Seletividade de fungicidas utilizados na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a *Trichogramma pretiosum*. **Nucleus**, Ituverava, v. 9, n. 2, p. 1-8, 2012.
- CHETELAT, R.T.; PERTUZÉ, R.A.; FAÚNDEZ, L.; GRAHAM, E.B.; JONES, C.M. Distribution, ecology and reproductive biology of wild tomatoes and related nightshades from the atacama desert region of northern. *Euphytica*, Chile, v. 167, n. 1, pp. 77-93, 2009.
- CHESTER, Kenneth Starr et al. Plant disease losses: their appraisal and interpretation. **Plant disease losses: their appraisal and interpretation.**, n. 193, 1950.
- COBB, Joshua N. et al. Next-generation phenotyping: requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype–phenotype relationships and its relevance to crop improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 4, p. 867-887, 2013.
- COBB, Nathan Augustus et al. Contributions to an economic knowledge of the Australian rusts (Uredineae). **Agricultural Gazette of New South Wales**, v. 3, p. 44-48, 1892.
- COLWELL, R. et al. Determining the prevalence of certain cereal crop diseases by means of aerial photography. **Hilgardia**, v. 26, n. 5, p. 223-286, 1956.
- CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.S.C. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2006. v.2. 586p.
- DOIDGE, Ethel M. A tomato canker. **Ann. Appl. Biol**, v. 7, n. 4, p. 407-30, 1921.
- FARIA, P. N. et al. Estudo da variabilidade genética de amostras de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.) existentes num banco de germoplasma: um caso de estudo. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 17-22, 2013.
- FLOR, H. H.; COMSTOCK, V. E. Flax Cultivars with multiple Rust-conditioning Genes 1. **Crop Science**, v. 11, n. 1, p. 64-66, 1971.

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – STATISTICS DIVISION – FAOSTAT. Crops. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat>. Acesso em: 10 maio 2021.
- FURBANK, Robert T. et al. C4 rice: a challenge for plant phenomics. **Functional Plant Biology**, v. 36, n. 11, p. 845-856, 2009.
- GIGLIOTI, Éder A.; SUMIDA, Ciro H.; CANTERI, Marcelo G. Disease phenomics. In: **Phenomics**. Springer, Cham, 2015. p. 101-123.
- GITAITIS, Ron et al. Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. **Plant Disease**, v. 76, n. 7, p. 651-656, 1992.
- GRIFFIN, Karina et al. Copper-tolerance in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas* spp. and the control of diseases associated with these pathogens in tomato and pepper. A systematic literature review. **Crop Protection**, v. 96, p. 144-150, 2017.
- GOODE, M. J.; SASSER, M. Prevention – the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. **Plant Disease**, v.64, n.9, p.831-834, 1980.
- HERISON, Catur et al. Genetic diversity analysis in 27 tomato accessions using morphological and molecular markers. **AGRIVITA, Journal of Agricultural Science**, v. 40, n. 1, p. 36-44, 2017.
- HORSFALL J. G.; BARRATT R. W. An improved grading system for measuring plant diseases. **Phytopathology**, 35:655-655, 1945.
- HUANG, Xuehui; HAN, Bin. Natural variations and genome-wide association studies in crop plants. **Annual review of plant biology**, v. 65, p. 531-551, 2014.
- HUTTON, Samuel F. et al. Identification of QTL associated with resistance to bacterial spot race T4 in tomato. **Theoretical and applied genetics**, v. 121, n. 7, p. 1275-1287, 2010.
- JAMES, Clive. **A manual of assessment keys for plant diseases**. American Phytopathological Society, 1971.
- JOHNSON, Garrett M.; FAIRCHILD, Mark D. Rendering HDR images. In: **Color and Imaging Conference**. Society for Imaging Science and Technology, 2003. p. 36-41.
- JONES, J. B. et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. **Phytopathology**, v. 76, n. 4, p. 430-434, 1986.
- JONES, Jeffrey B. et al. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and applied microbiology**, v. 27, n. 6, p. 755-762, 2004.

- LIN, Tao et al. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. **Nature genetics**, v. 46, n. 11, p. 1220-1226, 2014.
- LINDEMANN, J.; UPPER, C. D. Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1229-1232, 1985.
- LINDOW, S. E.; WEBB, R. R. Quantification of foliar plant disease symptoms by microcomputer-digitized video image analysis. **Phytopathology**, v. 73, n. 4, p. 520-524, 1983.
- LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M.. Doenças bacterianas das hortaliças. **Brasília: EMBRAPA, CNPH**, 1997.
- MANZER, Franklin Edward et al. Aerial photographic methods of potato disease detection. 1967.
- MARTIN, Darrin P.; RYBICKI, Edward P. Microcomputer-based quantification of maize streak virus symptoms in *Zea mays*. **Phytopathology**, v. 88, n. 5, p. 422-427, 1998.
- MATES, A. P. K. Mecanismos de controle da mancha bacteriana do tomateiro exercido por rizobactérias. 2017. 55p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Roraima, 2017.
- McINNIS, T. B. et al. Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. **Plant disease**, v. 72, n. 7, p. 575-579, 1988.
- MILLER, J. C.; TANKSLEY, S. D. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. **Theoretical and applied genetics**, v. 80, n. 4, p. 437-448, 1990.
- MIR, Reyazul Rouf et al. Harnessing genomics through phenomics. In: **Phenomics in Crop Plants: Trends, Options and Limitations**. Springer, New Delhi, 2015. p. 273-283.1177-1184, 2015.
- NEBLETTE, C. B. Aerial photography for the study of plant diseases. **Photo-Era Magazine**, v. 58, p. 346, 1927.
- NEITZKE, Raquel Silviana et al. Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 47-53, 2010.
- NIEDERHEITMANN, Mariana. **Fenotipagem e associação genômica ampla para resistência à mancha bacteriana do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- NILSSON, H. E. Remote sensing and image processing for disease assessment. **Protection ecology**, 1980.
- NILSSON, H. Remote sensing and image analysis in plant pathology. **Annual review of phytopathology**, v. 33, n. 1, p. 489-528, 1995.

- PAGLIUCA ,L. G.; DELEO, J. P. B. Especial Tomate: Gestão Sustentável. **Hortifruti Brasil**, 157:11-14, 2016.
- PALOMO, Iván et al. El consumo de tomates previene el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer: antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción. **Idesia (Arica)**, v. 28, n. 3, p. 121-129, 2010.
- PEREIRA, Roberta da Cruz. Ocorrência, identificação e caracterização das espécies de *Xanthomonas*, causadoras de mancha bacteriana em tomate para mesa no Brasil. 2010.
- POTNIS, Neha et al. Bacterial spot of tomato and pepper: Diverse *X* anthomonas species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. **Molecular plant pathology**, v. 16, n. 9, p. 907-920, 2015.
- PRATAP, Aditya et al. Using plant phenomics to exploit the gains of genomics. **Agronomy**, v. 9, n. 3, p. 126, 2019.
- QUEZADO-DUVAL, Alice Maria; LOPES, Carlos Alberto; JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela. Avaliação de produtos alternativos para o controle da mancha-bacteriana em tomateiro para processamento industrial. **Embrapa Hortaliças-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2005.
- RODRIGUES NETO, J.; SUGIMORI, M. H.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. Raças de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.51, n.1/4, 1984.
- SANTOS, F.F.B. Obtenção e seleção de híbridos de tomate visando à resistência ao Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV). 75 p. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia), Instituto Agronômico de Campinas, 2009.
- SAUVAGE, Christopher et al. Genome-wide association in tomato reveals 44 candidate loci for fruit metabolic traits. **Plant physiology**, v. 165, n. 3, p. 1120-1132, 2014.
- SOUZA, A. de A. et al. Caracterização química e física de frutos de diferentes acessos de tomateiro em casa de vegetação. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 5, n. 2, 2011.
- SOUSA, C. A. F.; DIAS, B. B. A.; MARTINS, P. K.; MOLINARI, H. B. C.; KOBAYASHI, A. K.; JÚNIOR, M. T. S. Nova abordagem para a fenotipagem de plantas: conceitos, ferramentas e perspectivas (New approach for plant phenotyping: concepts, current tools and perspectives). *Revista Brasileira de Geografia Física*, v. 8, p. 660-672, 2015.
- STALL, R. E. et al. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 47-53, 1994.

- STRAYER-SCHERER, A. et al. Advanced copper composites against copper-tolerant *Xanthomonas perforans* and tomato bacterial spot. **Phytopathology**, v. 108, n. 2, p. 196-205, 2018.
- TAMBURINO, Rachele et al. Cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) suffered a severe cytoplasmic bottleneck during domestication: Implications from chloroplast genomes. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1443, 2020.
- TESTER, Mark; LANGRIDGE, Peter. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 818-822, 2010.
- VAUTERIN, L. et al. Reclassification of *xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.
- WALLEN, V. R.; JACKSON, H. R. Aerial photography as a survey technique for the assessment of bacterial blight of field beans. **Can. Plant Dis. Surv.**, v. 51, n. 4, p. 163-169, 1971.
- YANG, W.; FRANCIS, D. M. Marker-assisted selection in pyramiding resistance to bacterial speck and bacterial spot in tomato. **Phytopathology**, v.95, p.519-527, 2005.

2 ESTRATÉGIAS DE FENOTIPAGEM PARA MANCHA-BACTERIANA EM TOMATEIRO

Resumo

A segurança alimentar é uma preocupação para os próximos anos, uma vez que a população tende a crescer em um ritmo em que a produção de alimentos pode não conseguir acompanhar. Sendo assim, o melhoramento genético tem um papel fundamental para garantir que a produção de alimentos cresça, mesmo sem praticamente expandir em área plantada. O tomateiro é uma espécie hortícola de grande importância e alvo de muitas pesquisas, principalmente visando resistência a algumas doenças. A mancha bacteriana tem uma importância econômica forte, pois causa grandes prejuízos aos produtores em todo o mundo. Seus sintomas são vistos principalmente nas folhas, onde lesões amarronzadas vão surgindo, podendo coalescer e reduzir área fotossintética, dependendo da pressão do patógeno e reação da planta. A maneira de avaliação no melhoramento para resistência a essa doença é predominantemente visual, sendo uma metodologia não tão precisa para fins de estudos mais robustos. Com isso, o objetivo deste trabalho foi analisar o desempenho de diferentes formas de avaliação, com notas e análise de imagem, e verificar sua precisão de acordo com o percentual real de área foliar afetada pela mancha bacteriana. A avaliação foi realizada por três avaliadores, com diferentes perfis, utilizando três escalas visuais: a de Mello et al. (1997), a escala de Horsfall e Barrat (1945) e uma escala prática proposta pelo LMH da Esalq/USP. Foram utilizados três genótipos com comportamento bem definidos quanto à resistência (susceptível, intermediário e resistente). As plantas foram coletadas e escaneadas para obtenção das imagens e posterior avaliação. Dois softwares foram usados para as análises de imagens, o QUANT e o pacote FIELImageR analisado no software R, sendo assim, uma análise em fatorial com três fatores. Os dados reais de doença para as correlações foram obtidos pelo software QUANT, com análises realizadas de forma individual, tratando cada imagem a imagem de maneira manual. Como resultados, confirmamos a subjetividade da aplicação de escalas visuais como ferramenta para quantificação de área afetada pela mancha bacteriana no tomateiro. Esse tipo de abordagem fornece redução na precisão pois depende de fatores externos, como experiência do avaliador, treinamento e conhecimento dos sintomas da doença. Além disso, o efeito de avaliador se mostrou forte, mostrando que o olho humano não é capaz de detectar e quantificar a área lesionada e que cada um possui uma percepção em relação a esse nível de sintomas foliares. A escala prática proposta pelo LMH da Esalq/USP mostrou os melhores resultados, pois é feita uma calibração antes do processo de avaliação, ao passo que a escala de Mello et al. (1997) também foi eficiente pois conta com um modelo diagramático com imagens, as quais ajudam na avaliação visual realizada por cada avaliador. A escala de Horsfall e Barrat (1945) apesar de ser bastante utilizada, teve baixa precisão, quando comparada com a área real da doença. A análise de imagens apresentou bom resultados, sendo necessária também uma filtragem de dados cujas imagens estavam com ruídos e tiveram informações superestimadas. Sendo assim, uso imagens é uma alternativa eficiente, mas o processo de obtenção das mesmas precisa ser desenhado de forma a reduzir os efeitos do ambiente nas fotos, tendo condições mais homogêneas possível, com intuito de produzir estimativas mais precisas quando for possível.

Palavras-chave: Avaliação visual, Avaliação por imagem, Calibração.

PHENOTYPING STRATEGIES FOR BACTERIAL SPOT IN TOMATO

Abstract

Food security is a concern for the coming years, since the population tends to grow at a rate that food production may not keep up. Thus, genetic improvement plays a key role to ensure that food production grows, even without practically expanding in planted area. The tomato plant is a very important horticultural species and the target of much research, mainly aiming at resistance to some diseases. Bacterial spot has a strong economic importance, as it causes great losses to growers all over the world. Its symptoms are seen mainly on the leaves, where brownish lesions appear, and may coalesce and reduce the photosynthetic area, depending on the pathogen's pressure and the plant's reaction. The way of evaluation in breeding for resistance to this disease is predominantly visual, being a methodology not so precise for the purpose of more robust studies. Thus, the objective of this work was to analyze the performance of different forms of evaluation, with grades and image analysis, and to verify their accuracy according to the actual percentage of leaf area affected by bacterial spot. The evaluation was performed by three evaluators, with different profiles, using three visual scales: that of Mello et al. (1997), the scale of Horsfall and Barrat (1945) and a practical scale proposed by the LMH of Esalq/USP. Three genotypes with well-defined resistance behavior (susceptible, intermediate and resistant) were used. The plants were collected and scanned to

obtain images for further evaluation. Two softwares were used for image analysis, the QUANT and the FIELImageR package analyzed in the R software, thus being a factorial analysis with three factors. The actual disease data for the correlations were obtained by the QUANT software, with analyses performed individually, treating each image manually. As results, we confirmed the subjectivity of the application of visual scales as a tool to quantify the area affected by bacterial spot in tomato. This type of approach provides reduced accuracy because it depends on external factors, such as assessor experience, training, and knowledge of disease symptoms. In addition, the rater effect proved to be strong, showing that the human eye is not able to detect and quantify the injured area and that each has a perception regarding this level of leaf symptoms. The practical scale proposed by the LMH of Esalq/USP showed the best results, because a calibration is made before the evaluation process, while the scale of Mello et al. (1997) was also efficient because it has a diagrammatic model with images, which help in the visual evaluation performed by each evaluator. The Horsfall and Barrat (1945) scale, despite being widely used, had low precision when compared to the actual disease area. The image analysis showed good results, but it was also necessary to filter the data whose images had noise and overestimated information. Thus, using images is an efficient alternative, but the process of obtaining them needs to be designed to reduce the effects of the environment on the photos, having the most homogeneous conditions possible, in order to produce more accurate estimates when possible.

Keywords: Visual assessment, Image assessment, Calibration

2.1 Introdução

A necessidade de conseguir suprir a demanda de alimentos no mundo se torna um dos maiores desafios do setor agrícola, uma vez que as projeções médias estimadas são de que a população mundial ultrapasse os 8 bilhões de pessoas em 2023 (ONU - *Department of Economic and Social Affairs*, 2019). Atrelado a essa previsão de crescimento populacional, surge a questão sobre a segurança alimentar quando confrontada a tais dados, gerando insegurança e incertezas para o futuro. Para conseguir garantir a demanda de alimentos e suprir a necessidade da população, a produção de alimentos precisa crescer em um ritmo de 2,4% ao ano, 1,1% maior que a taxa atual (de 1,3%) (PRATAP et al., 2019).

Em algumas regiões, a expansão de área destinada ao cultivo já se torna impraticável, e o acréscimo na produção de alimentos ocorrerá pelo avanço em tecnologias, aplicação do melhoramento genético, boas práticas e uso dos insumos e recursos, os quais refletirão em um aumento na produtividade (OECD/FAO, 2020). Frente a isso, o grande desafio do setor agrícola é garantir que a produção de alimentos acompanhe essa curva exponencialmente crescente da população, contornando todas as adversidades existentes e utilizando das novas ferramentas biotecnológicas e tecnologias de maneira eficiente e precisa.

Desenvolver cultivares que apresentam resistência aos fatores ambientais e de pragas e doenças são foco de muitas pesquisas, através de práticas que associem genótipo com fenótipo, a fim de buscar um material com elevado potencial e capacidade de adaptação a essas adversidades (PRATAP et al., 2019). Com o processo de domesticação, as plantas hoje cultivadas apresentam enormes ganhos em aspectos agrônômicos relacionados a produção e qualidade do produto final. Porém, tal acontecimento resultou em um afinamento genético muito grande e, com o

melhoramento, a concentração de alelos favoráveis também acentuou essa perda de diversidade genética nas populações sob seleção.

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.), originário da região dos Andes, além de ser uma das hortaliças de maior importância econômica na indústria alimentícia, é também um exemplo de uma espécie que foi submetida a estes processos, de maneira bastante intensa (LIN et al., 2014; BLANCA et al., 2015). O fenômeno de gargalo genético, aliado ao fato de que o tomateiro foi domesticado fora do seu centro de origem, resultou em uma grande redução da diversidade genética, fazendo do tomateiro uma cultura altamente sensível às adversidades ambientais.

O tomateiro cultivado é afetado por mais de 100 patógenos (ROTHAN; DIOUF; CAUSSE, 2019) e, dentre as doenças que afetam a cultura, a mancha bacteriana, causada pelo complexo de bactérias *Xanthomonas* spp. se destaca com uma das mais relevantes, causando grandes prejuízos para esta hortaliça. Foi detectada pela primeira vez no Brasil em 1959 (RODRIGUES NETO et al., 1984) e apresenta grande diversidade genética, surgindo então diversas variantes genéticas com diferentes níveis de agressividade e estabilidade no ambiente. Os sintomas dessa doença podem ser vistos em toda a parte aérea e em diversos estádios de desenvolvimento da planta (GITAITIS et al., 1992).

Essa doença causa grandes perdas de produção que, como já dito, pode ser devido a atuação direta da bactéria, manifestado através dos sintomas, e também pelo alto custo dos defensivos químicos aplicados na tentativa de controle da doença – antibióticos e fungicidas a base de cobre (GOODE, SASSER, 1980). Segundo Quezado-Soares et al. (1998) em um experimento foi obtido uma perda de até 52% na produção. Porém, no Brasil o controle químico aplicado na cultura não é satisfatório e não existem cultivares com resistência capaz de suportar a doença (QUEZADO-DUVAL et al., 2005).

Assim, a principal alternativa seria o uso de cultivares resistentes, sendo conhecidos alguns acessos de tomateiro com genes e QTLs associados com resistência (YANG; FRANCIS, 2005). Contudo, estes são pouco estáveis, necessitando ainda de mais pesquisas acerca de sua eficiência para os isolados do Brasil (PIOTTO et al., 2015), uma vez que os genótipos atualmente disponíveis no mercado apresentam suscetibilidade a este patógeno. A grande diversidade genética encontrada para *Xanthomonas* spp. constitui um gargalo muito grande no processo de encontrar genótipos de tomateiro resistentes à mancha bacteriana (QUEZADO-DUVAL; CAMARGO, 2004).

A genômica tem relevado grandes esforços despendidos para compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência a *Xanthomonas* spp. no tomateiro. Porém, a fenotipagem ainda está alguns passos em atraso neste cenário, devido à complexidade

de algumas características, como a resistência a doenças, e nos estudos de mapeamento associativo os dados fenotípicos são primordiais para as análises (ADHIKARI et al., 2020). Essa etapa é muito importante para conseguir aumentar a eficiência na seleção nos programas de melhoramento.

Ainda existe um gargalo bem grande quando se comparam os avanços em fenotipagem e sua relação com as informações genéticas, o que dificulta o melhor entendimento da base genética de caracteres complexos. Assim, para contornar este problema, o desenvolvimento e aplicação de ferramentas de fenotipagem mais apuradas se faz necessário para que o melhoramento genético possa atuar de maneira mais precisa e eficaz (ZHAO et al., 2019). Avaliar o fenótipo das plantas não é um passo tão simples, pois este é resultado da interação do genótipo (G) com o ambiente (E) (XU, 2016), podendo ser bastante variável de acordo com as condições de cultivo. Essa variação pode fazer com que o erro se torne maior, encobrendo variações genéticas relevantes para características em questão.

O termo “fenômica” se refere ao fenótipo de uma planta como todo (SOULÉ, 1967), sendo relativo à expressão do genótipo em um certo ambiente (KUMAR et al., 2015). Unindo esses dois conceitos, temos então que o fenótipo consiste em um conjunto de características que são visualmente observadas, de maneira direta ou com uso de ferramentas e é decorrente da interação entre o genótipo e ambiente (JOHANNSEN, 1911; WALTER et al., 2015). A fenotipagem é um fenômeno histórico, o qual as plantas eram selecionadas visualmente por agricultores já há muitos anos, e posteriormente pelos melhoristas. Com o tempo, este processo se popularizou por buscar melhores genótipos através de ensaios visando entender a expressão fenotípica em ambientes diversos (PRATAP et al., 2019).

A fenotipagem de alto rendimento tem se mostrado uma alternativa eficiente para acelerar o melhoramento visando a resistência de plantas, uma vez que possibilita acompanhar o progresso da doença, além de obter estimativas mais precisas para quantificar a doença (ADHIKARI et al., 2020). Ferramentas de análise de imagens para fenotipagem aplicada a quantificação de doenças em plantas estão sendo aplicadas com objetivo de trazer maior precisão nas estimativas da área de lesão, principalmente em folhas, além de constituírem técnicas não destrutivas.

Segundo Bock et al. (2010a), quando avaliamos doenças em plantas, as maneiras de se estimar os sintomas são feitas através da intensidade, dominância, ocorrência ou gravidade da doença. O processo de avaliação da mancha bacteriana em tomateiro é feito predominantemente de forma visual, através do uso de escalas de notas, realizada por avaliadores, avaliações com uso de microscópios para identificar patógenos, além de outras técnicas (BOCK et al., 2010a). Porém

o método visual apresenta um grande viés, podendo não ser tão preciso para mensuração da área afetada, pois pode englobar problemas com a não padronização dos métodos, falta de treinamento e diferentes percepções dos avaliadores. Pode ocorrer uma superestimação de até três vezes superior em relação à proporção do sintoma real, quando realizado esse tipo de avaliação (SHERWOOD et al., 1983). Assim, uma alternativa seria suprimir a subjetividade utilizando análise de imagens a serem processadas em softwares de mensuração, para se obter valores mais precisos e próximos do nível real de sintomas.

Assim, o objetivo deste estudo foi comparar diferentes estratégias de fenotipagem para avaliar o nível de sintomas de mancha bacteriana nas folhas de tomateiro, além de propor uma escala de notas ajustada por nosso grupo de pesquisa.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Local do experimento e condições climáticas

O experimento foi conduzido em uma estufa no Departamento de Genética da Esalq/USP, localizada em Piracicaba-SP, e ocorreu entre março e maio de 2017. As condições climáticas médias dos meses do estudo são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições climáticas da época do experimento.

Mês	Temp. média (°C)	Temp. máxima (°C)	Temp. mínima (°C)	Umidade Relativa
Março	23,5	30,5	18,5	77,0
Abril	21,9	28,3	16,6	77,1
Maio	19,9	26,2	14,9	81,4
Média	21,8	28,3	16,7	78,5

*Dados coletados na estação climatológica da Esalq

Como já citado, a mancha bacteriana necessita de condições específicas para seu desenvolvimento, com temperaturas e umidade do ar elevadas.

2.2.2 Material vegetal

O experimento contou com três acessos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do Laboratório de Melhoramento de Hortaliças (LMH) do Departamento de Genética da

Esalq/USP. Esses genótipos possuem diferentes níveis em relação à resistência a *Xanthomonas perforans* (Tabela 2).

Tabela 2. Acessos de tomateiro utilizados no estudo.

Código	Acesso	Genótipo	Resistência
LS	USP 030	IPA-6	Suscetível
LI	USP 028	Olirose de St Domingue	Intermediário
LR	USP 100	CNPH1137	Resistente

A semeadura ocorreu no dia 17/03/2017, e foi feita em bandejas de isopor contendo 128 células. Foi utilizado substrato de fibra de coco para preencher as bandejas e colocado uma semente em cada célula. As bandejas foram condicionadas em uma estufa, com sistema de irrigação por aspersão. Também foi criado um cronograma de aplicações de fertilizante e fungicidas. A nutrição dos fertilizantes foi realizada por meio de regas manuais, três vezes por semana, a partir do décimo dia após a semeadura, com solução contendo 0,5 g.L⁻¹ de Nitrato de Cálcio, 0,2 g.L⁻¹ de Nitrato de Potássio, 0,2 g.L⁻¹ de Sulfato de Magnésio e 0,05 g.L⁻¹ de Rexolin.

2.3 Material microbiano e inoculação

Para este estudo, foi utilizado o isolado 9C da espécie *Xanthomonas perforans*, sendo esta espécie predominando nos cultivos de tomate do Estado de São Paulo (ARAÚJO et al., 2017; PIOTTO et al., 2015). O isolado 9C é oriundo de um cultivo comercial em Itatiba-SP, sendo um dos isolados caracterizados por Niederheitmann (2021), selecionado para este estudo devido à sua estabilidade e agressividade.

O preparo do inóculo iniciou com as amostras de estoque que estavam armazenadas à -80 °C, sendo descongeladas e colocadas para crescer em uma placa de Pétri com meio de cultura a base de Nutriente Ágar (NA, na concentração de 24 g.L⁻¹), em BOD durante três dias, a uma temperatura de 28 °C. Nesse período, colônias da bactéria se formaram e foram transferidas para meio líquido Nutrient Broth (8 g.L⁻¹), extrato de levedura (1,5 g.L⁻¹) e NaCl (5 g.L⁻¹), adicionados em erlenmeyers, os quais ficaram em uma mesa agitadora por 16 horas também na temperatura de 28 °C, dando condições ideais para desenvolvimento da bactéria. Essa suspensão bacteriana foi centrifugada a 6000 rpm durante 30 minutos, fazendo-se o descarte do líquido sobrenadante e ressuspendendo o *pellet* decantado em solução de 10 mM de MgSO₄.7H₂O. Ao final, foi feito um ajuste na concentração da solução através de um espectrofotômetro para uma OD_{600nm} = 0,15.

Enquanto o processo de preparo de inóculo ocorria, as mudas ficaram alocadas por cerca de 20 horas nas câmaras úmidas, a fim de prepará-las para receber a suspensão bacteriana. Este passo é de extrema importância, pois garante que os estômatos das folhas se abram para facilitar a infecção pelas bactérias. A câmara foi construída com apoio de uma estrutura de canos PVC para sustentar um corredor coberto por plástico e dentro desse corredor foram colocados umidificadores para saturar o ambiente de umidade (Figura 1).

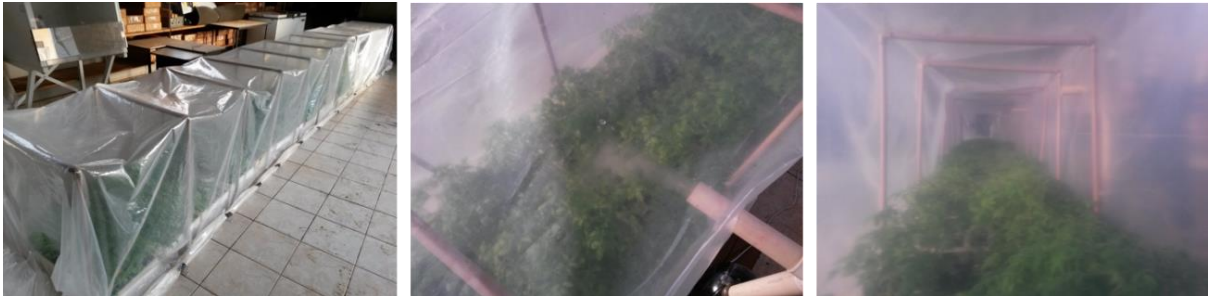


Figura 1. Câmara úmida construída para realizar o condicionamento das mudas e prepará-las para o processo de inoculação.

As bandejas retiradas das câmaras para realizar a inoculação, que ocorreu no dia 21/04/2017. A suspensão bacteriana foi colocada em borrifadores e então aspergidas sobre as mudas, na quantidade de 1 mL para cada plântula (SOMODI et al., 1994). Nesta metodologia de inoculação a infecção se dá pela entrada da solução de bactéria no mesofilo da folha (BONGIOLO NETO et al., 1986; JUHÁSZ, 2002; RIVA et al., 2004).

2.4 Instalação, condução e avaliação do experimento

No dia 22/04/2017, um dia após inoculadas, as mudas foram transplantadas para vasos de volume de 5 litros, preenchidos com substrato comercial Basaplant[®]. Os vasos foram alocados em casa de vegetação, em delineamento em blocos casualizados, contendo quatro repetições e quatro plantas por parcela. A irrigação foi realizada via aspersão, na frequência de seis vezes ao dia e duração de 30 minutos cada uma delas, para garantir o molhamento foliar, e contribuir para manter a umidade, favorecendo o estabelecimento e desenvolvimento da doença. Foi realizada nutrição das plantas nos vasos, com Peter's Professional 20-20-20 (1 g.L⁻¹), com auxílio de um regador, na quantidade de 500 mL por vaso a cada dois dias.

Os sintomas começaram a aparecer seis dias após a inoculação. A avaliação iniciou dia 06/05/2017, após 15 dias da inoculação. Foi então realizada a avaliação usando três diferentes escalas de notas, por três avaliadores diferentes caracterizados na tabela 3, com intuito de captar

as variações decorrentes da diferente percepção de quantidade de sintoma que cada pessoa possui, podendo causar um viés sobre esse tipo de aferição visual, gerando resultados inconsistentes (ARNAL BARBEDO, 2013).

Tabela 3. Escala prática de melhorista proposta pelo LMH da Esalq/USP.

Avaliador	Idade	Sexo	Nível de experiência com escala de notas
A1	28 anos	Feminino	Elevada
A2	23 anos	Masculino	Intermediária
A3	26 anos	Feminino	Pouca

A caracterização das escalas de notas é apresentada a seguir.

Escala proposta por Mello et al. (1997)

Trata-se uma escala diagramática na qual o avaliador pode consultar um diagrama esquemático com de folhas de tomateiro, com a referência de diferentes percentuais de área afetada com a doença, como demonstrado na figura 2. Esta escala é bastante prática e ajuda a reduzir interpretações subjetivas de avaliadores com pouco treinamento.

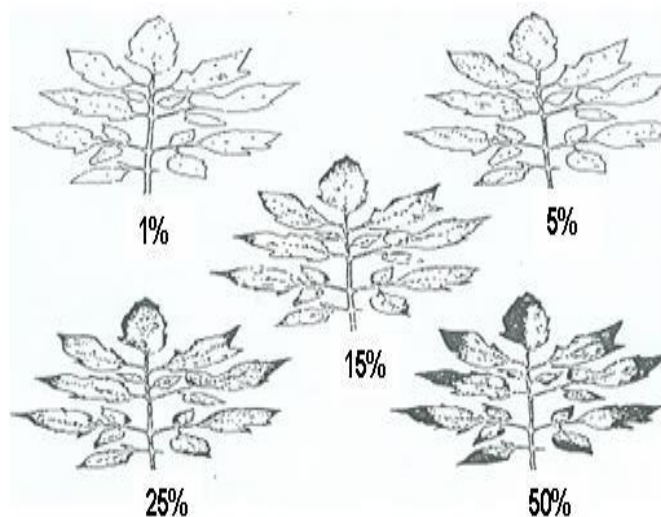


Figura 2. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha bacteriana em tomateiro, através da porcentagem de sintoma visualizado nas folhas.

Escala proposta por Horsfall e Barratt (1945)

Esta escala é baseada no percentual de área foliar afetada pela doença (tabela 4), não sendo específica para tomateiro ou para mancha bacteriana. Esta escala é baseada em notas que seguem o aumento não linear do percentual de área afetada pela doença, sendo necessário um pouco mais de treino para aplicá-la. De qualquer modo, a escala de Horsfall e Barratt (1945) é uma das mais utilizadas para caracterizar o percentual de sintomas de diferentes doenças em diversas espécies, sendo também uma das mais utilizadas para mancha bacteriana em tomateiro em trabalhos internacionais.

Tabela 4. Escala proposta por Horsfall e Barratt (1945), baseada em porcentagem da área foliar afetada pela doença.

Nota	Percentual (%) de área foliar afetada com a doença
1	0
2	0 a 3
3	3 a 6
4	6 a 12
5	12 a 25
6	25 a 50
7	50 a 75
8	75 a 87
9	87 a 94
10	94 a 97
11	97 a 100
12	100

Escala experimental LMH baseada em referências

Por conta dos trabalhos de avaliação de resistência à *Xanthomonas perforans* realizados por nosso grupo de pesquisa, surgiu a ideia de tornar as avaliações mais simples e objetivas, utilizando testemunhas ou referências já conhecidas de resistência ou susceptibilidade à doença. Esta ideia surgiu pelo fato de que, a cada experimento realizado em diferentes épocas, os níveis de sintomas variavam bastante tornando difícil a comparação dos percentuais de ocorrência da doença em diferentes épocas e diferentes intensidades de ocorrência de sintomas. Assim, a ideia é utilizar linhagens com resposta conhecida ao patógeno, para utilizar como padrão visual de níveis de sintoma elevados e baixos, atribuindo valores intermediários com base na avaliação visual prévia das testemunhas. Foi proposta então a escala apresentada na tabela 5.

Tabela 5. Escala prática proposta pelo LMH da Esalq/USP.

Nota	Fenótipo	Referência
1	Muito resistente	CNPH1137 (pouco ou nenhum sintoma nas folhas)
2	Resistente	-
3	Intermediário	-
4	Suscetível	-
5	Muito suscetível	IPA-6 (muito sintoma nas folhas)

Esta escala permite o treinamento prévio do avaliador antes de iniciar a avaliar. O objetivo principal neste caso é separar bem os extremos, para fins de facilitar a seleção dos genótipos com menos sintomas, mesmo sob variações a cada ciclo de seleção e avaliação.

2.5 Processamento de imagens para quantificação de sintomas nas folhas

Duas folhas mais sintomáticas de cada planta em cada parcela foram destacadas e digitalizadas, como demonstrado na figura 3 abaixo.

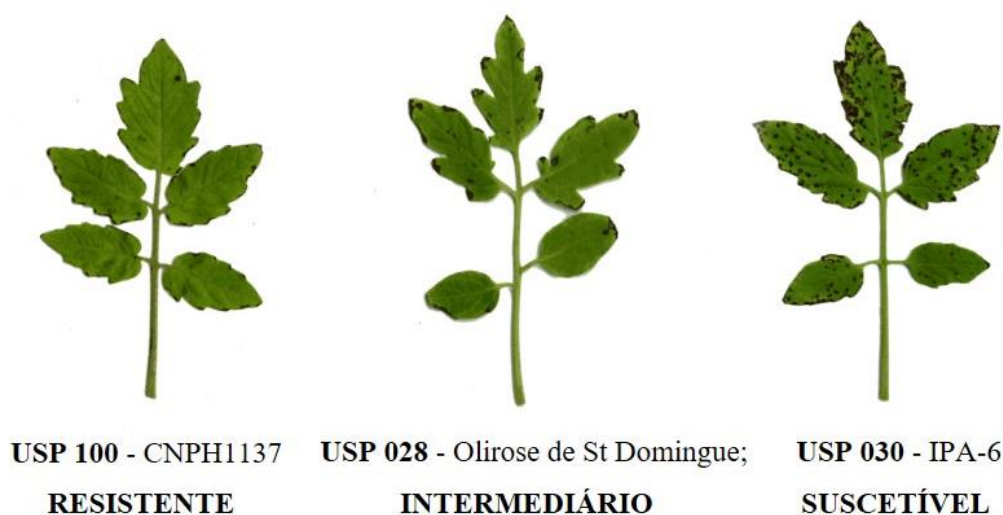


Figura 3. Genótipos selecionados para análise de imagem apresentando diferentes proporções de sintomas de mancha bacteriana nas folhas.

Para análise das imagens utilizou-se duas metodologias, sendo uma delas a análise pelo software QUANT (VALE et al., 2001) e a outra pelo pacote FIELDImageR instalado no software R (MATIAS et al., 2020). O programa QUANT é um software foi desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa, que consegue quantificar o porcentual de área com sintomas de

doenças e assim avaliar a severidade com base em processamento de imagens. Nele é realizada a redução do número de cores e uma tabela é gerada mostrando a área na foto representada por cada cor (VALE et al., 2001).

Primeiramente foi feita uma redução de cores, sendo todas as imagens reduzidas entre 15 e 32 cores, sendo a cor branca o fundo da imagem e a cor preta a área de lesão, e os tons esverdeados as cores correspondentes à área da folha ainda sem sintoma da doença (Figura 4). Após este passo, foi realizado mais uma redução para apenas duas cores, na qual o tecido sadio foi alterado para verde e o tecido afetado por lesões recebeu a cor azul (Figura 5). Com isso, o programa forneceu a área afetada e a área sadia de acordo com suas respectivas cores.

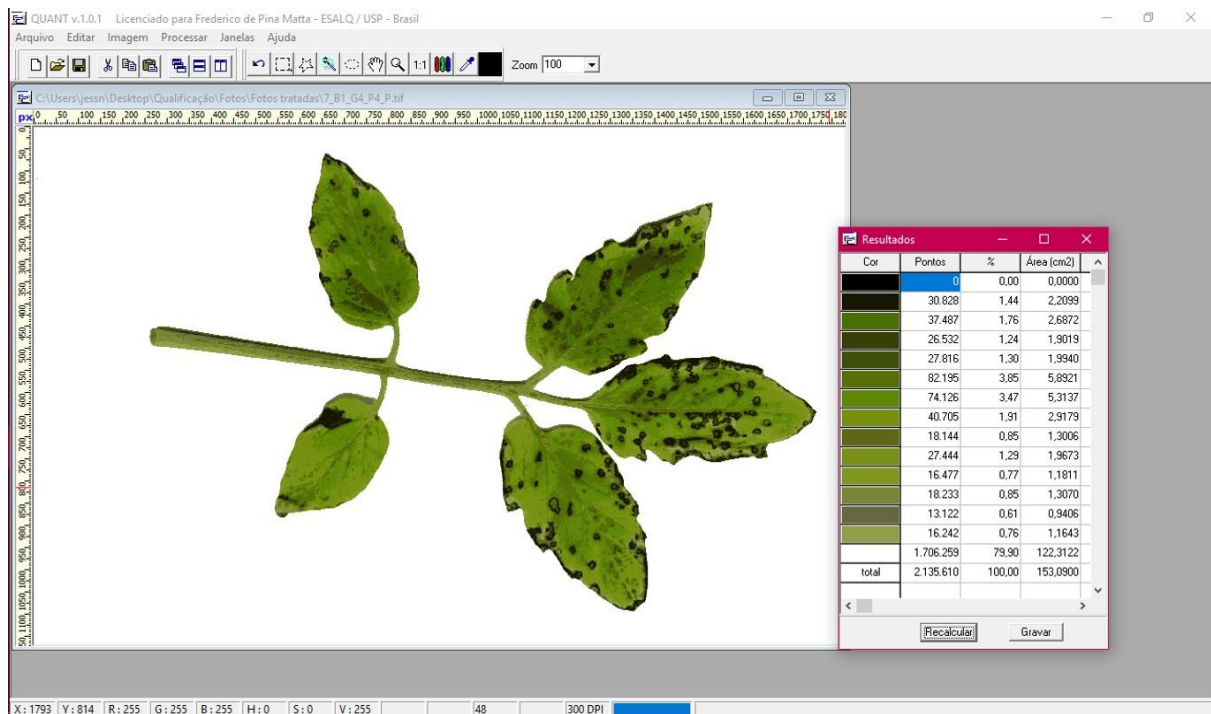


Figura 4. Redução de imagens no software QUANT para determinação da área saudável e de lesão da folha de tomateiro inoculado com *Xanthomonas perforans*.

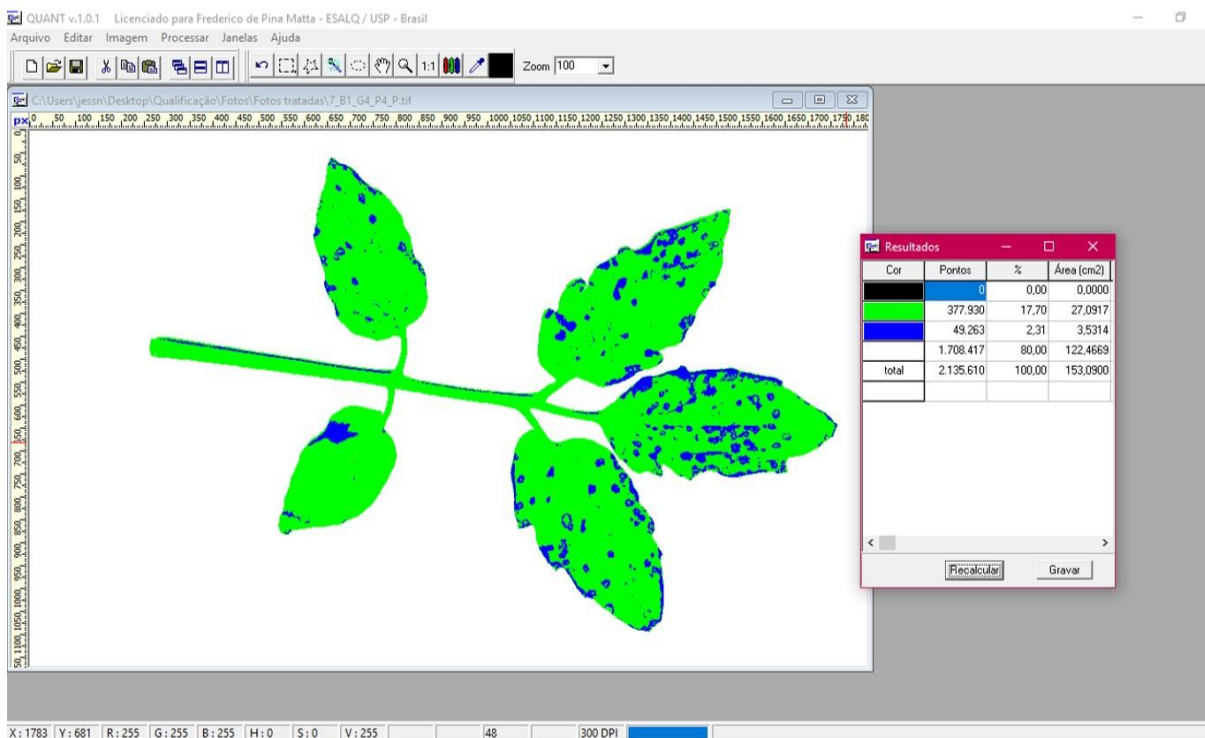


Figura 5. Redução de cores no software QUANT para detecção de área sadia e área afetada pela doença em tomateiro.

Já o processamento das imagens utilizando o software R versão 4.1.0, através do pacote FIELImageR (MATIAS et al., 2020) permite a análise em massa e automatizada de imagens, através da aplicação de índices espectrais obtidos a partir do conjunto RGB (red, green, blue) das imagens com sintomas da doença (ALVES et al., 2022). Essa análise foi feita a partir da remoção do fundo e então realizado o cálculo dos índices se baseando em pixels (ALVES et al., 2022). Os índices de vegetação (IV) auxiliaram na avaliação qualitativa e quantitativa de áreas vegetais através de informações espectrais, minimizando efeitos externos existentes na coleta das imagens (BANNARI et al., 1995). Para isso, foi realizado uma adequação no *pipeline* de análise, testando anteriormente os índices que melhor se aplicariam à mancha bacteriana nas folhas do tomateiro para discriminação da área de lesão. Assim, foram escolhidos seis índices para seguir com a rotina de análise (Tabela 6).

Tabela 6. Índices vegetativos utilizados para análise de imagens com o pacote FIELDImageR no software R, a fim de detectar área afetada pela doença.

Nome	Índice	Fórmula	Referência
Brightness index	BI	$\sqrt{\frac{R^2 + G^2 + B^2}{3}}$	Richardson; Wiegand (1977)
Soil color index	SCI	$\frac{R - G}{R + R}$	Mathieu et al. (1998)
Primary colors hue index	HI	$\frac{2R - G - B}{G - B}$	Escadafal et al. (1994)
Normalized green red difference index	NGRDI	$\frac{G - R}{G + R}$	Tucker (1979)
Visible atmospherically resistant index	VARI	$\frac{G - R}{G + R - B}$	Gitelson et al. (2002)
Overall hue index	HUE	$\text{atan}\left[2 \frac{B - G - R}{30,5} (G - R)\right]$	Escadafal et al. (1994)

*Apadtado de Escadafal et al. (1994)

Inicialmente as imagens foram carregadas no software R e então foi realizada a remoção do fundo, que contém manchas e sombras adquiridas durante o processo de obtenção das imagens. Após isso, foi aplicado um filtro para identificação das áreas de lesões, com coloração diferente do tecido sadio. Os índices são então adicionados e conseguimos obter uma relação entre tecido sadio e tecido lesionado pela doença (Figura 6).

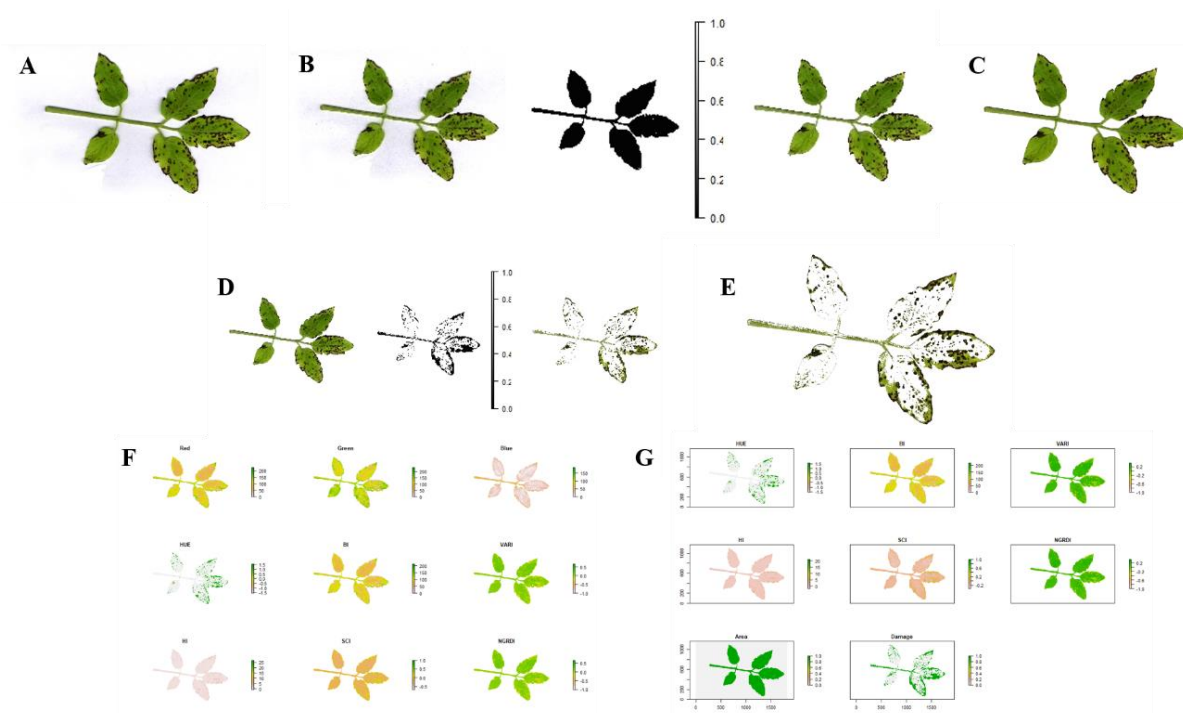


Figura 6. Sequência de análise no FIELDImageR. **A:** A imagem é carregada; **B:** É aplicado um filtro para remoção do fundo (BGI); **C:** Imagem com fundo removido; **D:** Aplicação de um filtro para identificação dos pontos de lesão (VARI); **E:** Folha com as lesões removidas pelo filtro; **F:** Aplicação dos índices na imagem; **G:** Após aplicação dos índices, a imagem com área sadia e área de lesão.

2.6 Análises e modelo estatístico

Nas avaliações por escala de notas, cada avaliador atribui notas para cada planta de cada parcela, cuja média compõe a média da parcela. Nas análises de imagens, duas folhas de cada planta de cada parcela foram analisadas, sendo também utilizadas para compor a média de parcela. Foi então considerada a média das parcelas para realizar a análise de variância, em esquema fatorial com três fatores, sendo estes três linhagens (S: IPA-6 Susceptível, I: Olirose de St Domingue Intermediário e R: CNPH 1137 Resistente), três avaliadores (A1: Experiente, A2: Intemediário e A3: Sem experiência) e três escalas (E1: Escala LMH, E2: Escala Mello e E3: Escala Horsfall e Barratt). Após a coleta dos dados, foi realizada a Análise de Variância de acordo com o modelo estatístico:

$$y_{ijkl} = \mu + g_i + a_j + s_k + b_l + ga_{ij} + gs_{ik} + as_{jk} + gas_{ijk} + e_{ijkl}$$

Onde:

y_{ijkl} : observação referente à i -ésima linhagem, j -ésimo avaliador, k -ésima escala no l -ésimo bloco;

μ : Média geral;

g_i : efeito fixo da i -ésima linhagem;

a_j : efeito fixo do j -ésimo avaliador;

s_k : efeito fixo da k -ésima escala;

b_l : efeito aleatório do l -ésimo bloco;

ga_{ij} : efeito da interação linhagem e avaliador;

gs_{ik} : efeito da interação linhagem e escala;

as_{jk} : efeito da interação avaliador e escala;

gas_{ijk} : efeito da interação linhagem, avaliador e escala;

e_{ijkl} : erro experimental.

Uma vez identificados efeitos e interações significativas entre fatores por meio do modelo de análise fatorial da ANOVA ($p < 0,05$), os fatores foram desdobrados de acordo com as interações mais importantes para este estudo, e cujas médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.7 Análise de correlação entre as variáveis

Foi realizada a análise de correlação de Spearman entre as variáveis oriundas das escolas de notas e da quantificação com o software QUANT, e a correção de Pearson entre as variáveis de percentual de área com sintomas de mancha bactéria entre as variáveis da fenotipagem por análise de imagem. As correlações de Spearman foram realizadas ao nível de média de parcela, ao passo que as correlações de Pearson foram obtidas ao nível de observações individuais, das imagens dentro de cada parcela. As fórmulas consideradas para as análises de correlação são apresentadas a seguir:

Correlação de Pearson (r)

$$r_{xy} = \frac{cov(x, y)}{\sigma_x \sigma_y}$$

Em que:

$cov(x, y)$ é a covariância entre os caracteres x e y

σ_x e σ_y são os desvios padrão dos caracteres x e y

Correlação de Spearman (ρ)

$$\rho_{rg_xrg_y} = \frac{cov(rg_x, rg_y)}{\sigma_{rg_x}\sigma_{rg_y}}$$

Em que:

$cov(rg_x, rg_y)$ é a covariância entre caracteres em postos

σ_{rg_x} e σ_{rg_y} são os desvios padrão entre os caracteres em postos.

2.3 Resultados e Discussão

Após análise de variância utilizando o modelo fatorial triplo, podemos notar que houve efeito significativo para todos os fatores e interações, com exceção da interação Linhagem x Escala (Tabela 7). Com esses resultados percebemos comportamentos diferenciados de acordo com o genótipo, os avaliadores e a escala. Já era sabido que os genótipos apresentariam resultados divergentes entre eles, uma vez que foram escolhidos de acordo com sua reação perante a infecção. Avaliar acessos com respostas bem definidas de resistência e/ou suscetibilidade foi a estratégia adotada para validar o efeito de avaliadores e de escalas. Isso porque as escalas não possuem comportamentos lineares, nem intervalos regulares de níveis de severidade da doença, contribuindo para identificar se os avaliadores são capazes de distinguir os graus de sintomas de acordo com cada uma.

Tabela 7. Análise de variância em fatorial triplo para os efeitos das variáveis estudadas e inseridas no modelo.

F.V.	G.L.	Q.M.
Bloco	3	1,007**
Linhagem	2	62,751**
Avaliador	2	3,619**
Escala	2	20,636**
Linhagem x Avaliador	4	0,596*
Linhagem x Escala	4	0,335 ^{ns}
Avaliador x Escala	4	2,346**
Linhagem x Avaliador x Escala	8	0,701**
Resíduo	78	0,197
C.V. (%)	-	15,30

(*) significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F; (**) significativo a 1% de probabilidade de erro pelo teste F. (^{ns}) não significativo. F.V. (Fonte de Variação), G.L. (Graus de Liberdade); Q.M. (Quadrado Médio) e C.V. (Coeficiente de Variação).

As interações linhagem x avaliador e avaliador x escala foram também significativas pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Essas relações refletem variações que ocorrem entre a discriminação da área de lesão de acordo com cada escala e também na percepção do nível de dano de cada avaliador. Além disso, a relação entre os três fatores, linhagem x avaliador x escala, foi significativa, mostrando comportamentos divergentes dos mesmos quando avaliados conjuntamente. Em outras palavras, foram identificadas variações específicas na avaliação de cada avaliador, de acordo com a escala usada em cada um dos três genótipos do estudo. Uma vez constatada a interação tripla, os desdobramentos específicos em cada nível assumem prioridade. Porém, o número de desdobramentos e interações neste caso é elevado e nem todas fazem sentido para este estudo. Por conta disso, foi somente apresentado o desdobramento da interação entre Escalas x Avaliadores, para cada uma das Linhagens, sendo esta a interação mais importante para o objetivo proposto.

O desdobramento da interação entre Escalas x Avaliadores permitiu entender melhor o comportamento de cada avaliador para as escalas utilizadas (Tabela 8). Quando observamos o genótipo mais suscetível (LS), é possível notar que não houve diferenças significativas entre os avaliadores quando estes utilizaram a escala E3 [HB: Horsfall e Barratt (1945)], ao passo que a escala E1 diferenciou dois avaliadores e a escala E2 diferenciou os três avaliadores. Neste caso, temos que a escala E3 não é linear e percepção dos sintomas ficou variando entre as notas 4 e 6, que representam um intervalo muito amplo de 12,5% até 50% de área foliar com sintomas. Ou seja, embora numericamente os valores tenham ficado com médias próximas, em termos de área

afetada com a doença as variações são elevadas, trazendo a falta impressão de uma avaliação mais homogênea entre avaliadores.

Em trabalho realizado por Sun et al. (2014), onde um dos ensaios realizados utilizou avaliação do nível de sintomas da mancha bacteriana no tomateiro através da escala de H&B e também com uso de imagens. Neste trabalho, o resultado de um genótipo com níveis graves da doença não foi bem discriminado pela escala de HB. Nesse estudo, as estimativas de severidade do genótipo suscetível atingiu certo nível de estabilidade em torno de 20%, levando a conclusão que essa escala não se aplicou bem em casos onde a distribuição dos intervalos são maiores. Essa escala apresenta uma distribuição não linear baseada em intervalos referentes aos percentuais de área afetada, na qual os extremos possuem uma menor variação entre valores e no centro a amplitude de valores é maior, o que pode favorecer na separação de plantas com sintomas bem definidas e de fácil diferenciação visual.

Entretanto, genótipos com respostas que variam entre os níveis abordados neste estudo podem causar certa confusão para enquadrá-los em alguma classe adequadamente. Mesmo sendo uma escala bastante disseminada, com bastante aceitabilidade em pesquisas visando resistência à mancha bacteriana no tomateiro (YANG, 2013), alguns estudos questionam a precisão e confiabilidade da mesma (NUTTER; ESKER, 2006; BOCK et al. 2009b, 2010a). É sabido que avaliações visuais tendem a aumentar linearmente de acordo com o aumento do número de sintomas nas folhas (NITA et al., 2003; NUTTER; ESKER, 2006; BOCK et al., 2010b). Na literatura também é citado que a baixa precisão de estimativas de níveis de sintomas quando utilizada a escala de HB tende a gerar maior probabilidade de ocorrência de erros do tipo II, quando a amostragem populacional não é compatível (BOCK et al., 2009b, 2010a; NITA et al. 2003; NUTTER; ESKER, 2006).

Com o resultado dessa interação para a LS, podemos perceber a variação ocorrida para as diferentes escalas e também o efeito da percepção de cada avaliador. Nesse sentido, a avaliação visual do nível de sintomas causados por doenças em plantas pode constituir um método pouco confiável e preciso (PRICE et al., 1993; NITA et al., 2003; NUTTER et al., 1993; PARKER et al., 1995a; MOYA et al., 2005; BADE; CARMONA; 2011; BOCK et al., 2013), embora, por vezes, seja a única alternativa disponível.

Já a escala de Mello et al. (1997) (E2) foi a que menos se relacionou com a real reação da linhagem LS, além de apresentar maior variação nos níveis de sintomas captados pelos avaliadores. Isso pode refletir a dificuldade de leitura de uma escala diagramática, ou seja, interpretar a imagem e projetá-la na planta, o que pode gerar um viés na análise, variando de acordo com a percepção de cada um. Quando analisamos a escala proposta pelo LMH da

Esalq/USP, observamos que foi uma escala com bons resultados, quando comparados os dois resultados anteriores, sendo prática em relação aos níveis estabelecidos em percentuais de área afetada, porém esses níveis são divididos em apenas 5 classes, o que pode facilitar interpretação dos genótipos, uma vez que antes de iniciar a avaliação foi feita uma calibração com todos os avaliadores. Este processo se deu por meio da observação prévia de algumas plantas das linhagens LS (muito sintoma) e LR (pouco sintoma), fora da estrutura do experimento, para não se ter um viés de posição. Assim, todos os avaliadores iniciaram a avaliação no mesmo patamar para atribuir as notas com maior precisão e menor variação.

É interessante notar que a escala LMH foi eficiente para os avaliadores AV2 e AV3, os quais chegaram próximos ao valor médio de nota 5 para a linhagem LS, como seria esperado. O principal desvio foi em relação ao avaliador AV1, que subestimou os valores das notas, que ficaram em média posicionadas 1 ponto ou 1 classe de sintomas abaixo do ideal. Nesse caso, o AV1 também subestimou a linhagem LS usando a escala de Mello (E2), também baseada em notas de 1 até 5, porém com referência diagramática. De maneira geral, o AV2 tendeu a subestimar os valores na maior parte das avaliações. Fazendo uma análise mais complexa, temos que este avaliador estava mais habituado a utilizar a escala de HB (E3) em sua rotina de trabalho, o que de certa forma pode ter influenciado e gerado alguma resistência em atribuir valores mais extremos para os sintomas. Já os avaliadores A2 e A3 tinham pouco e nenhum treinamento, respectivamente, e possivelmente se adaptaram melhor ao ajuste visual dos sintomas nas plantas de referência, sendo menos influenciados por alguma experiência pré-existente.

Tabela 8. Desdobramento das interações entre Escalas (E) e Avaliadores (AV), para cada uma das Linhagens (L) utilizadas neste estudo.

	LS			LI			LT		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
AV1	3,94 B	1,94 C	5,44 A	2,19 A	1,38 B	3,75 A	1,00 B	1,00 A	2,50 A
AV2	4,67 A	4,62 A	5,31 A	2,94 A	2,44 A	3,44 A	2,19 A	1,19 A	2,00 A
AV3	4,56 AB	3,56 B	4,81 A	2,56 A	2,12 A	3,25 A	1,88 A	1,12 A	2,55 A
Média	4,39	3,37	5,19	2,56	1,98	3,48	1,69	1,10	2,35

Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Analisando a linhagem resistente (LR), a escala de E2 (MELLO et al.,1997) foi a que proporcionou maior concordância e menor variação em termos de notas dos diferentes avaliadores. Em um estudo que visou investigar a precisão e acurácia de diferentes formas de estimar área da folha afetada por *Xanthomas* spp., a escala de Mello et al. (1997) apresentou bons resultados de acurácia (NASCIMENTO et al., 2012). A escala E3 (HB) também apresentou constância em relação à avaliação, evidenciando seu uso em muitos trabalhos que visam avaliar resistência do tomateiro à mancha bacteriana. O efeito de avaliadores na escala prática (E1) foi bastante forte, especialmente em relação ao avaliador AV1, que teve um desempenho baixo se tratando da percepção da reação da planta à doença. Novamente, vale destacar que o avaliador AV1 já tinha uma rotina de trabalhos utilizando a escala E3 e aparentemente subestimou os valores nas demais escalas, o que não desqualifica a escala em si, mas indica o viés de experiência prévia do referido avaliador.

Com relação à linhagem com resistência intermediária (LI), os avaliadores mostraram um comportamento relativamente estável em relação à atribuição de notas, praticamente não havendo diferenças entre os mesmos, com exceção do avaliador A1 que novamente subestimou os valores utilizando a escala E2. De maneira geral, as escalas E1 e E3 conseguiram capturar de maneira homogênea com menor variação para todos os avaliadores. Neste ponto, pode-se inferir que, na escala de HB, as notas intermediárias possuem maiores intervalos referentes ao percentual de sintomas, o que pode facilitar a discriminação visual e atribuição de notas para plantas com este comportamento. A aptidão dos avaliadores é melhor para estimativas concentradas ao centro da escala, onde as notas apresentam uma amplitude maior de valores (FORBES; KORVA, 1994; NUTTER; ESKER, 2006; BOCK et al., 2009b).

De forma complementar, foi realizada a quantificação de sintomas pelo software QUANT, sendo cada imagem processada de forma manual, de modo que esta informação reflete o valor mais próximo do real percentual de sintomas das folhas de cada genótipo, conforme demonstrado na tabela 9.

Tabela 9. Quantificação do percentual de área foliar com sintomas de mancha bacteriana em folhas de tomateiro.

Linhagem	Área foliar com sintomas de mancha bacteriana (%)
Susceptível (LS)	9,54 ± 1,32
Intermediária (LI)	4,34 ± 0,18
Resistente (LR)	3,01 ± 0,29

Como era esperado, a percepção do percentual de sintomas nas folhas das plantas é bem diferente quando comparamos com os valores médios reais, sendo muito difícil de se obter uma quantificação direta e acertiva para os percentuais em si. Contudo, o objetivo das escalas de notas não precisa ser necessariamente este, mas sim categorizar as diferenças de sintomas nas folhas das plantas de diferentes genótipos a fim de diferenciá-los. Neste sentido, os valores médios das notas de cada parcela, atribuídas por cada avaliador e para cada escala, foram então correlacionados por meio da correlação de Spearman com os valores das mesmas parcelas obtidos pela análise no software QUANT. A correlação de Spearman mede a associação não linear entre duas variáveis, baseada em sua posição de postos, sendo adequada neste caso por mensurar o sucesso na ordenação das diferenças dos valores dos genótipos em cada parcela (Tabela 10).

Tabela 10. Análise de Correlação de Spearman entre notas e valores de percentual de área com sintomas estimados pelo software QUANT.

Avaliador*	Escala*			Média
	E1	E2	E3	
AV1	0,92	0,82	0,78	0,60
AV2	0,91	0,93	0,90	0,86
AV3	0,87	0,91	0,86	0,78
Média	0,89	0,91	0,86	-

* Todas as correlações de Spearman foram significativas ($p < 0,05$)

Com base na análise dados, podemos notar que, no geral, as escalas E1 e E2 possuem uma maior correlação com os percentuais reais quando comparadas com a escala E3 ($\rho = 0,89$ e $\rho = 0,91$, respectivamente), pelo fato de serem escalas mais práticas, de mais fácil compreensão pelos avaliadores e possuírem menor quantidades de classes fenotípicas (ambas possuem apenas 5 níveis de severidade). A escala de HB apresenta mais classes, podendo dificultar a identificação correta da nota para cada genótipo. Nesse tipo de escala, o erro tipo II pode ser elevado, devido

ao efeito de avaliador (CHIANG et al., 2016). O avaliador A1 foi o que apresentou desempenho inferior para ambas as formas de avaliação ($\rho = 0,60$), embora tenha certa experiência com a escala E3. O avaliador A2 obteve os melhores resultados no geral ($\rho = 0,86$), mantendo constância nas avaliações independente de escalas.

A variação de percepção de sintomas entre avaliadores é um viés frequente em avaliações visuais de doenças, como descrito no trabalho realizado para estimar sintomas de cancro cítrico em toranja, o qual detectou essa variabilidade em 28 avaliadores distintos (BOCK et al., 2009a). A tendência nesses casos é que ocorra a superestimação ou subestimação independente da nota estabelecida, ou pode haver certa facilidade de detecção ao longo dos intervalos da escala (HAU et al., 1989; NITA et al., 2003; GODOY et al., 2006; BARDSLEY; NGUGI, 2013; YADAV et al., 2013; SCHWANCK; DEL PONTE, 2014). Uma alternativa para minimizar esse problema é reduzir a quantidade de avaliadores ou fixar avaliadores por blocos (BOCK et al., 2020), no caso de tais avaliações não poderem ser realizadas por todos os avaliadores em todas as plantas.

A confiabilidade das estimativas de severidade de doenças é variável, devido a essas divergências encontradas entre avaliadores (NUTTER; SCHULZ, 1995; PARKER et al., 1995a e b; BOCK et al., 2008). A maneira como cada um capta, assimila e quantifica a área lesionada é relativa e varia de cada um, dependendo de vários fatores, tais como a intensidade de luz e a identificação de cor e até de fatores cognitivos (BOCK et al., 2010b). Esses resultados trazem boas discussões em relação ao uso de escalas visuais para quantificar a severidade de doenças em plantas. Conforme mencionado acima este tipo de avaliação é amplamente utilizado em estudos para todas as culturas e em todo o mundo. Utilizar escalas de notas ou diagramas de referência seriam ferramentas eficientes para fins de seleção, pois conseguem discriminar bem os extremos e genótipos intermediários, principalmente quando aplicadas a populações com grande número de indivíduos (SUN et al., 2014). Porém, para uma análise quantitativa, de maior precisão, precisamos utilizar de ferramentas que permitam atingir essa acurácia.

Uma estratégia adotada neste trabalho foi o uso de imagens para serem analisadas em softwares específicos. Esse tipo de abordagem já vem sendo bastante utilizados para mensurar nível de sintomas em folhas (BOCK et al., 2010b), proporcionando uma estimativa mais precisa que a avaliação visual (PRICE et al., 1993; MOYA et al., 2005; BOCK et al., 2010b; BADE; CARMONA, 2011).

Nas variações de análises de imagens podem ocorrer variações devidas, em sua maioria, às condições quando as imagens foram obtidas e à variação de sintomas (BOCK et al., 2020). Também podem existir efeitos da folha não ser totalmente plana (BARBEDO, 2014), sombras e

nervuras que podem ser confundidos com sintomas (BADE; CARMONA, 2011; BARBEDO, 2014; BARBEDO, 2016), doenças oportunistas com sintomas evidentes podem se misturar com o da doença alvo, entre outros.

Pensando em avaliações de larga escala que necessitam de maior nível de precisão, e considerando a impossibilidade de se realizar a avaliação por meio de processamento de cada imagem individualmente pelo software QUANT, precisamos avaliar uma estratégia que permita tais avaliações de forma massiva e sistemática, a fim de se otimizar a fenotipagem de alto rendimento.

Neste sentido, aproveitamos as imagens e o escopo do estudo em questão, para avaliar a eficiência do pacote FIELDImageR, do software R, primeiramente aplicado à este pequeno conjunto de imagens. Em um primeiro momento, a correlação entre os valores obtidos no software QUANT e no pacote FIELDImageR não foram animadoras, pois somente o valor de $r = 0,22$ de correlação foi obtido (tabela 11). Ao estudarmos os fatores que proporcionaram essa baixa correlação, notamos a presença de *outliers*, os quais sempre supertimavam os valores das imagens, quantificando dobras e sombras como sintomas. Assim, tais valores discrepantes foram removidos e a correlação foi novamente calculada, sendo obtido o valor de $r = 0,81$, o que já bastante razoável (tabela 11).

Tabela 11. Análise de Correlação de Pearson entre os valores de percentual de área afetada com a doença pelo software QUANT e dados brutos e filtrados obtidos pelo FIELDImageR.

Software	QUANT	p-valor
FieldImageR bruto	0,22	0,49
FieldImageR filtro	0,81	> 0,01

Com base nos resultados acima, foi possível determinar que a metodologia de análise de imagem utilizando o FIELDImageR possui potencial para realizar a fenotipagem em grandes quantidades de imagens de folhas com sintomas de mancha bacteriana. Contudo, nesta primeira abordagem, identificamos a necessidade de traçar estratégias de filtragem de dados para se obter boas acuráneas. Porém, este estudo não é tema deste capítulo e não será aqui aprofundado.

De maneira geral, temos que a evolução da ciência nos últimos permitiu que a fenotipagem de plantas, principalmente para análise de imagens de doenças, alcançasse parâmetros elevados, necessitando ajustes para cada, em cada espécie, de acordo com os objetivos propostos. Este estudo trouxe *insights* interessantes sobre a forma como é avaliada a incidência de mancha no tomateiro atualmente. O uso de escalas visuais é um método eficiente para fins de seleção massal,

onde as populações são de tamanho elevado e precisam passar por um *screening* inicial. Esse tipo de abordagem pode trazer alguns vieses que geram perda de precisão e acurácia. Dentre esses fatores, o tipo de escala e efeito de avaliador se mostraram relevantes neste trabalho.

A escala prática para uso dos melhoristas proposta pelo LMH da Esalq/USP, no geral, apresentou os melhores resultados independente dos avaliadores. Nesse tipo de avaliação, inicialmente os avaliadores tomam contato com testemunhas para treinar a percepção visual dos sintomas nas folhas. O método proposto por Mello et al. (1997) também obteve bons resultados, onde um gabarito de imagem contendo os sintomas é usado, facilitando a identificação e atribuição de notas mais próximo do real.

Embora a escala de Horsfall & Barrat (1967), embora seja uma das mais utilizadas e conhecidas para avaliação da mancha bacteriana em tomateiro no mundo, apresentou resultados inferiores em suas estimativas. Este fato pode ser devido à escala não ser linear, com intervalos menores nos extremos e maiores ao centro, facilitando a avaliação de genótipos intermediários e podendo gerar dúvidas quanto a genótipos dos extremos, principalmente em plantas com maior quantidade de sintomas.

Em relação aos avaliadores, ficou nítido o efeito causado nas estimativas. Isso porque o olho humano não é capaz de captar e quantificar o nível de sintomas em uma folha, aliado ao fato que cada um possui uma percepção diferente quanto a isso. Outros fatores como treinamento, histórico, familiaridade com a doença, podem também ser responsáveis por este viés. Um ponto interessante é que o cansaço ao longo do tempo realizando a atribuição de notas, dependendo da quantidade de plantas e tamanho da população, pode também ser um fator de redução na precisão.

O uso de escalas visuais para avaliação da severidade de doenças possui algumas vantagens, como ser um processo rápido, prático, não destrutivo e que não requer nenhum equipamento ou aquisição nova. Em contrapartida, apresentam pontos que reduzem a precisão da avaliação, como necessidade de treinamento adequado, subjetividade e condições do avaliador.

Com todos os avanços da ciência e tecnologia, hoje é possível estabelecer metodologias de avaliações mais precisas, como o uso de imagens. Assim utiliza-se o uso softwares de análise de imagens para detectar e quantificar a área lesionada seria um caminho para avaliações mais precisas. Neste caso, realizamos uma etapa de calibração com duas metodologias, o QUANT e o FIELDImageR. O QUANT oferece uma estimativa mais precisa da área real de lesão, sendo utilizado para comparars com as estimativas do FIELDImageR, isso porque o primeiro consiste em uma análise manual e individual de cada folha para quantificar os sintomas, o que é inviável a fins de grandes ensaios. Já o segundo proporciona uma análise em massa e, se otimizada, fornece

estimativas da área afetada pela doença através da aplicação de índices vegetativos que conseguem captar e transformar em informações quantitativas relativamente precisas.

Com isso podemos perceber que é necessária uma adaptação do método, tanto de obtenção das imagens quanto de análises. Quanto ao processo de aquisição das imagens, é preciso entender: que a foto não é plana, possuindo nervuras e outros fatores que podem atuar no confundimento da real área de lesão. Condições homogêneas do ambiente, como luz e distância focal (no caso uso de câmeras fotográficas), podem afetar a qualidade da imagem e a fenotipagem. Já nas análises, um tratamento dos dados se faz necessário, uma vez que devido as condições anteriormente citadas, podem gerar ruídos na imagem, ocasionando estimativas superestimadas da área afetada pela doença.

O uso de análise de imagens possui também vantagens como a precisão e confiabilidade, automatização, utilização de equipamentos com baixo custo, existência de softwares já conhecidos que realizam esse tipo de análise. Como desvantagem, podemos citar a necessidade de tratamento das imagens e/ou dos dados devido aos ruídos ocorridos nas mesmas, a necessidade de treinamento para uso do software, a ocorrência de outras doenças ou fatores de distorção das imagens e a necessidade de validação.

Por fim, com base no estudo aqui apresentado, conseguimos consolidar uma abordagem para o uso de escala de notas e também fazer uma abordagem inicial para análises de imagens na avaliação da resistência à mancha bacteriana em tomateiro. Esse tipo de metodologia poderá auxiliar em estudos de genômicos e até mesmo na seleção de genótipos superiores para compor o programa de melhoramento, apresentando estimativas mais confiáveis.

2.4 Conclusões

Com base nos resultados apresentados neste capítulo, é possível concluir que:

- A fenotipagem por meio de escala de notas para mancha bacteriana em tomateiro é eficiente para fins de separação de fenótipos com grande diferença de sintomas da doença nas folhas;
- A atribuição de notas em relação aos percentuais de área afetada com a doença varia de acordo com a percepção de cada avaliador, sendo relativamente subjetiva e enviesada de acordo com a experiência prévia de cada;
- As escalas de nota, de maneira geral, são boas ferramentas para se realizar a seleção massal de genótipos com maior nível de resistência à mancha bacteriana em tomateiro;

- A escala LMH proposta neste trabalho, a qual é baseada na calibração visual usando testemunhas, pode ajudar a padronizar a fenotipagem para mancha bacteriana em tomateiro, tornando comparáveis avaliações realizadas em diferentes locais e épocas;

- A fenotipagem por meio da análise de imagem utilizando o pacote FieldImageR possui potencial para uso como ferramenta de fenotipagem de alto rendimento, porém demanda imagens de boa qualidade e procedimentos de filtragem de dados para melhorar sua acurácia.

Referências

- ADHIKARI, Pragya et al. Advances and challenges in bacterial spot resistance breeding in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1734, 2020.
- ALVES, Kaique S. et al. RGB-based phenotyping of foliar disease severity under controlled conditions. **Tropical Plant Pathology**, v. 47, n. 1, p. 105-117, 2022.
- ARAÚJO, E. R. et al. Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, p. 159-168, 2017.
- ARNAL BARBEDO, Jayme Garcia. Digital image processing techniques for detecting, quantifying and classifying plant diseases. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2013.
- BADE, Cecilia Inés A.; CARMONA, Marcelo A. Comparison of methods to assess severity of common rust caused by *Puccinia sorghi* in maize. **Tropical plant pathology**, v. 36, p. 264-266, 2011.
- BANNARI, Abdou et al. A review of vegetation indices. **Remote sensing reviews**, v. 13, n. 1-2, p. 95-120, 1995.
- BARBEDO, Jayme Garcia Arnal. An automatic method to detect and measure leaf disease symptoms using digital image processing. **Plant Disease**, v. 98, n. 12, p. 1709-1716, 2014.
- BARBEDO, J. G. A. A novel algorithm for semi-automatic segmentation of plant leaf disease symptoms using digital image processing. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 4, p. 210-224, 2016.
- BARDSLEY, S. J.; NGUGI, H. K. Reliability and accuracy of visual methods to quantify severity of foliar bacterial spot symptoms on peach and nectarine. **Plant Pathology**, v. 62, n. 2, p. 460-474, 2013.
- BLANCA, José et al. Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 1-19, 2015.
- BOCK, C. H. et al. Comparison of assessment of citrus canker foliar symptoms by experienced and inexperienced raters. **Plant Disease**, v. 93, n. 4, p. 412-424, 2009a.

- BOCK, Clive H. et al. From visual estimates to fully automated sensor-based measurements of plant disease severity: status and challenges for improving accuracy. **Phytopathology Research**, v. 2, n. 1, p. 1-30, 2020.
- BOCK, Clive H. et al. The effect of Horsfall-Barratt category size on the accuracy and reliability of estimates of pecan scab severity. **Plant Disease**, v. 97, n. 6, p. 797-806, 2013.
- BOCK, C. H. et al. The Horsfall-Barratt scale and severity estimates of citrus canker. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, n. 1, p. 23-38, 2009b.
- BOCK, C. H. et al. Some consequences of using the Horsfall-Barratt scale for hypothesis testing. **Phytopathology**, v. 100, n. 10, p. 1030-1041, 2010a.
- BOCK, C. H. et al. Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. **Critical reviews in plant sciences**, v. 29, n. 2, p. 59-107, 2010b.
- Bock, C. H., P. E. Parker, A. Z. Cook, and T. R. Gottwald. "Visual rating and the use of image analysis for assessing different symptoms of citrus canker on grapefruit leaves." *Plant Disease* 92, no. 4. 530-541, 2008.
- BONGIOLO NETO, Albino; REISFSCHNEIDER, Francisco JB; TAKATSU, Armando. Levantamento de grupos de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* no Brasil; [Reconocimiento de grupos de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en Brasil]. [Survey of Brazilian groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 881-889, 1986.
- CHIANG, Kuo-Szu et al. Effects of rater bias and assessment method on disease severity estimation with regard to hypothesis testing. **Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 523-535, 2016.
- ESCADAFAL, R.; BELGHITH, A.; BEN-MOUSSA, H. Indices spectraux pour la dégradation des milieux naturels en Tunisie aride. In: **6e Symp. Int. sur les mesures physiques et signatures en teledetection**. 1994. p. 253-259.
- FORBES, G. A.; KORVA, J. T. The effect of using a Horsfall-Barratt scale on precision and accuracy of visual estimation of potato late blight severity in the field. **Plant Pathology**, v. 43, n. 4, p. 675-682, 1994.
- GITELSON, Anatoly A. et al. Novel algorithms for remote estimation of vegetation fraction. **Remote sensing of Environment**, v. 80, n. 1, p. 76-87, 2002.
- GITAITIS, R.; McCARTER, S.; JONES, J. B. Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. **Plant Disease**, v.76, n.7, p.651-656, 1992.
- GODOY, Cláudia V.; KOGA, Lucimara J.; CANTERI, Marcelo G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia brasileira**, v. 31, p. 63-68, 2006.

- GOODE, M. J.; SASSER, M. Prevention – the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. **Plant Disease**, v.64, n.9, p.831-834, 1980.
- HAU, B.; KRANZ, J.; KÖNIG, R. Fehler beim Schätzen von Befallsstärken bei Pflanzenkrankheiten. Errors in the assessment of plant disease severities. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 96, n. 6, p. 649-674, 1989.
- HORSFALL J. G.; BARRATT R. W. An improved grading system for measuring plant diseases. **Phytopathology**, 35:655-655, 1945.
- JOHANNSEN, Wilhelm. The genotype conception of heredity. **The American Naturalist**, v. 45, n. 531, p. 129-159, 1911.
- JUHÁSZ, A. C. P. Herança da resistência à mancha-bacteriana em pimentão e avaliações estruturais associadas à interação *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria* – *Capsicum annuum* L. **Campos dos Goytacazes: UENF. 86p (Tese mestrado)**, 2002.
- KUMAR, Jitendra; PRATAP, Aditya; KUMAR, Shiv. Plant phenomics: an overview. **Phenomics in crop plants: trends, options and limitations**, p. 1-10, 2015.
- LIN, Tao et al. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. **Nature genetics**, v. 46, n. 11, p. 1220-1226, 2014.
- MATHIEU, Renaud et al. Relationships between satellite-based radiometric indices simulated using laboratory reflectance data and typical soil color of an arid environment. **Remote sensing of environment**, v. 66, n. 1, p. 17-28, 1998.
- MATIAS, Filipe Inácio; CARAZA-HARTER, Maria V.; ENDELMAN, Jeffrey B. FIELDImageR: an R package to analyze orthomosaic images from agricultural field trials. **The Plant Phenome Journal**, v. 3, n. 1, p. e20005, 2020.
- MELLO, S. C. M.; TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Diagrammatic scale for assessment of severity of tomato bacterial spot. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 447-448, 1997.
- MOYA, E. A.; BARRALES, L. R.; APABLAZA, G. E. Assessment of the disease severity of squash powdery mildew through visual analysis, digital image analysis and validation of these methodologies. **Crop Protection**, v. 24, n. 9, p. 785-789, 2005.
- NASCIMENTO, AR; BORGES, ML; BORGES, LC; PONTES, NC. Diferentes escalas diagramáticas como opções para a quantificação da mancha bacteriana do tomateiro. **Horticultura Brasileira** 30: S2041-S2047, 2012.
- NIEDERHEITMANN, Mariana. **Fenotipagem e associação genômica ampla para resistência à mancha bacteriana do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

- NITA, M.; ELLIS, M. A.; MADDEN, L. V. Reliability and accuracy of visual estimation of Phomopsis leaf blight of strawberry. **Phytopathology**, v. 93, n. 8, p. 995-1005, 2003.
- NUTTER, Forrest W.; ESKER, Paul D. The role of psychophysics in phytopathology: The Weber–Fechner law revisited. **European Journal of Plant Pathology**, v. 114, n. 2, p. 199-213, 2006.
- NUTTER JR, F. W.; SCHULTZ, P. M. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. **Canadian Journal of plant pathology**, 17(2), 174-184, 1995.
- NUTTER, F. W. et al. Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. **Phytopathology**, v. 83, n. 8, p. 806-812, 1993.
- OECD/FAO. 2020. OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029. OECD Publishing. Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- PARKER, S. R.; WHELAN, M. J.; ROYLE, D. J. Reliable measurement of disease severity. **Aspects of Applied Biology (United Kingdom)**, 1995a.
- PARKER, S. R., M. W. SHAW; D. J. ROYLE. "The reliability of visual estimates of disease severity on cereal leaves." **Plant Pathology** 44, no. 5: 856-864, 1995b.
- PIOTTO, F. A. et al. Avaliação de resistência a Xanthomonas perforans em acessos de tomateiro. Anais do 8º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Anais, 2015.
- PRATAP, Aditya et al. Using plant phenomics to exploit the gains of genomics. **Agronomy**, v. 9, n. 3, p. 126, 2019.
- PRICE, T. V. et al. A comparison of visual and digital image-processing methods in quantifying the severity of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 33, n. 1, p. 97-101, 1993.
- QUEZADO-DUVAL, Alice Maria; LOPES, Carlos Alberto; JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela. Avaliação de produtos alternativos para o controle da mancha-bacteriana em tomateiro para processamento industrial. **Embrapa Hortaliças-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2005.
- QUEZADO-DUVAL, Alice Maria; CAMARGO, Luis Eduardo A. Raças de Xanthomonas spp. associadas à mancha-bacteriana em tomate para processamento industrial no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 80-86, 2004.
- QUEZADO-SOARES A. M.; SILVA, V. L.; GIORDANO, L. B.; LOPES, C. A. Redução na produtividade de tomateiro para processamento industrial devido à mancha bacteriana. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 16, p. 266, 1998. Resumo.

- RICHARDSON, Arthur J.; WIEGAND, C. L. Distinguishing vegetation from soil background information. **Photogrammetric engineering and remote sensing**, v. 43, n. 12, p. 1541-1552, 1977.
- RIVA, Elaine Manelli et al. Inheritance of bacterial spot disease in *Capsicum annuum* L. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, n. 4, 2004.
- RODRIGUES NETO, J.; SUGIMORI, M. H.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. Raças de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.51, n.1/4, 1984.
- ROTHAN, Christophe; DIOUF, Isidore; CAUSSE, Mathilde. Trait discovery and editing in tomato. **The Plant Journal**, v. 97, n. 1, p. 73-90, 2019.
- SCHWANCK, André Aguiar; DEL PONTE, Emerson Medeiros. Accuracy and reliability of severity estimates using linear or logarithmic disease diagram sets in true colour or black and white: a study case for rice brown spot. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 10, p. 670-682, 2014.
- SHERWOOD, R. T. et al. Illusions in visual assessment of *Stagonospora* leaf spot of orchardgrass. **Phytopathology**, v. 73, n. 2, p. 173-177, 1983.
- SOMODI, G. Cameron et al. Screening tomato seedlings for resistance to bacterial spot. **HortScience**, v. 29, n. 6, p. 680-682, 1994.
- SOULÉ, Michael. Phenetics of natural populations I. Phenetic relationships of insular populations of the side-blotched lizard. **Evolution**, p. 584-591, 1967.
- SUN, Huijun et al. A comparison of disease severity measurements using image analysis and visual estimates using a category scale for genetic analysis of resistance to bacterial spot in tomato. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, n. 1, p. 125-136, 2014.
- TUCKER, Compton J. Red and photographic infrared linear combinations for monitoring vegetation. **Remote sensing of Environment**, v. 8, n. 2, p. 127-150, 1979.
- VAUTERIN, L. et al. Reclassification of *xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). World Population Prospects 2019: Data Booklet. ST/ESA/SER. A/424.
- VALE, F. X. R. et al. Quant-A software to quantify plant disease severity. In: **International workshop on plant disease epidemiology**. 2001. p. 161.
- XU, Yunbi. Envirotyping for deciphering environmental impacts on crop plants. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 4, p. 653-673, 2016.

- WALTER, Achim; LIEBISCH, Frank; HUND, Andreas. Plant phenotyping: from bean weighing to image analysis. **Plant methods**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2015.
- YADAV, N. V. S. et al. Development and validation of standard area diagrams to aid assessment of pecan scab symptoms on fruit. **Plant Pathology**, v. 62, n. 2, p. 325-335, 2013.
- YANG, W. Recent advances on genetics and mapping of resistance to bacterial spot in tomato. **Acta Horticulturae Sinica**, v. 40, n. 9, p. 1731, 2013.
- YANG, W.; FRANCIS, D. M. Marker-assisted selection in pyramiding resistance to bacterial speck and bacterial spot in tomato. **Phytopathology**, v.95, p.519-527, 2005.
- ZHAO, Chunjiang et al. Crop phenomics: current status and perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 714, 2019.

3 ESTIMATIVA DE PARÂMETROS GENÉTICOS RELATIVOS À RESISTÊNCIA A MANCHA BACTERIANA EM TOMATEIRO

Resumo

O tomateiro é uma das espécies hortícolas de maior importância no cenário agrícola em todo mundo, porém também apresenta uma alta sensibilidade aos fatores ambientais. Dentre as doenças que incidem sobre a cultura, a mancha bacteriana é uma das mais relevantes. Essa doença é causada por um complexo de bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas*. As condições ideais para desenvolvimento da bactéria são elevadas temperatura e umidade relativa. Os sintomas podem ser vistos em toda planta, sendo mais evidentes nas folhas, ocorrendo manchas amarronzadas, que podem necrosar e coalescer. Essa doença causa muitas perdas, pois reduz a taxa fotossintética e conseqüentemente o rendimento do cultivo. Programas de melhoramento vêm se dedicando à pesquisa para buscar uma cultivar com bom nível de resistência, uma vez que esta é a alternativa mais viável para seu controle. Com o avanço da ciência, várias ferramentas ômicas vêm sendo desenvolvidas e, no caso da mancha bacteriana no tomateiro, a fenômica tem ganhado espaço, pois as populações são avaliadas de maneira visual, fornecendo estimativas de pouca precisão, com muitos efeitos embutidos que prejudicam análises mais acuradas. Este trabalho teve como objetivo fenotipar acessos de uma coleção de germoplasma de tomateiro através do uso de imagens, a fim de validar esta metodologia e estimar os parâmetros genéticos da população avaliada. Utilizou-se um painel contendo 253 linhagens de tomateiro oriundas do Banco Ativo de Germoplasma de Tomateiro do LMH da Esalq/USP. Esses genótipos foram inoculados com *Xanthomonas perforans* e avaliados quanto à severidade da mancha bacteriana utilizando a abordagem de análise de imagens através do pacote FIELDImageR no software R. Uma calibração de filtragem de 50%, 40%, 30% e 20% foi realizada, a fim de eliminar observações oriundas de imagens com informações superestimadas. Os dados foram submetidos à análise de variância e então estimados os componentes genéticos pertinentes ao painel. Como resultados, obtivemos que eliminar genótipos com mais 40% de sintomas foi o mais adequado, pois houve a maximização do Coeficiente de determinação genotípico (\hat{H}^2) e da relação CVg/CVe. De maneira geral, os critérios para se realizar tais ajustes dependem de estudos prévios e conhecimento do material sob estudo. Em nosso estudo, o conhecimento prévio do padrão de sintomas de mancha bacteriana nas folhas e dos genótipos utilizados, permitiram a escolha assertiva dos níveis de filtragem, de modo foi possível identificar a melhor alternativa para esse procedimento. Por fim, é preciso reforçar de análises a partir de dados de fenotipagem mais confiáveis, robustos e acurados são a base para trabalhos de melhoramento molecular.

Palavras-chave: *Xanthomonas* spp., Análise de imagens, Herdabilidade

ESTIMATION OF GENETIC PARAMETERS RELATED TO RESISTANCE TO BACTERIAL SPOT IN TOMATO

Abstract

Tomato is one of the most important horticultural species in the agricultural scenario around the world, but it also presents a high sensitivity to environmental factors. Among the diseases that affect this crop, bacterial spot is one of the most relevant. This disease is caused by a complex of bacteria belonging to the genus *Xanthomonas*. The ideal conditions for the development of the bacteria are high temperature and relative humidity. The symptoms can be seen throughout the plant, but are most evident on the leaves, with brownish spots that can necrotize and coalesce. This disease causes many losses, because it reduces the photosynthetic rate and consequently the yield of the crop. Improvement programs have been dedicated to research to find a cultivar with a good level of resistance, since this is the most viable alternative for its control. With the advancement of science, several omics tools have been developed and, in the case of bacterial spot in tomato, phenomics has gained space, because populations are evaluated visually, providing estimates of little precision, with many embedded effects that hinder more accurate analysis. This work aimed to phenotype accessions of a tomato germplasm collection through the use of images, in order to validate this methodology and estimate the genetic parameters of the evaluated population. A panel containing 253 tomato lines from the Active Tomato Germplasm Bank of the LMH of Esalq/USP was used. These genotypes were inoculated with *Xanthomonas perforans* and evaluated for bacterial spot severity using the image analysis approach through the FIELDImageR package in R software. A filtering calibration of 50%, 40%, 30%, and 20% was performed in order to eliminate observations from images with overestimated information. The data were submitted to variance analysis and then the genetic components pertinent to the panel were estimated. As results, we obtained that eliminating genotypes with more than 40% of symptoms was the most appropriate, since the Coefficient of Genotypic Determination (\hat{H}^2) and the CVg/CVe ratio were maximized. In general, the criteria for making such adjustments depend on previous studies and knowledge of the material under study. In our study, the previous knowledge of the pattern of bacterial spot symptoms on the leaves and the genotypes used allowed the

assertive choice of filtering levels, so it was possible to identify the best alternative for this procedure. Finally, it is necessary to reinforce analyses from more reliable, robust and accurate phenotyping data are the basis for molecular improvement work.

Keywords: *Xanthomonas* spp., Image analysis, Heritability.

3.1 Introdução

O tomateiro é uma cultura extremamente sensível a fatores ambientais, sejam eles bióticos ou abióticos, devido em grande parte ao próprio processo de como se deu sua domesticação, o qual levou ao estreitamento da base genética da cultura. Dentre as doenças incidentes sobre o tomateiro, a mancha bacteriana é uma das mais relevantes, causando prejuízos econômicos aos produtores, por conta de perdas devido ao declínio da produção de frutos e o custo elevado dos produtos utilizados para tentar conter, com pouca eficiência, essa bacteriose (GOODE; SASSER, 1980; MARINGONI; KIMATI, 1987; QUEZADO-SOARES; LOPES, 2010).

A mancha bacteriana é causada por um complexo de bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas*, englobando quatro espécies: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* (SHARMA; BHATTARAI, 2019). É uma doença que se estabelece em condições favoráveis de elevadas temperaturas e umidade e cujos sintomas ocorrem em toda planta, como o aparecimento de manchas amarronzadas nas folhas, que podem necrosar e coalescerem, reduzindo a taxa fotossintética e consequentemente o rendimento da plantação (QUEZADO-SOARES; LOPES, 2010). O controle da mancha bacteriana é dificultado devido à grande variação do patógeno, podendo surgir isolados resistentes (MARCO; STALL, 1983; BOUZAR et al., 1999). Além disso, por se tratar de uma bacteriose, essa doença possui um difícil manejo, principalmente pela falta de produtos eficazes para seu controle.

Uma alternativa eficiente e de longo prazo para conseguir contornar os impactos dessa doença é através do uso de cultivares resistentes. Já existem genes conhecidos que conferem resposta hipersensível na planta (SCOTT; JONES, 1989, SCOTT et al., 1995; ASTUA-MONGE et al., 2000). Entretanto, esse tipo de reação não se correlaciona com a resistência em nível de campo (SCOTT et al., 1995; ROBBINS et al., 2009). A resistência quantitativa, que abrange várias espécies e raças do patógeno, também tem sido encontrada e reportada em alguns estudos (SOUZA et al., 2008; HUTTON et al., 2010).

Nos programas de melhoramento, a resistência é frequentemente medida pela severidade da doença ou nível de desfolha (LOBO et al., 2005). Para mancha bacteriana no tomateiro essa avaliação é usualmente realizada através de escalas visuais, na qual notas são atribuídas à planta de acordo com a severidade frente ao ataque da bactéria. Esse tipo de medição

pode gerar estimativas de baixa precisão, devido aos vieses envolvidos neste processo, como percepções diferentes de cada avaliador em relação ao nível de sintomas e incapacidade do olho humano quantificar a área da folha afetada pela doença. Assim, a fenotipagem com uso de imagens é uma alternativa que traz confiabilidade nas estimativas e proporciona informações mais assertivas para direcionar o melhorista em sua tomada de decisão sobre a seleção.

Nos programas de melhoramento as pesquisas são realizadas com intuito de encontrar genes de resistência que possam ser incorporados nos genótipos a serem lançados como cultivares comerciais. Acessos selvagens e de tomateiro cultivado possuem genes que conferem resistência a algumas espécies de *Xanthomonas* (SHARMA; BHATTARAI, 2019) e podem ser introduzidos nos ciclos desses programas. Entretanto, ainda não existe uma cultivar comercial que apresente resistência satisfatória em relação às espécies de *Xanthomonas* (SHARMA; BHATTARAI, 2019). Este fato se justifica pela complexidade em se desenvolver uma cultivar com resistência quantitativa, pois possuem alguns genes no controle de tipo de característica, além de possuírem efeitos aditivos, dificultando este processo além do tempo em pesquisas ser maior (LOBO, 2000).

No tomateiro, o melhoramento consiste inicialmente em selecionar genitores para seguir nos programas e obter um híbrido ao final (CAPPETTA et al., 2020). Nesse sentido, a variabilidade genética é muito importante, pois representa a variação de alelos que podem ser incorporados nos ciclos de melhoramento. Espécies selvagens de tomate vêm sendo utilizadas desde 1940 por melhoristas nos programas (ABREU, 2005), sendo que os parentais silvestres quando introduzidos nos cruzamentos, podem oferecer caracteres importantes como resistência a doenças e de qualidade de fruto, proporcionando variabilidade genética para o desenvolvimento de novas cultivares de tomate (ERCOLANO et al., 2012; SACCO AET AL., 2013; D'ESPOSITO et al., 2019). Ter um banco de germoplasma diverso é valioso ao melhorista, bem como conhecer toda essa variabilidade que se tem em mãos, de tal modo que estimar os parâmetros genéticos com base nas coleções de germoplasma é uma maneira para conhecer a variabilidade contida em uma população ou nessas coleções (VENCOVSKY, 1978).

Essas estimativas quantificam a variância aditiva e de dominância, desenhando a estrutura genética dessas características quantitativas (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2004). Fundamentados nessas variâncias conseguimos estimar os parâmetros genéticos, como correlações e a herdabilidade, os quais são de extrema importância para o melhoramento genético (ABREU, 2005). Estudos que desvendam os componentes da variação fenotípica são essenciais neste contexto, possibilitando conhecer os efeitos genéticos e ambientais que governam a expressão do fenótipo, possibilitando assim uma seleção mais eficiente. A porção genética é

fortemente influenciada pelo ambiente e quanto maior for essa ação mais difícil será para realizar a seleção de genótipos superiores com base no fenótipo (BORÉM, 1998).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo fenotipar os acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Tomateiro do Laboratório de Melhoramento de Hortaliças, a fim de validar a metodologia de fenotipagem por análise de imagens, utilizando os dados para estimar os parâmetros genéticos relativos aos genótipos avaliados.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Condições e local dos experimentos

O experimento foi realizado em duas estufas no Departamento de Genética da Esalq/USP, localizado na cidade de Piracicaba-SP, entre abril a maio de 2019. As condições ambientais da época são apresentadas na tabela (Tabela 12).

Tabela 12. Condições climatológicas da época em que o experimento foi realizado.

T média (°C)	T máxima (°C)	T (°C)	Umidade Relativa (%)
23,7	29,5	17,8	78,0

Fonte: Série de dados climatológicos Esalq/USP.

3.2.2 Material vegetal, inoculação e condução do experimento

Foi utilizado um painel de 253 genótipos oriundos do Banco Ativo de Germoplasma do Laboratório de Melhoramento de Hortaliças (LMH), do Departamento de Genética da Esalq/USP (Anexo A). Tais acessos são linhagens da espécie de tomateiro cultivada, *Solanum lycopersicum* L. var. *esculentum* e também da variedade botânica cerasiforme (*Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme*).

O ensaio seguiu a metodologia de preparação das mudas e processo de inoculação já descrita detalhadamente no capítulo anterior. O material bacteriano utilizado foi o isolado 9C, com base em estudo previamente realizado, destacando sua agressividade e estabilidade quando inculado em plantas de tomateiro (NIEDERHEITMANN, 2020).

Após processo de inoculação as mudas foram transplantadas para vasos de cinco litros contendo substrato comercial, utilizando-se um delineamento em blocos causalizados, com parcela composta por quatro plantas. O experimento foi composto por duas repetições, sendo cada repetição ou bloco alocado em uma casa de vegetação, uma adjacente à outra.

3.2.3 Avaliação e análise de imagens

Depois de 15 dias da inoculação, foi realizada a coleta de duas folhas, entre a segunda e a quinta já expandidas e contendo maiores níveis de sintomas de mancha bacteriana. Essas folhas foram fotografadas utilizando uma câmera fotográfica digital – Nikon Coolpix P510 – apoiada em uma estrutura a qual mantinha as condições de altura e escala homogêneas durante as avaliações. As imagens foram processadas no software R, utilizando o pacote FIELDImageR (MATIAS et al., 2020), que realiza uma análise de detecção da área afetada de maneira automatizada e eficiente. A metodologia de análise segue a descrição detalhada do capítulo anterior.

3.2.4 Procedimento de filtragem dos dados

Como já demonstrado no capítulo anterior, a fenotipagem por análise de imagem tende a superestimar os percentuais de área afetada com a doença nas folhas. Neste caso, foram então aplicados filtros para remoção de imagens, eliminando as observações que tinham valores em percentual de 50%, 40%, 30% e 20%, para comparação com os dados sem a aplicação destes filtros. Esta faixa de valores foi selecionada, pois raramente observamos folhas com de 50% de área mostrando sintomas, ao passo que 20% é um valor razoável e coerente de percentual de sintomas nas folhas de acessos mais susceptíveis, tal como observado no capítulo anterior.

3.2.5 Análises estatísticas e estimação dos parâmetros genéticos

O modelo estatístico da análise dos dados seguiu de conforme descrito a seguir:

$$y_{ij} = m + g_i + b_j + e_{ij}$$

Onde:

y_{ij} : observação referente ao i -ésimo genótipo no j -ésimo bloco,

m : média geral

g_i : efeito do i -ésimo genótipo

b_j : efeito do j -ésimo bloco

e_{ij} : erro associado ao i -ésimo genótipo no j -ésimo bloco

A partir das esperanças dos quadrados médios foram então obtidas as estimativas do coeficiente de determinação genotípico (\hat{H}^2), coeficiente de variação genotípico (CV_g), do coeficiente de variação experimental (CV_e), além da razão CV_g/CV_e de acordo com as fórmulas a seguir:

$$\hat{H}^2 = \frac{QMG - QMR}{QMG} \times 100$$

$$CV_g = 100 \times \frac{\sqrt{\hat{\Phi}_G}}{\bar{x}}$$

$$CV_e = 100 \times \frac{\sqrt{QMR}}{\bar{x}}$$

$$\hat{\Phi}_G = \frac{QMG - QMR}{r}$$

Sendo que:

QMG: quadrado médio de genótipos

QMR: quadrado médio do resíduo

$\hat{\Phi}_G$: estimador do componente quadrático associado à variação genotípica para cada caráter avaliado

\bar{x} : média geral do caráter

Todas as análises foram realizadas no software R versão 4.1.0.

3.3 Resultados e Discussão

Como já ressaltado anteriormente, a resistência à mancha bacteriana é uma característica quantitativa, controlada por vários genes, sendo fortemente afetada pela ação ambiental. Sendo assim, quantificar os efeitos ambientais é algo relevante, pois é necessário dimensionar o esforço que será demandado no processo de seleção, uma vez que a variância genética pode ser confundida com tal efeito, reduzindo a correlação entre fenótipo e genótipo. Além disso, quando conseguimos isolar os efeitos genéticos, podemos determinar a herdabilidade (neste caso tomada como coeficiente de determinação genotípico, pelo efeito fixo de genótipos), que é um dos

parâmetros mais importantes para os ciclos de seleção. Neste estudo, foram avaliadas 3951 imagens e, à medida que aplicamos os filtros, fomos reduzindo este número e até mesmo perdendo alguns genótipos (Tabela 13).

Tabela 13. Estimativa das médias e parâmetros genéticos obtidos em cada procedimento de processamento de imagens por filtragem de eliminação.

Parâmetros	100%*	50%	40%	30%	20%
\bar{x}	0,305	0,2500	0,2290	0,1979	0,1523
$\hat{\Phi}_G$	0,0058	0,0017	0,0012	0,00053	0,00024
σ_e^2	0,0127	0,0043	0,0026	0,0014	0,00055
\hat{H}^2	0,4632	0,4479	0,4790	0,4271	0,4607
CVe (%)	36,93	26,20	22,26	18,98	15,41
CVg (%)	24,26	16,68	15,09	11,59	10,07
CVg/CVe	0,6569	0,6366	0,6779	0,6106	0,6536
Nº imagens removidas	0	573	925	1533	2565
Nº genótipos perdidos	0	0	0	2	18
Nº total de genótipos	253	253	253	251	235

* Total de 3951 imagens sem exclusão por filtragem.

O procedimento de filtragem por remoção de imagens foi necessário devido à superestimação da área afetada com sintomas de mancha bacteriana relatada no capítulo anterior. O mesmo problema foi encontrado no estudo onde foram comparados diferentes métodos de avaliação de ferrugem no milho, dentre eles avaliação através do uso de imagens, o qual se baseava na seleção de cores de acordo com critérios já definidos. Como resultado, o autor identificou que áreas como a parte da nervura e lígula, e até mesmo áreas de sombras, estavam contabilizando como lesões da doença, e então foi aplicado um limiar para amenizar os efeitos oportunistas que se confundiam com os sintomas da doença (BADE; CARMONA, 2011). Mesmo utilizando análise de imagens, pode ocorrer imprecisão nas estimativas dos níveis reais da doença (NUTTER et al., 1993).

Alguns autores já realizaram simulações para verificar que o processo de avaliação de doenças pode ocasionar falsos negativos, ou erros do tipo II (CHRIST, 1991; NEWTON; HACKETT, 1994; PARKER et al., 1995; BOCK et al., 2010; CHIANG et al., 2014; CHIANG et al., 2017; BOCK et al., 2020). O erro do tipo I (falso positivo) pode ocorrer, mas para doenças em plantas não tem sido citado (BOCK et al., 2020). Garantir que as estimativas tenham maior precisão possível é fundamental para o sucesso da seleção em termos práticos, uma vez que irão reduzir esses erros (BOCK et al., 2020).

Neste estudo, os filtros aplicados de 50%, 40%, 30% e 20% geraram a remoção de 573, 925, 1533 e 2565 imagens, respectivamente. Como resultado, foi possível observar que a média dos genótipos ao longo dessas filtragens vai reduzindo, o que já era esperado, uma vez que as imagens com valores muito altos foram sendo eliminadas à medida que o *threshold* foi sendo reduzido. Vale lembrar que neste procedimento foram eliminadas imagens individuais, dentre as oito imagens que compunham a média de cada parcela. Uma vez eliminada as imagens de acordo com cada filtragem, as médias para as parcelas foram sendo recalculadas, de modo que, quando todas as oito imagens de cada repetição eram eliminadas, o genótipo era considerado como perdido, sendo realizada tal anotação.

Neste caso, a filtragem removendo imagens com mais de 40% de danos foi a que obteve melhores resultados, pois como a remoção ocorreu ao nível de imagens da parcela, todos os acessos foram ainda conservados para serem analisados. No limiar mais rigoroso de 20% foram excluídos 18 acessos, ou seja, um total de 18 genótipos que tiveram todas as imagens removidas, de ambas as repetições, com valores acima de 20% de sintomas.

A análise de agrupamento do conjunto de genótipos individualmente após cada filtragem está contida no Anexo B. Nela podemos ver que médias menores, ou seja, os genótipos mais resistentes, não são muito impactados pela filtragem nos níveis, como por exemplo o genótipo 279, que se manteve constante, com nível de área afetada próximo de 20% em praticamente todas as filtragens, com exceção do limiar mais rígido de 20% que eliminou algumas fotos dentro da parcela e reduziu sua média para 15% de sintomas. Já os dados brutos do genótipo 6 mostram que o mesmo tinha em média 35% de sintomas pela análise de imagem. Após as filtragens de 50%, 40%, 30% e 20%, os dados ficaram com percentual de área afetada pela doença de 19%, 16%, 16% e 15%, respectivamente. Essas informações mostram que após a primeira filtragem a média tendeu a variar pouco, o que leva a crer que algumas poucas imagens estavam levando ao viés da superestimação do valor do genótipo, ou seja, este seria um genótipo mais resistente que erroneamente seria tomado como susceptível.

Conhecer e elucidar a natureza da variação encontrada para uma característica é extremamente relevante, pois discriminamos a porção devida a fatores externos (ambiental) e internos (genética), sendo apenas a variação genética utilizada para fins de seleção (CRUZ, 2005). A variância genética, no caso do tomateiro, possui maior proporção de variância aditiva, devido a sua estrutura genética. Lobo et al. (2005) relatou a predominância de efeitos aditivos no controle da resistência do tomateiro à mancha bacteriana, a qual pode estar ligada aos indivíduos homocigotos das gerações subsequentes.

Neste caso não desmembramos a variância genética em seus componentes, sendo que a utilizamos apenas para entender a evolução do coeficiente de determinação genotípico (equivalente à herdabilidade, mas considerando genótipos com efeito fixo) a cada nível de filtragem. O coeficiente de determinação genotípico (\hat{H}^2) teve pouca variação ao longo das filtragens, tendo um acréscimo no limiar de sintomas até 40% ($\hat{H}^2 = 0,48$). O valor da \hat{H}^2 foi relativamente baixo quando comparado ao trabalho de Niederheitmann (2020), onde ela realizou um treinamento para avaliar a severidade da mancha bacteriana através de análises de imagens. Neste trabalho de Niederheitmann (2020), foram encontrados valores de herdabilidade que variaram de $h^2 = 0,65$ a $h^2 = 0,78$, porém considerando três experimentos em épocas diferentes, o que ajuda a aumentar a acurácia desta predição. Em um trabalho realizado por Lobo et al. (2005) utilizando escala diagramática como forma de avaliação, a herdabilidade encontrada foi variou de $h^2 = 0,70$ a $h^2 = 0,87$, de forma geral, sendo que o menor valor de herdabilidade foi de $h^2 = 0,34$, oriundo do cruzamento de Ohio 8245 e Hawaii 7998, os dois genótipos resistentes utilizados no estudo.

Eliminando as imagens com mais de 50% e 30% de sintomas, coeficiente de determinação genotípico chegou a $\hat{H}^2 = 0,45$ e $\hat{H}^2 = 0,43$, respectivamente. Estes valores refletem a parte da variação fenotípica total explicada pelos efeitos genéticos. Sendo assim, valores de \hat{H}^2 elevados correspondem a uma correlação elevada entre o valor fenotípico e o valor genotípico, ou seja, a variação estimada entre os genótipos corresponderá, em boa parte, às variações devidas aos efeitos de natureza genética de cada genótipo, proporcionando uma seleção mais acertiva (CRUZ, 2005). No trabalho de Hutton et al. (2010b), onde foi avaliada a herança da resistência do tomateiro a *Xanthomonas perforans* (T4) e a herdabilidade no sentido amplo de $h^2 = 0,66$. A herdabilidade é uma característica intrínseca da população e das condições as quais esses genótipos foram avaliados (RAMALHO et al., 1993; CRUZ; REGAZZI, 1997).

Outro parâmetro relevante é o coeficiente de variação genética (CVg), que reflete o ganho ocorrido em relação à média durante o processo de seleção (FALEIRO et al., 2002; RESENDE, 2009), impactando diretamente no ganho com seleção (FERRÃO et al., 2008).

Neste caso, o CVg foi reduzindo à medida que a filtragem foi ficando mais severa. Isso porque os valores de menores percentuais de sintomas indicam plantas mais resistentes, ou seja, à medida que os filtros vão reduzindo há uma tendência em eliminar os genótipos mais susceptíveis ou aqueles mais acometidos por erros. Para a filtragem de 40%, o CVg foi de 15,09%, enquanto que para a filtragem de 20% o valor encontrado foi de CVg = 10,07%. É mais preciso realizar a seleção quando o CVg é maior, uma vez que os valores fenotípicos representam mais fielmente os valores genéticos (CRUZ; CARNEIRO, 2003).

O coeficiente de variação ambiental (CVe) é um parâmetro estatístico para determinar a precisão do experimento. Valores menores que 10% são classificados como baixos, e valores maiores que 30% são considerados altos (PIMENTEL GOMES, 2000). No nosso estudo estes valores foram reduzindo à medida os filtros mais severos foram sendo aplicados. Isso demonstra que as repetições foram se tornando mais homogêneas. Quando eliminamos imagens com mais de 40% de sintomas percebemos um CVe de 22,26%, o que se enquadra em uma precisão boa. Por se tratar de um ensaio realizado em condições controladas, em casas de vegetação, o CVe ficou com valor condizente com a natureza do trabalho.

A relação CVg/CVe, proposta por Venkovsky (1978), denota que valores acima de 1,0 conferem uma condição promissora à seleção (VENKOVSKY; BARRIGA, 1992; FALEIRO et al., 2002). Essa relação reflete a variação genética e não está ligada diretamente à média da população (FONSECA et al., 2010). Valores de CVg foram sempre inferiores aos valores de CVe, indicando que os efeitos externos estão mascarando os efeitos genéticos. Os resultados da relação CVg/CVe mostraram valores inferiores a 1,0, o que, para fins de seleção não é tão adequado, pois a variação do erro é grande, ou seja, há bastante influência ambiental.

Em relação do percentual médio de danos da doença nas folhas, para os dados brutos, observamos uma tendência assimétrica na distribuição nos dados (Figura 7). Em um estudo que comparou uso de imagens e análise visual para estimar área foliar afetada pela mancha bacteriana no tomateiro, foi verificado uma distribuição assimétrica desses valores quando as estimativas foram obtidas através do uso de imagens para uma população F₂ (SUN et al, 2014). Segundo ainda esses autores, as estimativas apresentaram um viés na distribuição, as quais foram tentenciadas para o nível de baixa severidade da doença. Em outro ensaio em nível de campo que avaliou herança da resistência em populações segregantes, através do cruzamento de genótipos contastantes de tomateiro à mancha bacteriana, percebeu-se que ocorreu, em todas as famílias, uma distribuição contínua assimétrica dos percentuais de área afetada pela doença (LOBO et al., 2005). Essa assimetria na distribuição dos valores de percentuais de doenças pode também ser devido a desvios de dominância presente no controle dessa característica (GOMES, 2011). Este

fato também foi observado por Hutton et al. (2010b), o qual foi evidenciado que a herança da resistência a *Xanthomonas perforans* (T4), nas três linhagens avaliadas é controlada predominantemente por genes de efeitos dominantes, porém também existe contribuição dos efeitos epistáticos e aditivos.

Quando aplicamos os filtros percebemos que, para os limiares de eliminação de imagens com mais de 50% e 40% de sintomas, os dados tendem a se comportar de maneira mais contínua, ou seja, se aproximando mais de uma distribuição normal. Esse comportamento é tipo de um caráter quantitativo, no qual a resistência a doença se encaixa, onde vários genes realizam o controle genético e há muito efeito do ambiente. Esse tipo de controle genético já foi estudado antes para resistência à mancha bacteriana em outros genótipos de tomateiro, mais especificamente para a raça T1 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (SCOTT; JONES, 1989; WHALEN et al., 1993; WANG et al., 1994; LOBO e al., 2005).

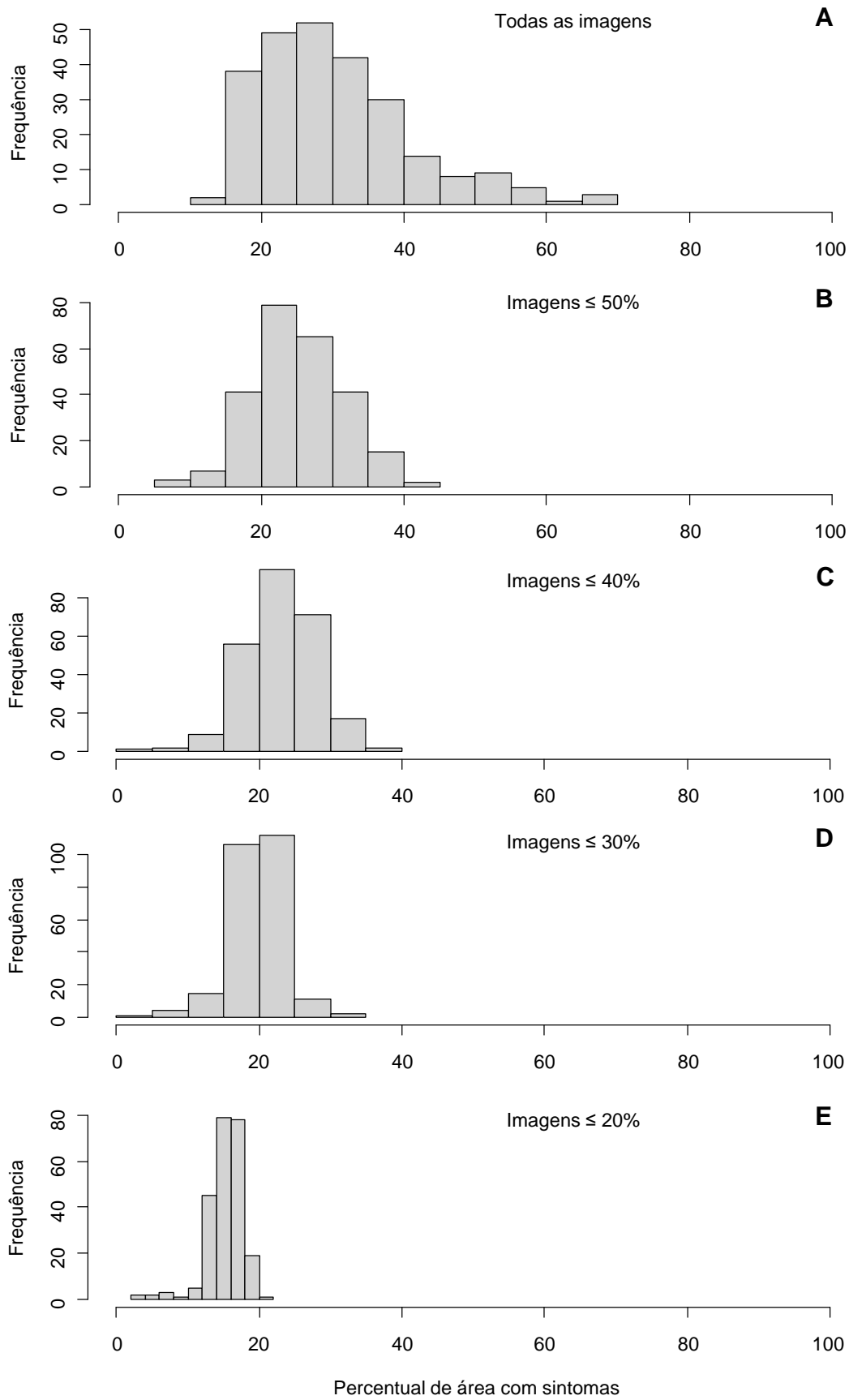


Figura 7. Distribuição das médias dos genótipos em relação ao percentual de danos.

De maneira geral, a eliminação das imagens com valores em percentual de área com sintomas acima de 40% parece ser a mais adequada para este conjunto de dados, uma vez conduziu à normalização das médias, nenhum genótipo foi eliminado, o CVe foi relativamente mais baixo e, por fim, os valores de \hat{H}^2 e relação CVg/CVe foi os maiores entre as filtrações utilizadas. Com isso, essa filtração de 40% seria a mais adequada para caracterização do conjunto de genótipos em questão.

Finalmente, com base nos resultados obtidos com a filtração de eliminação de imagens com mais de 40% de sintomas e considerando uma taxa de seleção de 5% dos melhores genótipos, ou seja, aqueles que possuem menos sintomas, 13 linhagens seriam selecionadas como potenciais genitores de um programa de melhoramento, visando aumentar a resistência à mancha bacteriana em tomateiro, conforme apresentado na tabela 14.

Tabela 14. Ordenamento dos genótipos selecionados como mais resistentes à mancha bacteriana em tomateiro.

Genótipos selecionados	Percentual (%) de área com sintomas de mancha bacteriana
32	3,47
52	5,94
46	5,96
153	10,03
68	11,23
163	11,27
207	12,96
241	13,69
92	14,13
24	14,16
53	14,78
215	15,00
271	15,08

Este estudo permitiu elucidar e colocar em prática uma calibração de metodologia realizada para avaliar a severidade da mancha bacteriana no tomateiro através do uso de imagens para estimar o percentual da área afetada pela doença. A partir de conhecimentos adquiridos em estudos anteriores, verificamos que o uso de imagens pode também apresentar alguns vieses que comprometem a precisão e acurácia das estimativas.

Os resultados contidos neste trabalho contribuíram para aperfeiçoar a metodologia de fenotipagem por análise de imagem para resistência a *X. perforans* em tomateiro, e também servir

de base para compor estudos futuros utilizando dados genômicos, fornecendo uma boa base para suportar a tomada mais precisa de decisão, permitindo seleções mais acertivas de genótipos para compor um programa cujo intuito será a obtenção de uma cultivar com resistência satisfatória à mancha bactéria.

3.4 Conclusões

Com base nos resultados apresentados neste capítulo, apresentamos as seguintes conclusões:

- O procedimento de filtragem de dados em estudos de fenotipagem de alto rendimento é necessário para se eliminar fontes de vieses nas análises;

- Os critérios para se realizar tais ajustes dependem de estudos prévios e conhecimento do material sob estudo. Em nosso estudo, o conhecimento prévio do padrão de sintomas de mancha bacteriana nas folhas e dos genótipos utilizados, permitiram a escolha acertiva dos níveis de filtragem, de modo foi possível identificar a melhor alternativa para esse procedimento;

- No escopo deste trabalho, considerando o atual conjunto de dados, foi possível determinar que o melhor parâmetro para filtragem foi baseado na eliminação de observações que apresentavam mais de 40% de sintomas nas folhas, pelo fato desta ter proporcionado a maior valor de \hat{H}^2 e maior valor da relação CVg/CVe , além de normalizar a distribuição das médias;

- O valor de $\hat{H}^2 = 0,48$ encontrado após a eliminação dos dados com mais 40% de sintomas nas folhas, é compatível com valores encontrados na literatura, podendo servir como referência na elaboração das estratégias de melhoramento, a partir do germoplasma em questão.

Referências

- ABREU, Flávia Barbosa. Herança da resistência a *Phytophthora infestans*, de características de frutos e seleção de genótipos resistentes na geração F5 de cruzamento interespecífico em tomateiro. 2005.
- ASTUA-MONGE, Gustavo et al. Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is specified by a plant-inducible avirulence gene. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 9, p. 911-921, 2000.
- BADE, Cecilia Inés A.; CARMONA, Marcelo A. Comparison of methods to assess severity of common rust caused by *Puccinia sorghi* in maize. **Tropical plant pathology**, v. 36, p. 264-266, 2011.

- BOCK, C. H. et al. Some consequences of using the Horsfall-Barratt scale for hypothesis testing. **Phytopathology**, v. 100, n. 10, p. 1030-1041, 2010.
- BOCK, Clive H. et al. From visual estimates to fully automated sensor-based measurements of plant disease severity: status and challenges for improving accuracy. **Phytopathology Research**, v. 2, n. 1, p. 1-30, 2020.
- BORÉM, A. Melhoramento de plantas. 2ª edição, Viçosa. **Editora UFV**, 1998.
- BOUZAR, H. et al. Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. **Phytopathology**, v. 89, n. 4, p. 328-335, 1999.
- CAPPETTA, Elisa et al. Accelerating tomato breeding by exploiting genomic selection approaches. **Plants**, v. 9, n. 9, p. 1236, 2020.
- CHIANG, Kuo-Szu et al. What interval characteristics make a good categorical disease assessment scale?. **Phytopathology**, v. 104, n. 6, p. 575-585, 2014.
- CHIANG, K. S.; LIU, H. I.; BOCK, C. H. A discussion on disease severity index values. Part I: warning on inherent errors and suggestions to maximise accuracy. **Annals of Applied Biology**, v. 171, n. 2, p. 139-154, 2017.
- CHRIST, B. J. Effect of disease assessment method on ranking potato cultivars for resistance to early blight. **Plant Disease**, v. 75, n. 4, p. 353-356, 1991.
- CRUZ, C. D. Princípios de genética quantitativa. Viçosa, MG: UFV, 2005. 394p.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, MG: Editora UFV, 2003. v.2. 623p
- CRUZ, C.D. & REGAZZI, A.J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2ª edição. Viçosa. Editora da UFV. 1997.
- D'ESPOSITO, Daniela et al. Deciphering the biological processes underlying tomato biomass production and composition. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 143, p. 50-60, 2019.
- ERCOLANO, M. R. et al. Genetic and genomic approaches for R-gene mediated disease resistance in tomato: retrospects and prospects. **Plant cell reports**, v. 31, n. 6, p. 973-985, 2012.
- FALEIRO, Fábio Gelape et al. Comparação de blocos casualizados e testemunhas intercalares na estimação de parâmetros genéticos em feijoeiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 37, p. 1675-1680, 2002.
- FERRÃO, Romário Gava et al. Parâmetros genéticos em café Conilon. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, p. 61-69, 2008.

- FONSECA, S. M.; RESENDE, M. D. V.; ALFENAS, A. C.; GUIMARÃES, L. M. S.; ASSIS, T. F.; GRATTAPAGLIA, D.; Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto. Editora UFV: Viçosa. 2010. 200p.
- FRITSCHÉ-NETO R, BORÉM A. Melhoramento de plantas para condições de estresses bióticos. Visconde do Rio Branco: Suprema, 240p. 2012.
- GOMES, Carlos Nick. Genética da resistência à requeima e seleção de famílias superiores derivadas do cruzamento *Solanum lycopersicum* SANTA CLARA e *Solanum habrochaites* f. *glabratum* BGH 6902. 2011.
- GOODE, Monroe J. et al. Prevention-the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. **Plant Disease**, v. 64, n. 9, p. 831-834, 1980.
- HORSFALL, James G. An improved grading system for measuring plant diseases. **Phytopathology**, v. 35, p. 655, 1945.
- HUTTON, Samuel F. et al. Identification of QTL associated with resistance to bacterial spot race T4 in tomato. **Theoretical and applied genetics**, v. 121, n. 7, p. 1275-1287, 2010a.
- HUTTON, Samuel F.; SCOTT, Jay W.; JONES, Jeffrey B. Inheritance of resistance to bacterial spot race T4 from three tomato breeding lines with differing resistance backgrounds. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 135, n. 2, p. 150-158, 2010b.
- LOBO, Valácia L. da S.; LOPES, Carlos A.; GIORDANO, Leonardo de B. Componentes da resistência à mancha-bacteriana e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, raça T2, em genótipos de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 17-20, 2005.
- LOBO, Valácia L. da S. **Herança e componentes da resistência a mancha-bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, raça T2), em tomateiro**. UnB, 2000.
- MATIAS, Filipe Inácio; CARAZA-HARTER, Maria V.; ENDELMAN, Jeffrey B. FIELDimageR: an R package to analyze orthomosaic images from agricultural field trials. **The Plant Phenome Journal**, v. 3, n. 1, p. e20005, 2020.
- MARCO, Guillermo M.; STALL, R. E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. 1983.
- MARINGONI, A. C.; KIMATI, H. Diferenciação sorológica entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* de pimentão e de Tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, p. 322-324, 1987.
- NEWTON, A. C.; HACKETT, C. A. Subjective components of mildew assessment on spring barley. **European Journal of Plant Pathology**, v. 100, n. 6, p. 395-412, 1994.

- NIEDERHEITMANN, Mariana. Fenotipagem e associação genômica ampla para resistência à mancha bacteriana do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). 2020. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- NUTTER JR, F. W. et al. Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. **Phytopathology**, v. 83, n. 8, p. 806-812, 1993.
- PARKER, S. R.; SHAW, M. W.; ROYLE, D. J. The reliability of visual estimates of disease severity on cereal leaves. **Plant Pathology**, v. 44, n. 5, p. 856-864, 1995.
- PIMENTEL GOMES, F.; Curso de estatística experimental, 14. Ed. Piracicaba: Degaspari. 2000. 477p.
- QUEZADO-DUVAL, Alice Maria; LOPES, Carlos Alberto. Mancha-bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2010.
- RAMALHO, Magno Antonio Patto et al. Genética na agropecuária. rev. **Lavras: Ufla**, 2004.
- RAMALHO, Magno Antônio Patto et al. **Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: UFG, 1993.
- RESENDE, M. D. V.; Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes. Brasília: Embrapa. 2009. 976 p.
- ROBBINS, Matthew D. et al. Characterization of hypersensitive resistance to bacterial spot race T3 (*Xanthomonas perforans*) from tomato accession PI 128216. **Phytopathology**, v. 99, n. 9, p. 1037-1044, 2009.
- SACCO, Adriana et al. Quantitative trait loci pyramiding for fruit quality traits in tomato. **Molecular Breeding**, v. 31, n. 1, p. 217-222, 2013.
- SCOTT, J. W.; JONES, J. B. Inheritance of resistance to foliar bacterial spot of tomato incited by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of the American Society for Horticultural Science (USA)**, 1989.
- SCOTT, J. W. et al. Screening tomato accessions for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, race T3. **HortScience**, v. 30, n. 3, p. 579-581, 1995.
- SHARMA, Sadikshya; BHATTARAI, Krishna. Progress in developing bacterial spot resistance in tomato. **Agronomy**, v. 9, n. 1, p. 26, 2019.
- SOUZA, Marcelo Francisco Mendes de et al. Resistance to *Xanthomonas* spp. in tomato: diallel analysis and gene effects estimative in a breeding programme carried out in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 156, n. 11-12, p. 660-667, 2008.

- SUN, Huijun et al. A comparison of disease severity measurements using image analysis and visual estimates using a category scale for genetic analysis of resistance to bacterial spot in tomato. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, n. 1, p. 125-136, 2014.
- VENCOVSKY, R Herança quantitativa. In: PATERNIANI, E., ed. **Melhoramento e produção de milho no Brasil**. Piracicaba: Fundação Cargill, 1978. p.122-201.
- VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496 p.
- WANG, J. F. et al. Several genes in *Lycopersicon esculentum* control hypersensitivity to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, v. 84, n. 7, p. 702-706, 1994.
- WHALEN, M. C. et al. Avirulence gene avrRxv from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Hawaii 7998. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 6, n. 5, p. 616-627, 1993.

ANEXOS

ANEXO A. Painel de genótipos de tomateiro pertencentes do BAG do Laboratório de Melhoramento de Hortaliças da Esalq/USP.

Painel	Acesso USP	Acesso	Nome
1	USP001		Olena Ukrainien
2	USP002		Pusa Ruby
3	USP003		Early cherry
4	USP004		Sebastopol
5	USP005		Cereja FC ("Perinha")
6	USP006		Santa Cruz Kada Gigante
7	USP007R		Corrogo
8	USP007M		Corrogo
9	USP008		San Marzano
10	USP009		Yoshimatsu-L3
11	USP010		Azure
12	USP011		Tecoh Tepee
13	USP012		Santa Clara
14	USP013		High Country
15	USP014		Immune
16	USP015		Indigo Rose
17	USP016		Banana Legs
18	USP017		Calabash Rouge
19	USP018		Coeur de Boeuf Jaune
20	USP019		Tasty Evergreen
21	USP020		Tropic Two Orders
22	USP021		Géante D'Orenburg
23	USP022		Solymari
24	USP023		Tomate Laranja Salada (Top Seed)
25	USP024		White Wonder
26	USP025		Pêche Rouge
27	USP026A		Prize of the Trial
28	USP026V		Prize of the Trial
29	USP027		Tomate Cereja Laranja (Top Seed)
30	USP028		Olirose de St Domingue
31	USP029		Persimmon
32	USP030		IPA-6
33	USP031		Santa Adélia
34	USP032		Amalia
35	USP033		INCA-945
36	USP034		Mara
39	USP038	LA4393	
40	USP039	LA2414	Cal Ace
41	USP040	LA4348	
42	USP041	LA2661	Nagcarlang

43	USP042	LA2706	MoneyMaker
44	USP043	LA4104	
45	USP044	LA1787	
46	USP045	LA4285	
47	USP046	LA2086	
48	USP047	LA1664	
49	USP048	LA4451	Black Cherry
50	USP049	LA4449	Black Plum
51	USP050	LA2413	
52	USP051	LA3667	
53	USP052	LA2644	
54	USP053	LA3736	
56	USP055	LA2830	
57	USP056	LA3847	NC HS-1
58	USP057	LA3043	
59	USP058	LA3471	
60	USP059	LA0806	
61	USP060	LA4425	
62	USP061	LA2399	
63	USP062	LA3273	
65	USP064	LA2445	
66	USP065	LA2531A	
67	USP066	LA4432	
68	USP067	LA2939	
69	USP068		Balkonstar
70	USP069		Saint Pierre
71	USP070		Motelle (PCTM)
72	USP072	LA4026	
73	USP073	LA3151	
74	USP074	LA3475	M82
75	USP082	CNPH0527	
76	USP083	CNPH0511	
77	USP084	CNPH0263	
78	USP085	CNPH0616	
79	USP086	CNPH0357	
80	USP087	CNPH0083	
81	USP088	CNPH0082	
82	USP089	CNPH0633	
83	USP090	CNPH0899	
84	USP091	CNPH0422	
85	USP092	CNPH0883	
87	USP094	CNPH0529	
88	USP095	CNPH0650	
89	USP096	CNPH0837	
90	USP097	CNPH0500	
91	USP098	CNPH0443	

92	USP099	CNPH0525	
93	USP100	CNPH1137	
94	USP101	CNPH1218	
95	USP102	CNPH1200	
96	USP103	CNPH0512	
97	USP104	CNPH0528	
98	USP105	CNPH0080	
99	USP106	CNPH0523	
100	USP107	CNPH1100	
101	USP108	CNPH0846	
102	USP109	CNPH0357	
103	USP110A	CNPH1138R	
104	USP110B	CNPH1138C	
105	USP111	CNPH0920	
106	USP112	CNPH0442	
107	USP113	CNPH0923	
108	USP114	CNPH0390	
109	USP115	CNPH0081	
110	USP116	CNPH0635	
111	USP117	CNPH0079	
113	USP119	CNPH0634	
114	USP120		Mangymakuh
115	USP121		Idyll
117	USP123		Hellfrucht
118	USP124		Tomate Gaúcho laranja (top seed)
119	USP125		Santa Cruz Kada (Paulista) - ISLA
120	USP126	LA0330	
121	USP127		Lingüiça Polonesa
122	USP128		Tomato tree
124	USP130		Des Andes
125	USP131		Prune Noire
126	USP132		Beauté Blanche
127	USP133		Striped Cavern
128	USP134		Poire Rouge
129	USP135		Tigerella
130	USP136		De Barao Gold
131	USP137		Noire de Crimée
132	USP138		Orange Queen
133	USP139		Podland Pink
134	USP140		Black Prince
135	USP141		Green Sausage
136	USP142		Eva's Purple Ball
137	USP143		Coeur de Boeuf Orange
138	USP144		Burbank
139	USP145		Ester Hess Yellow
140	USP146		Peasant

142	USP148	LA0791	Long Jhon
143	USP149	FAP0002	
144	USP150	FAP0001	
145	USP153	FAP0005	
146	USP154		Tomate Italiano para molhos (Topseed)
147	USP155		Tomate Pêra Amarelo (Topseed)
148	USP156	PNZ006	TSW-10 CNPH
149	USP157	PNZ009	AG 45 (Ohio 8145)
151	USP158B	PNZ102	Rotam-4
152	USP159A	PNZ100	Stevens
153	USP160	PNZ103	Rodade
154	USP161	PNZ223	Vietnamita-BWR
155	USP162		PCV-01
156	USP163		Hawaii 7996
161	GT0012		CAL J, LOTE: 478 1041
163	GT0027		SEED 062 CAMARILLO
164	GT0028		SEED 062 PETOEARLY
166	GT0033		FPA-4
170	GT0056		NEMADORO
177	GT0084		EARLY CASCADE 312
179	GT0087		SAINT PIERRE
180	GT0092		VF 90
186	GT0102		CARAÍBA
188	GT0104		SEED VF 198
190	GT0106		SEED NAPOLI VF
194	GT0117		PETO 13
195	GT0127		FARLYSTONE, LOTE: 5921006
197	GT0130		PETOEARLY, LOTE: 6721067
198	GT0131		RIO GRANDE, LOTE: 7457042
199	GT0135		SANTA CRUZ KADA
200	GT0137		PIRACÓ
201	GT0138		PIRACÓ PROJETO III
204	GT0148		UTHAH 20
205	GT0150		SANTA CRUZ ANODA
206	GT0162		CASTLONG, LOTE: 2237-69
207	GT0163		CASTLEBLOCK, LOTE: 2299-245
208	GT0164		CASTLESTAR EHV, LOTE: 2627
209	GT0165		UC - 82-A, LOTE: 2556
210	GT0166		CASTLEMOR IMP., LOTE: 2416-15
211	GT0167		CALYPSO, LOTE: 2697
214			Tomate Cereja Samambaia (Tradicional Hortaliças)
215			Santa Clara (Hortec)
216			San Marzano PCS 9/2001 (LG)
217			Minitomate Acesso 21 - IAC (melhor)

219		Cuor di bue (Hortus Sementi)
220		Saint Pierre (Hortus Sementi)
221		Santa Cruz Kada Gigante (Top Seed)
222		San Marzano (Landen)
223	IAC-1689	Homesweet Heirloom
224	IAC-1693	Aussie Heirloom
225	IAC-1691	Black Prince Heirloom
226	IAC-1692	Costoluto genovese (multiplicação)
227	IAC-1692	Costoluto genovese
228	IAC-1696	Caspian Pink Heirloom
229	IAC-1695	Purple Russian Heirloom
230	IAC-1697	Cherokee Purple Heirloom
231	IAC-1694	Goliath Tomato
232	IAC-1693	Aussie Tomato
233	IAC-1690	Black Krim Heirloom
234		Tomate Santa Cruz + Brinde
235	IAC-1612	Peacevine
236	IAC-1613	S.T. Pierre
237	IAC-1614	Money Marker
239	IAC-1615	Matina
240	IAC-1617	Arkansas Trveller
241	IAC-1619	Stupice
242	IAC-1618	Bruno Simonetti
243	IAC-1605	Uco Plata
244	IAC-1606	TSW-10
245	IAC-1607	Mars
246	IAC-1608	ILDI Naranja
247	IAC-1610	Black Plum Paste
248	IAC-1611	Cradwich
249	CGT-01	Linha de origem desconhecida
250	CGT-03	Missouri 91
251	CGT-04	Missouri 93
253	CGT-06	Romitel
255	CGT-14	Rio Fuego
257	CGT-21-1	Hiril (Vermelho)
259	CGT-22	Rio Grande
260	CGT-23	UC 105
261	CGT-25	Rotec
262	CGT-26	Rossol
263	CGT-27	Rio Fuego
264	CGT-28	Hoffit
265	CGT-29	Mecline
266	CGT-32	Heinz 1548
267	CGT-33	M 204
269	CGT-35-1	Dela Plata
270	CGT-36	M 145 (Saladette)

271	CGT-37	PU 7328 (bu)
272	CGT-38	Romitel
273	CGT-43	Santa Adélia Super
275	CGT-45	Roquesso (Ag. 591)
276	CGT-47	Santa Clara Albino
277	CGT-48	Olho Roxo
279	CGT-52	Floradade (F2 Ve Sm)
280	CGT-54	Calypso
282	CGT-57	Angela Hiper
283	CGT-58	Europeel
284	CGT-62	Missouri
285	CGT-64	Príncipe Gigante Ag. 590
286	CGT-67	Yoshimatsu-4 (INPA)
287	CGT-68	Hoffit
288	CGT-72	Rimone
289	CGT-73	Licapal
291	CGT-77	Romitel
292	CGT-84	Santo Antonio
293	CGT-85	Motelle
294	CGT-88	Tropicana
295	CGT-90	Rotam-4
296	CGT-91	Rodade
297	CGT-97	Olho Roxo Melhorado
298	CGT-98	P213 - PA (Tropicana)
299		Tomate Ferraz Ipa-8 (Hortivale)
326	GT0048	PAKMOR (VF)
336	GT0077	HEINZ 1350
337	GT0085	SUPERMARKET 87170
343	GT0101	MECANO
348	GT0118	TROPIC
359	GT0181	"VERDINHO"

ANEXO B. Médias individuais dos genótipos, agrupadas pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Genótipo	Todas		Imagens		≤ Imagens		≤ Imagens		≤ Imagens	
	imagens		50%		40%		30%		20%	
1	0,19	C	0,19	B	0,19	B	0,18	B	0,13	B
2	0,19	C	0,19	B	0,19	B	0,19	A	0,16	A
3	0,46	B	0,34	A	0,23	A	0,19	A	0,16	A
4	0,23	C	0,23	B	0,22	B	0,19	A	0,15	A
5	0,26	C	0,26	B	0,23	A	0,21	A	0,18	A
6	0,35	B	0,19	B	0,16	B	0,16	B	0,15	A
7	0,35	B	0,24	B	0,22	B	0,21	A	0,14	A
8	0,18	C	0,18	B	0,18	B	0,18	B	0,15	A
9	0,26	C	0,26	A	0,25	A	0,22	A	0,17	A
10	0,19	C	0,19	B	0,19	B	0,19	A	0,17	A
11	0,23	C	0,21	B	0,20	B	0,17	B	0,15	A
12	0,40	B	0,33	A	0,31	A	0,26	A		
13	0,24	C	0,20	B	0,15	B	0,15	B	0,14	B
14	0,31	C	0,30	A	0,29	A	0,20	A	0,17	A
15	0,26	C	0,21	B	0,21	B	0,18	B	0,14	A
16	0,23	C	0,22	B	0,21	B	0,18	B	0,16	A
17	0,33	C	0,30	A	0,28	A	0,23	A	0,18	A
18	0,41	B	0,32	A	0,26	A	0,17	B	0,16	A
19	0,59	A	0,42	A	0,32	A	0,28	A		
20	0,36	B	0,29	A	0,25	A	0,24	A	0,17	A
21	0,25	C	0,23	B	0,22	B	0,18	B	0,16	A
22	0,16	C	0,16	B	0,16	B	0,16	B	0,15	A
23	0,17	C	0,17	B	0,17	B	0,16	B	0,13	B
24	0,26	C	0,16	B	0,14	B	0,11	C	0,08	C
25	0,30	C	0,24	B	0,24	A	0,21	A	0,16	A
26	0,23	C	0,23	B	0,22	B	0,20	A	0,15	A
27	0,24	C	0,21	B	0,20	B	0,19	A	0,16	A
28	0,34	B	0,25	B	0,25	A	0,20	A	0,14	B
29	0,44	B	0,30	A	0,26	A	0,23	A	0,15	A
30	0,33	C	0,25	B	0,25	A	0,22	A	0,12	B
31	0,31	C	0,25	B	0,24	A	0,22	A	0,12	B
32	0,39	B	0,06	B	0,03	B	0,02	C	0,02	D
33	0,32	C	0,31	A	0,27	A	0,21	A	0,17	A
34	0,28	C	0,24	B	0,22	B	0,22	A	0,14	B

35	0,22	C	0,22	B	0,22	B	0,20	A	0,16	A
36	0,38	B	0,26	A	0,26	A	0,23	A	0,16	A
39	0,32	C	0,26	B	0,26	A	0,23	A	0,16	A
40	0,41	B	0,32	A	0,28	A	0,24	A	0,20	A
41	0,37	B	0,32	A	0,20	B	0,18	B	0,13	B
42	0,28	C	0,28	A	0,26	A	0,23	A	0,14	B
43	0,34	C	0,32	A	0,25	A	0,25	A	0,17	A
44	0,40	B	0,30	A	0,20	B	0,16	B		
45	0,31	C	0,26	B	0,23	A	0,22	A	0,16	A
46	0,17	C	0,06	B	0,06	B	0,06	C	0,05	D
47	0,53	A	0,37	A	0,35	A	0,29	A		
48	0,51	A	0,25	B	0,23	A	0,22	A	0,18	A
49	0,20	C	0,20	B	0,20	B	0,18	B	0,16	A
50	0,37	B	0,32	A	0,28	A	0,25	A	0,17	A
51	0,33	C	0,26	B	0,24	A	0,20	A	0,12	B
52	0,19	C	0,06	B	0,06	B	0,06	C	0,03	D
53	0,15	C	0,15	B	0,15	B	0,15	B	0,14	B
54	0,30	C	0,29	A	0,28	A	0,23	A	0,16	A
56	0,35	B	0,34	A	0,31	A	0,24	A	0,17	A
57	0,28	C	0,25	B	0,25	A	0,22	A	0,16	A
58	0,25	C	0,25	B	0,25	A	0,23	A	0,18	A
59	0,28	C	0,28	A	0,25	A	0,20	A	0,17	A
60	0,33	C	0,30	A	0,28	A	0,23	A	0,13	B
61	0,25	C	0,23	B	0,23	A	0,21	A	0,18	A
62	0,35	B	0,31	A	0,28	A	0,20	A	0,15	A
63	0,48	A	0,32	A	0,26	A	0,23	A	0,14	B
65	0,32	C	0,30	A	0,24	A	0,23	A	0,17	A
66	0,37	B	0,27	A	0,25	A	0,22	A	0,18	A
67	0,39	B	0,35	A	0,25	A	0,21	A	0,13	B
68	0,47	A	0,20	B	0,11	B	0,06	C		
69	0,30	C	0,24	B	0,20	B	0,19	A	0,11	B
70	0,20	C	0,20	B	0,20	B	0,19	A	0,16	A
71	0,32	C	0,27	A	0,26	A	0,21	A	0,16	A
72	0,27	C	0,26	B	0,23	A	0,20	A	0,16	A
73	0,22	C	0,22	B	0,19	B	0,19	B	0,13	B
74	0,23	C	0,23	B	0,21	B	0,17	B	0,15	A
75	0,20	C	0,20	B	0,18	B	0,16	B	0,14	B

76	0,31	C	0,25	B	0,24	A	0,12	C	0,12	B
77	0,38	B	0,34	A	0,31	A	0,26	A		
78	0,26	C	0,25	B	0,24	A	0,21	A	0,12	B
79	0,25	C	0,23	B	0,19	B	0,17	B	0,11	B
80	0,19	C	0,19	B	0,16	B	0,15	B	0,14	B
81	0,29	C	0,26	A	0,23	A	0,19	B	0,16	A
82	0,29	C	0,27	A	0,25	A	0,21	A	0,18	A
83	0,37	B	0,21	B	0,19	B	0,10	C	0,10	C
84	0,42	B	0,28	A	0,28	A	0,19	A	0,18	A
85	0,22	C	0,21	B	0,20	B	0,17	B	0,09	C
87	0,40	B	0,33	A	0,28	A	0,20	A	0,17	A
88	0,51	A	0,37	A	0,33	A	0,29	A		
89	0,40	B	0,27	A	0,26	A	0,23	A	0,17	A
90	0,34	C	0,25	B	0,23	A	0,21	A	0,15	A
91	0,19	C	0,19	B	0,19	B	0,18	B	0,14	B
92	0,21	C	0,14	B	0,14	B	0,08	C	0,06	C
93	0,22	C	0,22	B	0,20	B	0,18	B	0,15	A
94	0,29	C	0,29	A	0,27	A	0,23	A	0,19	A
95	0,23	C	0,23	B	0,20	B	0,18	B	0,16	A
96	0,33	C	0,24	B	0,22	B	0,21	A	0,15	A
97	0,57	A	0,39	A	0,34	A	0,26	A		
98	0,30	C	0,16	B	0,16	B	0,11	C	0,12	B
99	0,31	C	0,27	A	0,25	A	0,20	A	0,16	A
100	0,35	B	0,29	A	0,25	A	0,23	A	0,16	A
101	0,37	B	0,29	A	0,26	A	0,13	B	0,13	B
102	0,47	A	0,30	A	0,26	A	0,22	A	0,13	B
103	0,32	C	0,27	A	0,26	A	0,20	A	0,15	A
104	0,35	B	0,27	A	0,25	A	0,22	A	0,13	B
105	0,54	A	0,36	A	0,24	A	0,18	B	0,18	A
106	0,53	A	0,36	A	0,33	A	0,27	A		
107	0,34	B	0,30	A	0,25	A	0,22	A	0,18	A
108	0,59	A	0,35	A	0,29	A	0,22	A	0,17	A
109	0,19	C	0,19	B	0,19	B	0,17	B	0,14	B
110	0,56	A	0,34	A	0,32	A	0,25	A		
111	0,28	C	0,25	B	0,22	B	0,21	A	0,13	B
113	0,29	C	0,26	B	0,23	B	0,22	A	0,14	B
114	0,48	A	0,35	A	0,31	A	0,23	A		

115	0,39	B	0,34	A	0,27	A	0,24	A	0,16	A
117	0,20	C	0,20	B	0,20	B	0,18	B	0,15	A
118	0,32	C	0,31	A	0,30	A	0,25	A	0,18	A
119	0,53	A	0,35	A	0,28	A	0,20	A	0,16	A
120	0,43	B	0,39	A	0,34	A	0,21	A		
121	0,42	B	0,35	A	0,28	A	0,25	A	0,18	A
122	0,36	B	0,30	A	0,28	A	0,17	B	0,13	B
124	0,53	A	0,29	A	0,29	A	0,22	A	0,13	B
125	0,38	B	0,33	A	0,29	A	0,22	A	0,17	A
126	0,38	B	0,33	A	0,28	A	0,23	A	0,16	A
127	0,27	C	0,27	A	0,24	A	0,20	A	0,15	A
128	0,40	B	0,33	A	0,22	B	0,19	A	0,15	A
129	0,32	C	0,28	A	0,25	A	0,20	A	0,14	B
130	0,28	C	0,25	B	0,24	A	0,18	B	0,13	B
131	0,37	B	0,30	A	0,28	A	0,24	A	0,15	A
132	0,37	B	0,35	A	0,26	A	0,25	A	0,19	A
133	0,40	B	0,29	A	0,27	A	0,17	B	0,15	A
134	0,38	B	0,31	A	0,27	A	0,21	A	0,17	A
135	0,29	C	0,29	A	0,28	A	0,23	A	0,19	A
136	0,20	C	0,20	B	0,20	B	0,17	B	0,15	A
137	0,28	C	0,28	A	0,26	A	0,21	A	0,14	B
138	0,36	B	0,29	A	0,24	A	0,23	A	0,14	B
139	0,58	A	0,21	B	0,21	B	0,21	A	0,17	A
140	0,34	B	0,33	A	0,31	A	0,23	A	0,19	A
142	0,30	C	0,28	A	0,26	A	0,22	A	0,17	A
143	0,34	B	0,27	A	0,26	A	0,21	A	0,12	B
144	0,26	C	0,20	B	0,16	B	0,16	B	0,05	D
145	0,32	C	0,30	A	0,27	A	0,23	A	0,17	A
146	0,39	B	0,33	A	0,29	A	0,27	A		
147	0,19	C	0,19	B	0,19	B	0,17	B	0,16	A
148	0,27	C	0,24	B	0,19	B	0,19	A	0,16	A
149	0,24	C	0,24	B	0,23	A	0,20	A	0,15	A
151	0,37	B	0,25	B	0,22	B	0,19	A	0,17	A
152	0,25	C	0,20	B	0,17	B	0,17	B	0,16	A
153	0,17	C	0,10	B	0,10	B	0,10	C	0,07	C
154	0,60	A	0,36	A	0,32	A	0,29	A		
155	0,49	A	0,33	A	0,28	A	0,14	B	0,10	C

156	0,34	C	0,31	A	0,29	A	0,19	A	0,17	A
161	0,51	A	0,32	A	0,28	A	0,23	A	0,17	A
163	0,45	B	0,11	B	0,11	B	0,13	B	0,09	C
164	0,38	B	0,28	A	0,28	A	0,18	B	0,13	B
166	0,44	B	0,30	A	0,30	A	0,24	A	0,15	A
170	0,28	C	0,25	B	0,25	A	0,22	A	0,14	B
177	0,25	C	0,24	B	0,22	B	0,18	B	0,16	A
179	0,32	C	0,31	A	0,28	A	0,23	A	0,16	A
180	0,28	C	0,23	B	0,21	B	0,19	A	0,16	A
186	0,26	C	0,26	B	0,25	A	0,22	A	0,15	A
188	0,16	C	0,16	B	0,16	B	0,15	B	0,13	B
190	0,24	C	0,22	B	0,21	B	0,19	A	0,16	A
194	0,67	A	0,39	A	0,35	A				
195	0,20	C	0,17	B	0,17	B	0,17	B	0,15	A
197	0,33	C	0,32	A	0,24	A	0,21	A	0,13	B
198	0,23	C	0,23	B	0,23	A	0,21	A	0,16	A
199	0,28	C	0,25	B	0,22	B	0,20	A	0,15	A
200	0,31	C	0,26	B	0,23	A	0,20	A	0,18	A
201	0,46	B	0,32	A	0,24	A	0,22	A		
204	0,50	A	0,40	A	0,32	A	0,24	A		
205	0,31	C	0,20	B	0,18	B	0,18	B	0,14	A
206	0,19	C	0,19	B	0,19	B	0,19	A	0,16	A
207	0,19	C	0,13	B	0,13	B	0,13	B	0,08	C
208	0,19	C	0,19	B	0,19	B	0,19	A	0,15	A
209	0,29	C	0,26	B	0,23	A	0,17	B	0,14	A
210	0,53	A	0,34	A	0,32	A	0,27	A		
211	0,16	C	0,16	B	0,16	B	0,16	B	0,14	B
214	0,42	B	0,25	B	0,25	A	0,19	A	0,18	A
215	0,17	C	0,15	B	0,15	B	0,15	B	0,12	B
216	0,17	C	0,17	B	0,17	B	0,17	B	0,15	A
217	0,22	C	0,22	B	0,20	B	0,20	A	0,17	A
219	0,37	B	0,27	A	0,27	A	0,24	A	0,17	A
220	0,33	C	0,32	A	0,29	A	0,25	A	0,14	B
221	0,26	C	0,23	B	0,23	A	0,18	B	0,17	A
222	0,18	C	0,18	B	0,18	B	0,17	B	0,15	A
223	0,21	C	0,21	B	0,20	B	0,19	A	0,13	B
224	0,29	C	0,25	B	0,25	A	0,23	A	0,15	A

225	0,22	C	0,22	B	0,21	B	0,20	A	0,17	A
226	0,23	C	0,23	B	0,21	B	0,20	A	0,15	A
227	0,29	C	0,26	A	0,23	A	0,20	A	0,17	A
228	0,25	C	0,25	B	0,25	A	0,21	A	0,17	A
229	0,29	C	0,29	A	0,25	A	0,22	A	0,19	A
230	0,20	C	0,20	B	0,20	B	0,20	A	0,15	A
231	0,28	C	0,26	A	0,26	A	0,23	A	0,16	A
232	0,19	C	0,19	B	0,19	B	0,19	A	0,15	A
233	0,20	C	0,20	B	0,20	B	0,19	B	0,16	A
234	0,30	C	0,23	B	0,22	B	0,17	B	0,16	A
235	0,16	C	0,16	B	0,16	B	0,16	B	0,13	B
236	0,17	C	0,17	B	0,17	B	0,17	B	0,14	A
237	0,24	C	0,22	B	0,22	B	0,19	A	0,15	A
239	0,19	C	0,19	B	0,19	B	0,17	B	0,14	B
240	0,17	C	0,17	B	0,17	B	0,16	B	0,15	A
241	0,14	C	0,14	B	0,14	B	0,14	B	0,14	B
242	0,18	C	0,18	B	0,18	B	0,17	B	0,14	B
243	0,36	B	0,28	A	0,27	A	0,24	A	0,15	A
244	0,24	C	0,22	B	0,22	B	0,20	A	0,15	A
245	0,43	B	0,28	A	0,27	A	0,23	A	0,17	A
246	0,23	C	0,23	B	0,22	B	0,21	A	0,17	A
247	0,18	C	0,18	B	0,18	B	0,18	B	0,15	A
248	0,41	B	0,26	A	0,26	A	0,19	A	0,14	A
249	0,22	C	0,22	B	0,21	B	0,18	B	0,15	A
250	0,22	C	0,20	B	0,19	B	0,19	A	0,14	B
251	0,23	C	0,23	B	0,21	B	0,20	A	0,16	A
253	0,25	C	0,25	B	0,23	A	0,21	A	0,17	A
255	0,24	C	0,24	B	0,23	A	0,20	A	0,17	A
257	0,35	B	0,33	A	0,19	B	0,19	A	0,15	A
259	0,25	C	0,20	B	0,20	B	0,17	B	0,11	B
260	0,26	C	0,23	B	0,20	B	0,18	B	0,16	A
261	0,22	C	0,22	B	0,20	B	0,16	B	0,14	A
262	0,22	C	0,22	B	0,21	B	0,18	B	0,17	A
263	0,30	C	0,25	B	0,21	B	0,19	A	0,17	A
264	0,29	C	0,24	B	0,24	A	0,20	A	0,17	A
265	0,22	C	0,22	B	0,20	B	0,20	A	0,16	A
266	0,15	C	0,15	B	0,15	B	0,14	B	0,12	B

267	0,24	C	0,24	B	0,24	A	0,21	A	0,17	A
269	0,22	C	0,22	B	0,22	B	0,20	A	0,17	A
270	0,18	C	0,18	B	0,18	B	0,18	B	0,15	A
271	0,15	C	0,15	B	0,15	B	0,14	B	0,13	B
272	0,18	C	0,18	B	0,18	B	0,18	B	0,15	A
273	0,31	C	0,27	A	0,26	A	0,23	A	0,17	A
275	0,23	C	0,20	B	0,20	B	0,17	B	0,14	A
276	0,70	A	0,22	B	0,22	B	0,16	B	0,16	A
277	0,22	C	0,20	B	0,19	B	0,17	B	0,16	A
279	0,22	C	0,20	B	0,20	B	0,19	A	0,15	A
280	0,21	C	0,21	B	0,21	B	0,20	A	0,17	A
282	0,67	A	0,40	A	0,36	A				
283	0,25	C	0,23	B	0,23	A	0,20	A	0,17	A
284	0,25	C	0,23	B	0,23	A	0,21	A	0,17	A
285	0,22	C	0,22	B	0,21	B	0,19	A	0,16	A
286	0,22	C	0,22	B	0,22	B	0,21	A	0,16	A
287	0,25	C	0,25	B	0,23	A	0,20	A	0,16	A
288	0,28	C	0,24	B	0,23	A	0,20	A	0,17	A
289	0,18	C	0,18	B	0,18	B	0,18	B	0,14	B
291	0,20	C	0,17	B	0,15	B	0,15	B	0,12	B
292	0,21	C	0,21	B	0,21	B	0,18	B	0,17	A
293	0,25	C	0,22	B	0,20	B	0,18	B	0,12	B
294	0,35	B	0,30	A	0,27	A	0,22	A	0,12	B
295	0,32	C	0,29	A	0,26	A	0,21	A	0,15	A
296	0,26	C	0,24	B	0,22	B	0,20	A	0,16	A
297	0,20	C	0,20	B	0,19	B	0,16	B	0,15	A
298	0,35	B	0,24	B	0,24	A	0,19	A	0,19	A
299	0,44	B	0,28	A	0,25	A	0,15	B	0,15	A
326	0,31	C	0,26	A	0,24	A	0,23	A	0,16	A
336	0,28	C	0,28	A	0,27	A	0,21	A	0,13	B
337	0,29	C	0,28	A	0,25	A	0,24	A	0,13	B
343	0,17	C	0,17	B	0,17	B	0,16	B	0,16	A
348	0,27	C	0,25	B	0,24	A	0,20	A	0,14	A
359	0,22	C	0,20	B	0,20	B	0,19	A	0,15	A
