

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

Fenotipagem e associação genômica ampla para resistência à mancha  
bacteriana do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

Mariana Niederheitmann

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

Piracicaba  
2021

Mariana Niederheitmann  
Engenheira Agrônoma

Fenotipagem e associação genômica ampla para resistência à mancha bacteriana do  
tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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  
2021

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

Niederheitmann, Mariana

Fenotipagem e associação genômica ampla para resistência à mancha bacteriana do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) / Mariana Niederheitmann. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2021.

98 p.

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

1. GWAS 2. Melhoramento vegetal 3. Interação planta-patógeno 4. Análise de imagens I. Título

## DEDICATÓRIA

*A Deus*  
OFEREÇO

*À minha família, pelo amor, apoio e orações em todos os momentos de minha vida.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Uma tese de Doutorado não é feita por uma única pessoa. Existe uma rede de apoio e um time por trás dela essenciais para o seu andamento. Por isso quero deixar aqui meus sinceros agradecimentos a todos que me auxiliaram, ampararam e acreditaram nesta desafiadora jornada que se encerra com tantas conquistas e aprendizados.

Ao grande autor e companheiro na estrada da vida: Deus. À Nossa Senhora Aparecida, por tantas bênçãos no meu caminho.

Aos meus pais Rubens e Teresa, aos meus irmãos Liliana e Luis Fernando, e toda minha família, pelas orações, apoio, exemplo, educação e amor incondicional, por serem as peças mais fundamentais para eu chegar até aqui. Minha eterna gratidão a vocês por tudo!!!

Ao meu namorado, Thomas, por toda torcida, paciência, bom-humor, carinho e prestatividade. Agradeço também pelo carinho de sua família durante meu tempo em Piracicaba.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando A. Piotto, pelos ensinamentos e direcionamentos, pela paciência e esforço no desafio de orientar sua primeira doutoranda.

Aos meus colegas do laboratório, da ESALQ, do GVENCK e de Piracicaba. Obrigada pela amizade, apoio, ajudas, aprendizados, compartilhamento de tantos momentos e ao legado que deixaram em minha vida. Um agradecimento super especial a Alline Sekiya, Letícia de Pierri, Jéssica Nogueira, João Nomura, Roberta Vidal, Gabriel Lopes, Leonardo Gotardi, Gustavo Nandi, Hellen Silva, Rafael Nalin, Fabiany Brito, Lillian Bibiano, Melissa Miranda, Willian Giordani, Filipe Matias, Hana Silva, Emília Tanaka, Vitória Anicchini, Gabriel Cypriano, Bruna Longatti e tantos outros que tiveram um papel tão importante nesse processo.

Ao meu coorientador Prof. Dr. David Francis, que me acolheu e ensinou tantas coisas durante meus seis meses na *The Ohio State University* (EUA), auxiliando na aquisição de novas habilidades e aumentando ainda mais o gosto de trabalhar com Genética e Melhoramento de Plantas. Um enorme obrigado também aos colegas e técnicos do Tomato Lab: Caleb Orchard, Su Subode, Sean Fenstermaker, Eduardo Bernal, Jin Cho e Troy Aldrich, à minha colega de apartamento Dana Hilfinger, aos amigos brasileiros Celeste e família, Denise, Cecília, Anderson e Felipe, bem como aos os demais queridos amigos que fiz em Wooster, Ohio.

À gloriosa Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade de cursar o Doutorado, e aos brilhantes professores do Departamento de Genética, pelos conhecimentos transmitidos e por serem exemplos inspiradores na formação de novos profissionais nessa área. Em especial, quero agradecer o Prof. Dr. Antonio Augusto F. Garcia, pela orientação inicial, carisma e exemplo de humildade; à Prof. Dra. Maria Carolina Quecine Verdi e ao Prof. Dr. Ricardo

A. de Azevedo, por disponibilizarem seus laboratórios e estruturas para as análises deste trabalho; à Prof. Maria I. Zucchi, aos pesquisadores Carlos Batista, Cristiane Taniguti e Erick M. G. Cordeiro e demais envolvidos no processo de genotipagem e filtragem de dados. Agradeço a Dra. Liliane De Diana Teixeira, da Clínica Fitopatológica da ESALQ/USP, por ceder parte dos isolados bacterianos deste estudo. Agradeço, também, a todos os funcionários do Departamento de Genética, dos quais destaco: os nossos técnicos de laboratório, Zé Carmezini e Amaral, bem como a Dra. Salete Gaziola, Cláudio Segatelli, Aparecido e João Pires, pelo apoio na condução dos experimentos; Léia, Sílvia, Fernandinho, Valdir, Carmo, Pipo, Macedônio e Berdan por auxiliarem nas formalidades, manutenção, material didático, informática e apresentações.

Ao Dr. Daniel P. Longatto pelo preparo das colônias bacterianas e auxílio na área de Fitopatologia.

À *The Ohio State University* (OSU) e ao *Ohio Agricultural Research & Development Center* (OARDC/OSU) pela acolhida como *Visiting Scholar* no período de 11/2018 a 04/2019.

A meus colegas da Bayer/Seminis, Rudimar, Jennifer e Mourad, pelo apoio e incentivo fundamentais durante este ano, e também à Fernanda, pela amizade e parceria.

Ao pesquisador Dr. Leonardo S. Boiteux (Embrapa Hortaliças) e professor Dr. Fernando C. Sala (UFSCar) pela disponibilidade e valiosas discussões durante a Banca de Defesa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 140587/2017-9) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Processo PDSE 88881.188993/2018-01) pela concessão de bolsas de Doutorado e de Estágio no Exterior.

A todos que contribuíram de alguma forma para eu chegar até aqui: MUITO OBRIGADA!

## EPÍGRAFE

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.” (Martin Luther King)*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. INTERAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS DE TOMATEIRO E ISOLADOS DE XANTHOMONAS EUVESICATORIA PV. PERFORANS POR MEIO DA ABORDAGEM GGE BILOT</b> .....	<b>17</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>17</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>18</b>
2.1. INTRODUÇÃO .....	18
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.2.1. <i>Identificação das espécies de Xanthomonas predominantes no Estado de São Paulo</i> .....	21
2.2.2. <i>Material vegetal e obtenção das mudas</i> .....	22
2.2.3. <i>Isolados bacterianos e inoculação</i> .....	23
2.2.4. <i>Instalação, condução e avaliação dos experimentos em casa de vegetação</i> .....	25
2.2.5. <i>Análises estatísticas</i> .....	26
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
2.3.1. <i>Identificação e seleção dos isolados para os experimentos</i> .....	27
2.3.2. <i>Reação dos genótipos em função de diferentes isolados de X. euvesicatoria pv. perforans</i> .....	28
2.3.3. <i>Estabilidade da reação de genótipos de tomateiro em função da inoculação de diferentes isolados de X. euvesicatoria pv. perforans</i> .....	35
2.3.4. <i>Estabilidade da patogenicidade de isolados de X. euvesicatoria pv. perforans inoculados em diferentes genótipos de tomateiro</i> .....	39
2.4. CONCLUSÕES .....	41
REFERÊNCIAS .....	42
<b>3. FENOTIPAGEM PARA RESISTÊNCIA À MANCHA BACTERIANA EM TOMATEIRO USANDO ANÁLISE DE IMAGENS</b> .....	<b>49</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>49</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>49</b>
3.1. INTRODUÇÃO .....	50
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.2.1. <i>Local e época de condução do experimento</i> .....	53
3.2.2. <i>Material vegetal e bacteriano, inoculação e condução dos experimentos</i> .....	53
3.2.3. <i>Análise de imagens</i> .....	54
3.2.4. <i>Determinação do melhor modelo para análise de imagens</i> .....	57
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
3.4. CONCLUSÕES .....	65
REFERÊNCIAS .....	65
<b>4. ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA PARA RESISTÊNCIA À MANCHA BACTERIANA EM TOMATEIRO</b> .....	<b>71</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>71</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>72</b>
4.1. INTRODUÇÃO .....	72
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
4.2.1. <i>Material vegetal</i> .....	74
4.2.2. <i>Fenotipagem</i> .....	75
4.2.3. <i>Extração de DNA</i> .....	76
4.2.4. <i>Genotipagem, chamada de SNPs e filtragem dos dados</i> .....	76
4.2.5. <i>Estrutura populacional e matriz de parentesco</i> .....	77
4.2.6. <i>Análises de Associação Genômica Ampla (GWAS)</i> .....	78
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	79

4.3.1. Marcadores obtidos e desequilíbrio de ligação .....	79
4.3.2. Estrutura populacional e matriz de parentesco .....	81
4.3.3. Análise GWAS: associações entre SNPs e resistência à mancha bacteriana .....	83
4.4. CONCLUSÕES .....	87
REFERÊNCIAS .....	88
<b>ANEXO.....</b>	<b>93</b>

## RESUMO

**Fenotipagem e associação genômica ampla para resistência à mancha bacteriana do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**

A mancha bacteriana, causada por bactérias do gênero *Xanthomonas*, é uma das doenças de maior importância no cultivo do tomateiro no Brasil e no mundo. Isso se deve à combinação de condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento, manejo de controle e prevenção muitas vezes ineficazes e, sobretudo, falta de resistência genética das cultivares comerciais à doença. A resistência do tomateiro à mancha bacteriana possui herança complexa e de padrão quantitativo, dificultando sua avaliação. Além disso, existe uma grande variação na patogenicidade entre espécies e isolados bacterianos, muitos dos quais causam reações distintas em diferentes genótipos de tomateiro e condições de cultivo. Assim, evidencia-se a necessidade do desenvolvimento de cultivares mais resistentes à mancha bacteriana, considerando os isolados de *Xanthomonas* spp. presentes nas condições tropicais brasileiras. Diante desse contexto, o objetivo deste trabalho foi desvendar a base genética da resistência à mancha bacteriana por meio de uma fenotipagem e genotipagem em larga escala, de forma a encontrar locos relacionados à doença em um estudo de associação genômica. Para tanto, buscou-se identificar a espécie predominante nas principais regiões produtoras do Estado de São Paulo, bem como um isolado capaz de induzir de forma estável os sintomas da mancha bacteriana em genótipos de tomateiro. Este estudo permitiu a exploração da interação entre genótipos, isolados e épocas de avaliação por meio de uma análise GGE Biplot, o qual revelou diferenças na patogenicidade de isolados bacterianos e na estabilidade dos mesmos em induzirem sintomas, ao longo de diferentes épocas. Este trabalho também possibilitou a criação de um *pipeline* de análise de imagens baseadas em *machine learning*, levando à identificação de um método aplicável a uma grande quantidade de imagens contendo folhas de tomateiro inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. Por fim, dados genotípicos provenientes do *SolCAP Infinium Array*, desenvolvido para tomateiro, e de genotipagem por sequenciamento (GBS) foram relacionados aos dados fenotípicos, permitindo o um estudo de associação genômica (GWAS), cujo modelo também incluiu a estrutura populacional e a matriz de parentesco como covariáveis. Este estudo foi feito utilizando dados fenotípicos provenientes tanto de análise de imagens quanto da avaliação usando escala de notas, permitindo a identificação de 25 SNPs, alguns dos quais já reportados próximos a regiões associadas com a resistência à mancha bacteriana. Este é o primeiro estudo, no Brasil, em que uma genotipagem em larga escala é realizada na cultura do tomateiro. Os resultados obtidos evidenciaram informações relevantes para o melhoramento do tomateiro visando resistência à mancha bacteriana, podendo contribuir em futuras pesquisas relacionadas a este tema.

Palavras-chave: GWAS, Melhoramento vegetal, Interação planta-patógeno, Análise de imagens

## ABSTRACT

**Phenotyping and genome-wide association for bacterial spot resistance in tomato  
(*Solanum lycopersicum* L.)**

Bacterial spot, caused by bacteria of the genus *Xanthomonas*, is one of the most important diseases in tomato worldwide, including Brazil. This is due to the combination of favorable environmental conditions for its development, management of control and prevention that are often ineffective and, especially, lack of genetic resistance to the disease in commercial cultivars. Tomato resistance to bacterial spot has a complex inheritance and a quantitative pattern, making its assessment difficult. In addition, there is a wide variation in the pathogenicity among species and bacterial isolates, many of which cause different reactions in different tomato genotypes and growing conditions. Thus, there is a need for the development of more resistant cultivars to bacterial spot, considering the isolates of *Xanthomonas* spp. present in Brazilian tropical conditions. Given this context, the objective of this work was to unveil the genetic basis of resistance to bacterial spot through a large-scale phenotyping and genotyping, in order to find loci related to the disease in a genomic association study. Therefore, we sought to identify the predominant species in the main São Paulo State producing regions, as well as an isolate capable of inducing the symptoms of bacterial spot in tomato genotypes in a stable manner. This study allowed to explore the interaction among genotypes, isolates and evaluation periods through a GGE Biplot analysis, which revealed differences in the pathogenicity of bacterial isolates and in their stability in inducing symptoms, across different periods. This work also enabled the creation of an image analysis pipeline based on machine learning, leading to the identification of a method applicable to a large number of images containing tomato leaves inoculated with *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. Finally, genotypic data from the SolCAP Infinium Array, developed for tomato, and from Genotyping-by-Sequencing (GBS) were merged with the phenotypic data, allowing the use of a genomic association (GWAS) model that also included the population structure and kinship matrix as covariates. This study was carried out using phenotypic data from both image analysis and from a rating scale, allowing the identification of 25 SNPs, some of which previously reported close to regions associated with bacterial spot resistance. This is the first study in Brazil in which a large-scale genotyping is carried out on the tomato crop. The results showed relevant information for the tomato breeding aiming at resistance to bacterial spot, which may contribute to future research related to this topic.

Keywords: GWAS, Plant breeding, Plant-pathogen interaction, Image analysis

## 1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é um dos cultivos agrícolas mais importantes do ponto de vista econômico e social. Em 2019, a produção mundial atingiu o patamar de 180,8 milhões de toneladas, sendo o Brasil o 10º maior produtor (FAOSTAT, 2021). No país, a maior parte desta produção destina-se ao consumo dos frutos *in natura*, usados em saladas e outras preparações culinárias, enquanto que cerca de 37% da produção tem se destinado ao processamento industrial, na forma de molhos e condimentos (BOTEON; DELEO; MOREIRA, 2020). O custo de produção desta cultura é elevado, podendo passar de R\$ 100.000,00/ha para implantação e condução dos cultivos de tomate de mesa e de R\$ 20.000,00/ha para o cultivo de tomate destinado ao processamento industrial (HORTIFRUTI/CEPEA, 2019). Contudo, o alto investimento em recursos e tecnologia se traduz na geração de empregos (BOTEON; DELEO; MOREIRA, 2020) e coloca o tomateiro entre as hortaliças que mais oferece renda ao produtor (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI & FRUTI, 2020).

A produtividade média brasileira de 2016 a 2019 foi de 69,4 t/ha, ainda muito inferior a países como Estados Unidos e Espanha, que neste mesmo período foi de aproximadamente 93,7 t/ha e 85,3 t/ha, respectivamente (FAOSTAT, 2021). No Brasil, mais de 99% do tomate é produzido em campo aberto (PORTAL REVISTA SAFRA, 2020), com plantas de hábito de crescimento indeterminado, tutoradas com bambu ou fitilho. As plantas ficam sujeitas às mais diversas variações ambientais, tais como excesso de chuva, temperaturas muito altas ou muito baixas, ventos fortes, entre outras. Estas variações favorecem a ocorrência de uma série de doenças e pragas com alta capacidade destrutiva, fazendo do tomateiro uma das culturas mais exigentes em cuidados fitossanitários. Este cenário acarreta em custos operacionais, econômicos e ambientais, dada a grande quantidade de aplicações de insumos protetores (QUEZADO-DUVAL; LOURENÇO JUNIOR, 2018). Assim, o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas às condições de cultivo de diferentes regiões brasileiras e resistentes às principais doenças é considerado a opção mais viável para se obter maior rendimento e segurança ao produtor (BOITEUX; FONSECA; GONZÁLEZ-ARCOS, 2016; NICK; SILVA, 2016).

A mancha bacteriana do tomateiro, causada por bactérias do gênero *Xanthomonas* spp., é uma das doenças mais desafiadoras em diversas regiões produtoras ao redor do mundo, havendo casos de perdas de até 66% no rendimento da cultura (ADHIKARI et al., 2020; QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010; QUEZADO-SOARES et al., 1998). Esta enfermidade tem impactado significativamente a produção brasileira e ganhado relevância nos últimos anos, sobretudo devido ao aumento da incidência e da ocorrência generalizada nas diversas regiões produtoras. Os

sintomas podem ocorrer em toda a parte aérea das plantas, diminuindo a área fotossintética e a qualidade dos frutos, o que contraria o padrão atrativo ao consumidor e acaba por reduzir o volume comercializável.

Não existem produtos químicos ou controle biológico eficientes no controle da doença, de forma que muitos programas de melhoramento ao redor do mundo têm buscado obter cultivares com maiores níveis de resistência à mancha bacteriana. Em âmbito nacional, existe pouca informação a respeito do nível de resistência de genótipos comerciais atualmente utilizados, porém sabe-se que este é insatisfatório (PIOTTO et al., 2015; QUEZADO-DUVAL; INOUE-NAGATA, 2009). Embora alguns acessos de tomateiro resistentes à doença oriundos de outros países sejam conhecidos (ADHIKARI et al., 2020; PEI et al., 2012; SCOTT et al., 1995), podendo ser usados como fontes de genes em programas de melhoramento, não se sabe sobre sua eficiência em aumentar a resistência a diferentes isolados de *Xanthomonas* spp. encontrados nas regiões tropicais brasileiras. A natureza complexa e poligênica desta característica, caracterizada por locos de efeitos aditivos a dominantes (BERNAL; LIABEUF; FRANCIS, 2020), requer que o melhoramento envolva a combinação de diferentes fontes de resistência, visando à sua durabilidade em nível de campo (ARAÚJO et al., 2017).

A grande variabilidade na reação de genótipos e na capacidade de isolados de *Xanthomonas* spp. de infectar o hospedeiro e causar doença – doravante designada como **patogenicidade** (THOMAS; ELKINTON, 2004) –, levando a diferentes níveis de **severidade da doença** – área foliar visualmente afetada (CAMPBELL; NEHER, 1994) –, é um dos desafios no melhoramento contra esta devastadora bactéria (ADHIKARI et al., 2020; PONTES; MOITA; QUEZADO-DUVAL, 2012; POTNIS et al., 2015). Araújo et al. (2017) observaram a preponderância de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (anteriormente referida como *X. perforans*) no Brasil, com base em um levantamento em 33 regiões produtoras-chave distribuídas em seis estados, além do Distrito Federal. Estes autores verificaram que a raça T3 foi predominante e que uma resistência mais ampla será imprescindível caso populações da raça T4 (ambas da espécie *X. euvesicatoria* pv. *perforans*), recém-detectadas no país, tornem-se adaptadas ou aumentem em frequência por meio de sementes importadas. Mesmo dentro de uma mesma espécie, grandes variações em patogenicidade são esperadas, bem como a existência de interação entre isolados do patógeno, genótipos do hospedeiro e ambientes de cultivo.

A busca pela resistência estável a doenças com padrão de severidade quantitativa, como a mancha bacteriana, tem levado pesquisadores a buscarem ferramentas fenômicas e genômicas mais eficientes (ADHIKARI et al., 2020; BERNAL; LIABEUF; FRANCIS, 2020; LIABEUF; SIM; FRANCIS, 2018; SUN et al., 2014). Estimativas confiáveis, acuradas e precisas da severidade de

doenças auxiliam no monitoramento e previsão de doenças, a conhecer detalhes epidemiológicos, a explorar o germoplasma, e têm sido ferramentas disruptivas em programas de melhoramento, de forma a prever perdas em produtividade e auxiliar no processo de seleção de genótipos superiores (BOCK et al., 2010a). Nesse sentido, uma tecnologia inovadora é a análise de imagens utilizando segmentação baseada em algoritmos de *machine learning*, os quais podem prever padrões em imagens a partir de orientações fornecidas pelo usuário (ARGANDA-CARRERAS et al., 2017). De fato, é esperado que medidas de severidade de doenças baseadas em análise de imagens – que em geral resultam em um padrão quantitativo – tendam a ser mais informativas que aquelas provenientes de estimativas visuais, especialmente quando destinadas a estudos de mapeamento (POLAND; NELSON, 2011; SUN et al., 2014). A acessibilidade de métodos de fenotipagem, como aqueles que utilizam câmeras digitais simples e softwares gratuitos e de código aberto, é uma vertente neste campo de estudo (LOBET; DRAYE; PÉRILLEUX, 2013; ROUSSEAU; DEE; PRIDMORE, 2015; TSAFTARIS; NOUSOS, 2009).

Aliada a uma boa fenotipagem, técnicas genômicas são capazes de desvendar a arquitetura genética de caracteres de interesse, como a resistência à mancha bacteriana, gerando dados de grande utilidade ao melhoramento. A associação genômica, mapeamento associativo ou GWAS (*Genome-wide Association Study*) é uma técnica biotecnológica que busca associações entre fenótipo e marcadores genéticos, permitindo a identificação de variantes funcionais (por exemplo, locos ou alelos) ligados às diferenças fenotípicas de uma característica. A condição para a detecção destas associações é a associação não-aleatória entre alelos de diferentes locos, ou seja, presença de desequilíbrio de ligação entre o marcador e a região que controla para a característica de interesse. A associação genômica pode ser aplicada a vários tipos de populações, como por exemplo, linhagens de bancos de germoplasma, o que constitui uma das vantagens desta técnica em relação a outras, como mapeamento de QTLs (KORTE; FARLOW, 2013). Por meio da abordagem de associação genômica, SIM et al. (2015) compararam métodos estatísticos e desvendaram regiões do genoma relacionadas à resistência à mancha bacteriana. No Brasil, no entanto, não existem pesquisas envolvendo genotipagem em larga escala com o objetivo de detectar associações com caracteres de interesse no melhoramento do tomateiro, cenário que tende a mudar com os avanços tecnológicos na área e diminuição dos custos envolvidos.

Diante dos problemas crescentes causados pela mancha bacteriana em regiões produtoras brasileiras, esta pesquisa teve como objetivo geral desvendar a base genética da resistência à esta doença, por meio de uma fenotipagem e genotipagem em larga escala em acessos de tomateiro, utilizando análise de imagens e um estudo de associação genômica, visando à identificação de locos de interesse.

Para tanto, este trabalho foi segmentado em três partes complementares, de modo a atingir os seguintes objetivos específicos: 1) Determinar a espécie de *Xanthomonas* spp. predominante nas regiões produtoras do Estado de São Paulo e selecionar um isolado típico para os estudos de fenotipagem utilizando análise de imagens; 2) Definir uma metodologia de análise de imagens para quantificar o percentual de área afetada com a doença em folhas de tomateiro inoculadas com o patógeno; 3) Detectar associações relacionadas a resistência à mancha bacteriana por meio de um modelo de associação genômica para múltiplos locos.

Com base nestes objetivos complementares, buscou-se definir estratégias mais eficientes para realizar a avaliação do nível de resistência à mancha bacteriana em tomateiro, além de conhecer melhor a reação dos genótipos ao patógeno, o que deve proporcionar melhores condições para se definir as estratégias para um programa de melhoramento genético, visando o desenvolvimento de cultivares resistentes à esta doença.

### Referências

- ADHIKARI, P. 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. 1–14, 2020.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI & FRUTI 2020. Tomate: o molho rendeu. p. 96, 2020.
- ARAÚJO, E. R. et al. Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, n. 1, p. 159–168, 2017.
- ARGANDA-CARRERAS, I. et al. Trainable Weka Segmentation: A machine learning tool for microscopy pixel classification. **Bioinformatics**, v. 33, n. 15, p. 2424–2426, 2017.
- BERNAL, E.; LIABEUF, D.; FRANCIS, D. M. Evaluating quantitative trait locus resistance in tomato to multiple *Xanthomonas* spp. **Plant Disease**, v. 104, n. 2, p. 423–429, 2020.
- 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.
- BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. DE N.; GONZÁLEZ-ARCOS, M. Melhoramento de tomate para processamento industrial. In: NICK, C.; BORÉM, A. (Eds.). **Melhoramento de Hortaliças**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2016. p. 432–464.
- BOTEON, M.; DELEO, J. P. B.; MOREIRA, M. M. Tomaticultura em números. **Hortifruti Brasil - Edição Especial**, v. 13, n. 1, p. 13–20, jun. 2020.

- CAMPBELL, C. L.; NEHER, D. A. Estimating Disease Severity and Incidence. In: CAMPBELL, C. L.; BENSON, D. M. (Eds.). **Epidemiology and Management of Root Diseases**. Springer, 1994. p. 117–147.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - STATISTICS DIVISION – FAOSTAT. **Crops**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 16 fev. 2021.
- HORTIFRUTI/CEPEA. Especial Hortaliças: Custos voltam a subir, mas rentabilidade é boa em 2019. **Hortifruti Brasil - Edição Especial**, p. 8–19, jun. 2019.
- KORTE, A.; FARLOW, A. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. **Plant methods**, v. 9, n. 1, p. 29, 2013.
- LIABEUF, D.; SIM, S. C.; FRANCIS, D. M. Comparison of marker-based genomic estimated breeding values and phenotypic evaluation for selection of bacterial spot resistance in tomato. **Phytopathology**, v. 108, n. 3, p. 392–401, 2018.
- LOBET, G.; DRAYE, X.; PÉRILLEUX, C. An online database for plant image analysis software tools. **Plant Methods**, v. 9, n. 1, 2013.
- NICK, C.; SILVA, D. J. H. DA. Melhoramento de tomate. In: NICK, C.; BORÉM, A. (Eds.). **Melhoramento de Hortaliças**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2016. p. 396–431.
- PEI, C. et al. Fine mapping and analysis of a candidate gene in tomato accession PI128216 conferring hypersensitive resistance to bacterial spot race T3. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 124, n. 3, p. 533–542, 2012.
- 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**
- POLAND, J. A.; NELSON, R. J. In the eye of the beholder: The effect of rater variability and different rating scales on QTL mapping. **Phytopathology**, v. 101, n. 2, p. 290–298, 2011.
- PONTES, N. DE C.; MOITA, A. W.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Estabilidade da resistência de “Ohio 8245” e “Heinz 9553” à mancha bacteriana do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 99–105, 2012.
- PORTAL REVISTA SAFRA. **Cultivo de tomates em campo aberto**. Disponível em: <<http://revistasafra.com.br/tomates-em-campo-aberto/>>. Acesso em: 16 fev. 2021.
- POTNIS, N. et al. Bacterial spot of tomato and pepper: Diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 9, p. 907–920, 2015.
- QUEZADO-DUVAL, A. M.; INOUE-NAGATA, A. K. Mancha bacteriana e geminivirose avançam sobre tomate industrial. **Revista Campo & Negócios HF**, v. 54, p. 44–47, 2009.

- QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A. Mancha bacteriana: uma atualização para o Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria. **Circular Técnica Embrapa**, v. 84, p. 23, 2010.
- QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOURENÇO JUNIOR, V. Manejo de doenças foliares do tomateiro. **Hortaliças em Revista**, p. 12–13, 2018.
- QUEZADO-SOARES, A. M. et al. Redução na produtividade de tomateiro para processamento industrial devido à mancha-bacteriana. **Horticultura Brasileira**, v. 16, n. 1, 1998.
- ROUSSEAU, D.; DEE, H.; PRIDMORE, T. Imaging methods for phenotyping of plant traits. In: KUMAR, J.; PRATAP, A.; KUMAR, S. (Eds.). **Phenomics in Crop Plants: Trends, Options and Limitations**. New Delhi: Springer, 2015. p. 61–74.
- 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.
- SIM, S. C. et al. Association analysis for bacterial spot resistance in a directionally selected complex breeding population of tomato. **Phytopathology**, v. 105, n. 11, p. 1437–1445, 2015.
- SUN, H. 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.
- THOMAS, S. R.; ELKINTON, J. S. Pathogenicity and virulence. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, n. 3, p. 146–151, 2004.
- TSAFTARIS, S. A.; NOUTSOS, C. Plant Phenotyping with Low Cost Digital Cameras and Image Analytics. In: ATHANASIADIS I.N., RIZZOLI A.E., MITKAS P.A., G. J. M. (Ed.). **Information Technologies in Environmental Engineering**. Berlin: Springer, 2009. p. 238–251.

## 2. INTERAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS DE TOMATEIRO E ISOLADOS DE *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* POR MEIO DA ABORDAGEM GGE BILOT

### RESUMO

A mancha bacteriana, causada por um complexo de pelo menos três espécies de *Xanthomonas* spp., é uma das doenças de maior importância para a cultura do tomateiro, sendo a resistência genética a forma mais eficiente de realizar o seu controle. A ocorrência generalizada da doença em diversos ambientes provavelmente favoreceu o surgimento de isolados com diferentes níveis de patogenicidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar um isolado capaz de induzir de forma estável os sintomas de mancha bacteriana em genótipos de tomateiro, por meio de um estudo da interação entre genótipos do hospedeiro, isolados patogênicos e épocas de avaliação. Também, buscou-se avaliar a estabilidade da reação de genótipos de tomateiro quanto à ocorrência da doença. Para tanto, três experimentos foram conduzidos utilizando sete genótipos, sendo três previamente caracterizados como resistentes (O8245, C1137, C1218), dois intermediários (Rotam e Yoshi) e dois suscetíveis (OSD e IPA6). As plântulas foram inoculadas com seis isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (13A, 18A, 16B, 9C e Xp15) provenientes de importantes regiões produtoras de tomate, por meio da aspersão de uma suspensão bacteriana. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com quatro repetições no primeiro e segundo experimentos e três repetições no terceiro experimento, bem como parcelas de quatro plantas. A severidade de sintomas da mancha bacteriana foi avaliada ao redor do 15º dia após a inoculação, por meio da escala de notas de Horsfall e Barratt (1945). Procedeu-se à uma análise de variância conjunta e análises da estabilidade dos genótipos e patogenicidade de isolados por meio da abordagem estatística GGE Biplot. A análise mostrou que, independentemente dos isolados testados, os genótipos C1218 e C1137 foram os que apresentaram os níveis médios de resistência mais elevados e estáveis, podendo tratar-se de resistência horizontal, ao passo que IPA6 foi o mais afetado pela doença. Já os genótipos OSD, Rotam, O8245 e Yoshi mostraram resistências intermediárias, apresentando interações específicas na reação aos diferentes isolados. Quanto aos isolados, foram observadas diferenças na indução dos sintomas de mancha bacteriana, sendo 13A o mais agressivo e selecionado para ser utilizado em experimentos de fenotipagem em larga escala realizados posteriormente. Por fim, neste trabalho ficou evidente que existem genótipos que apresentam níveis de resistência mais estáveis a isolados de *Xanthomonas* spp. com níveis variados de patogenicidade, ao passo que outros mostraram resistência mais específica a certos isolados. Tais informações são de grande relevância para programas de melhoramento do tomateiro visando resistência à mancha bacteriana.

**Palavras-chave:** *Solanum lycopersicum* L.; mancha bacteriana, avaliação precoce; estabilidade, melhoramento de plantas.

## ABSTRACT

Bacterial spot, caused by a complex of three species of *Xanthomonas* spp., is one of the major diseases in tomato and genetic resistance is the most efficient way to control it. The generalized occurrence of the disease in different environments probably favored the emergence of isolates with different levels of pathogenicity. Thus, the objective of this work was to identify an isolate capable of inducing bacterial spot symptoms in tomato genotypes in a stable manner, through a study of the interaction among host genotypes, pathogenic isolates and evaluation periods. Also, we sought to evaluate the reaction stability of tomato genotypes regarding the occurrence of the disease. Therefore, three experiments were conducted using seven genotypes, three previously characterized as resistant (O8245, C1137, C1218), two intermediates (Rotam and Yoshi) and two susceptible (OSD and IPA6). The seedlings were inoculated with six isolates of *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (13A, 18A, 16B, 9C and Xp15) from important tomato producing regions, by spraying a bacterial suspension. The experimental design was in randomized blocks, with four replications in the first and second experiments and three replications in the third experiment. The plots consisted in vases with four plants. The severity of symptoms of the bacterial spot was assessed around the 15<sup>th</sup> day after inoculation, using the Horsfall and Barratt scale (1945). A joint analysis of variance and analyses of genotype stability and isolates pathogenicity stability were carried out using the GGE Biplot statistical approach. The analysis showed that, regardless of the isolates tested, genotypes C1218 and C1137 were the ones with the highest and most stable mean levels of resistance, which may indicate horizontal resistance, whereas IPA6 was the most affected by the disease. Genotypes OSD, Rotam, O8245 and Yoshi showed intermediate resistance, with specific interactions in the reaction to the different isolates. As for the isolates, differences were observed in the induction of bacterial spot symptoms and 13A was the most aggressive and selected to be used in large-scale phenotyping experiments carried out afterward. Finally, this work showed evidence that some genotypes have more stable resistance levels to *Xanthomonas* spp. with varying levels of pathogenicity, while others showed more specific resistance to certain isolates. These findings are very relevant for tomato breeding programs aiming to develop resistance to bacterial spot.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum* L.; bacterial spot, early screening; stability; plant breeding.

### 2.1. Introdução

Um dos grandes desafios do melhoramento do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é a obtenção de resistência, ou reação economicamente favorável, a doenças bacterianas. Um dos motivos é o fato da herança genética dessas resistências ser em grande parte controlada por muitos genes (ADHIKARI et al., 2020), os quais acabam não entrando no “pacote tecnológico mínimo” de caracteres agronômicos dos híbridos comerciais atuais. Além disso, pouco se conhece sobre a estabilidade da reação de genótipos de tomateiro, frente a grande gama de espécies, raças e isolados bacterianos que evoluem constantemente (ARAÚJO et al., 2017).

Dentre as doenças que afetam a cultura do tomateiro, a mancha bacteriana tem levado a grandes perdas de produção e qualidade no cultivo desta importante hortaliça em todo o Brasil. A referida bacteriose é causada por um complexo de três espécies do gênero *Xanthomonas*, que se subdividem em quatro patovares e quatro raças conhecidas (segundo a classificação mais recente: *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*: raça T1, *X. vesicatoria* e *X. cynarae* pv. *gardneri*: raça T2 e *X. euvesicatoria* pv. *perforans*: raças T3 e T4) e uma enormidade de isolados com vários níveis de patogenicidade (JONES et al., 2000, 2004; LI; ZHANG; YANG, 2019; LIU et al., 2021; OSDAGHI et al., 2018; POTNIS et al., 2015; TIMILSINA et al., 2019a). A resistência do tomateiro a esta bactéria pode ser do tipo qualitativa ou quantitativa, dependendo do número de genes envolvidos.

Estudos deste patossistema retratam que algumas das interações planta-patógeno seguem o modelo gene-a-gene proposto por Flor (1971), no qual genes de avirulência (*avr*) do patógeno interagem com genes da espécie hospedeira, resultando em uma reação de resistência (ASTUA-MONGE et al., 2000a). Genes que promovem esta resistência qualitativa à *Xanthomonas* spp., chamada de vertical por estar associada a uma ou poucas raças, já foram estudados em diversos acessos de tomateiro (ASTUA-MONGE et al., 2000a; BALLVORA et al., 2001; BERNAL; LIABEUF; FRANCIS, 2020; JONES et al., 1995; LIABEUF; SIM; FRANCIS, 2018; MINSAVAGE; JONES; STALL., 1996; PEI et al., 2012; ROBBINS et al., 2009; SCOTT et al., 1995, 1996, 2003; SCOTT; JONES, 1986; SHARLACH et al., 2013; SIM et al., 2015; STALL; JONES; MINSAVAGE, 2009; WANG; STALL; VALLEJOS, 1994; WHALEN et al., 1993; YANG et al., 2005; YU et al., 1995).

A resistência vertical, de forma geral, é baseada em uma reação de hipersensibilidade (HR), podendo ser facilmente vencida pelo patógeno, o que por vezes inviabiliza sua utilização em cultivares comerciais (STALL; JONES; MINSAVAGE, 2009). Outro ponto a se considerar é que esta forma de resistência, frequentemente avaliada e identificada em condições experimentais, pode apresentar baixa correlação com a resistência em nível de campo (ROBBINS et al., 2009). A resistência horizontal ou quantitativa, geralmente associada a diversas raças e representada no genoma por QTLs, também já foi reportada para o patossistema *Xanthomonas* spp.-tomateiro (BERNAL; LIABEUF; FRANCIS, 2020; HUTTON et al., 2010; HUTTON; SCOTT; JONES, 2010; SCOTT et al., 1995, 1997, 2003, 2006; SOUZA et al., 2008; WANG et al., 2011, 1990; WHALEN et al., 1993), sendo mais eficiente contra diferentes variantes bacterianas.

Apesar do conhecimento existente sobre a genética envolvendo a resistência qualitativa e quantitativa do tomateiro à *Xanthomonas* spp., pouco se sabe sobre a reação de diferentes genótipos de tomateiro frente a diferentes isolados deste patógeno. De maneira geral, acredita-se que a pressão de seleção e as condições variáveis de ambiente nas principais regiões de cultivo do país

tenham proporcionado o surgimento de diferentes variantes de *Xanthomonas* spp. para cada de uma de suas espécies de importância (ARAÚJO et al., 2017; PONTES; MOITA; QUEZADO-DUVAL, 2012).

Partindo deste princípio, os níveis de resistência de genótipos de tomateiro podem variar de região para região, em função da diversidade do patógeno, o que torna o trabalho de seleção e desenvolvimento de novas cultivares uma tarefa bastante complexa, devido à falta de previsibilidade quando à reação a cada isolado.

Neste sentido, Pontes, Moita, Quezado-Duval (2012) demonstraram que uma mesma cultivar de tomateiro pode apresentar uma grande amplitude no nível de resistência à mancha bacteriana, de acordo com a diversidade de espécies e isolados de *Xanthomonas* spp. presentes nas diferentes regiões produtoras brasileiras. Contudo, certos padrões de patogenicidade de variantes bacterianas e estabilidade da reação de genótipos também foram estudados por estes e outros autores, reforçando a importância da resistência de amplo espectro para este patógeno (SCOTT et al., 1997; STALL; JONES; MINSAVAGE, 2009).

Por outro lado, a avaliação e seleção de genótipos de tomateiro resistentes à mancha bacteriana torna-se inviável se for necessário submeter as populações de melhoramento à grande diversidade que existe entre isolados de *Xanthomonas* spp. Diante da impossibilidade de realizar este procedimento de seleção para resistência a diferentes espécies e isolados geneticamente distintos de uma mesma espécie, é necessário conhecer qual delas é mais importante nas regiões de cultivo. Uma vez identificada a espécie-alvo do melhoramento visando à seleção de genótipos resistentes, é necessário também identificar um isolado típico que possa servir como referência padrão para programas de melhoramento genético.

Assim, este trabalho teve como objetivo identificar qual a espécie de ocorrência mais frequente nas principais regiões produtoras de tomate do Estado de São Paulo, bem como identificar um isolado capaz de induzir de forma estável os sintomas de mancha bacteriana em genótipos de tomateiro, sendo eficiente em discriminar aqueles com diferentes níveis de reação ao patógeno. Além disso, procurou-se explorar a interação entre genótipos de tomateiro, isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e épocas de avaliação, bem como identificar a estabilidade da reação à doença de genótipos com padrão de severidade já conhecido.

## 2.2. Material e Métodos

### 2.2.1. Identificação das espécies de *Xanthomonas* predominantes no Estado de São Paulo

A identificação ao nível de espécies de isolados de *Xanthomonas* foi realizada em período anterior (2014-2015), contando inicialmente com a parceria da Clínica Fitopatológica da ESALQ/USP. Esta pesquisa fez parte do Pós-Doutoramento do Prof. Dr. Fernando Angelo Piotto (Departamento de Produção Vegetal – LPV, ESALQ/USP), durante seu período como pós-doutorando CAPES/PNPD, no Departamento de Genética da ESALQ/USP (2014-2018).

Nesta primeira etapa do trabalho, foram obtidos 17 isolados de *Xanthomonas*, sendo as bactérias isoladas de folhas sintomáticas de tomateiro, vindas de lavouras situadas em diferentes cidades do Estado de São Paulo, bem como uma de Luminárias/MG. Os isolados receberam uma codificação numérica inicial, sendo previamente cultivados em meio Ágar-Nutriente (AN) e incubados a 28 °C por um período de 48h. Em seguida, foi feita a incubação em meio líquido Caldo-Nutriente (CN) por 24 horas a 28 °C, procedendo-se à extração de DNA no Laboratório de Genética de Microorganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo” (GenMicro - Departamento de Genética da ESALQ/USP), conforme protocolo de extração fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) após prévia lise mecânica das paredes celulares com auxílio de microesferas de vidro estéreis (*Sigma-Merk*). As demais etapas, descritas a seguir, foram realizadas no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, também no Departamento de Genética da ESALQ/USP.

Para a amplificação dos fragmentos via PCR, foram utilizados os iniciadores desenhados por Koenraad et al. (2009), específicos para identificar *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (anteriormente designada como *X. euvesicatoria*: BS-XeF: CATGAAGAACTCGGCGTATCG e BS-XeR: GTCGGACATAGTGGACACATAC), *X. vesicatoria* (BS-XvF: CCATGTGCCGT\*TGAAATACT\*TG e BS-XvR: ACAAGAGATGT\*TGCTATGAT\*TTGC), *X. cynarae* pv. *gardneri* (anteriormente designada como *X. gardneri*: BS-XgF: TCAGTGCTTAGT\*TCCTCAT\*TGTC e BS-XgR: TGACCGATAAAGACTGCGAAAG) e *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (anteriormente designada como *X. perforans*: BS-XpF: GTCGTGTTGATGGAGCGTTC e BS-XpR: GTGCGAGTCAATTATCAGAATGTGG) . A reação de PCR foi preparada em um multiplex com os quatro pares de primers, contendo 4,8 µL de Tampão 1X; 1,44 µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5-1,33 mmol L<sup>-1</sup>); 3,84 µL do mix de dNTPs (0,2-0,18 mmol L<sup>-1</sup> de cada dNTP); 19,2 µL de um mix contendo os quatro pares de iniciadores (2,0-1,77 µmol L<sup>-1</sup> para todos os iniciadores); 1 µL de Taq DNA polimerase (1,26-1,11 U); 13,72 µL de água Milli-Q® e alíquotas de 2 µL dos diferentes DNAs.

Os fragmentos amplificados resultantes da PCR foram analisados em gel de agarose (3,0%) em tampão TBE 0,5X, por eletroforese conduzida a 100 V durante 3 horas e digitalizados em fotodocumentador sob luz UV. O programa utilizado para realização da PCR simples e para a reação de PCR multiplex foi de 94 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos para desnaturação, 66 °C por 1 minuto para anelamento e 72 °C por 8 minutos para extensão.

Posteriormente, a confirmação das variantes dos isolados foi realizada por meio de sequenciamento no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco da Universidade de São Paulo (São Paulo/SP), em colaboração com o Lab. GenMicro, sob a coordenação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Carolina Quecine Verdi e auxílio do Dr. Daniel Prezotto Longatto.

### 2.2.2. Material vegetal e obtenção das mudas

Os sete genótipos de tomateiro avaliados são linhagens provenientes do Banco Ativo de Germoplasma do Laboratório de Melhoramento de Hortaliças (LMH), do Departamento de Genética da ESALQ/USP. Eles foram selecionados de forma a representar diferentes níveis de reação à doença, conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1.** Relação dos genótipos de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) utilizados nos experimentos e respectiva procedência e nível de reação à doença. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2017 e 2018.

Genótipo	Acesso USP	Procedência	Reação à doença
Ohio 8245 (O8245)	USP 157	Ohio, EUA	
CNPH1137 (C1137)	USP 100	CNPH, Brasília, DF	Resistente
CNPH1218 (C1218)	USP 101	CNPH, Brasília, DF	
Yoshimatsu-L3 (Yoshi)	USP 009	INPA, Manaus, AM	Intermediário
Rotam-4 (Rotam)	USP 158B	África do Sul	
Olirose de St. Domingue (OSD)	USP 028	Haiti	Suscetível
IPA-6 (IPA6)	USP 030	IPA, Recife, PE	

\*PIOTTO et al., 2015; PIOTTO et al., dados não publicados

A semeadura foi feita em bandejas de isopor com 128 células, contendo substrato à base de fibra de casca de coco (Amafibra®), depositando-se uma semente por célula. A irrigação das mudas foi realizada por meio de sistema de aspersão de forma automática três vezes ao dia, com cinco minutos em cada rega. No primeiro experimento (época 1), a fertirrigação das mudas foi iniciada no 10º dia após a semeadura, utilizando o adubo Peter's Professional 20-20-20 (Everris® Peter's + Micronutrientes na proporção de 1 g.L<sup>-1</sup>), realizando suplementação (após o 26º dia após a semeadura), com uma solução composta de 0,50 g.L<sup>-1</sup> de Nitrato de Cálcio, 0,20 g.L<sup>-1</sup> de Nitrato de Potássio, 0,20 g.L<sup>-1</sup> de Sulfato de Magnésio e 0,05 g.L<sup>-1</sup> de Rexolin® Yara Vita (protocolo LMH

- Mudas de Tomateiro). Para os experimentos 2 e 3 (épocas 2 e 3), a nutrição das mudas foi realizada somente por meio do protocolo LMH. Para os três experimentos, esta prática foi repetida nas segundas, quartas e sextas-feiras, no final da tarde, utilizando um regador manual. Além disso, as demais práticas de manejo foram realizadas conforme recomendações para a cultura.

Nesta primeira parte do trabalho, foram realizados três experimentos em três épocas diferentes, como será descrito adiante. Assim, em função da germinação e desenvolvimento das mudas em cada época, estas foram mantidas nas condições mencionadas acima até os 35 (Experimento época 1), 28 (Experimento época 2) e 22 dias (Experimento época 3) após a semeadura, quando se procedeu à inoculação com os isolados bacterianos, de acordo com a metodologia descrita a seguir.

### 2.2.3. Isolados bacterianos e inoculação

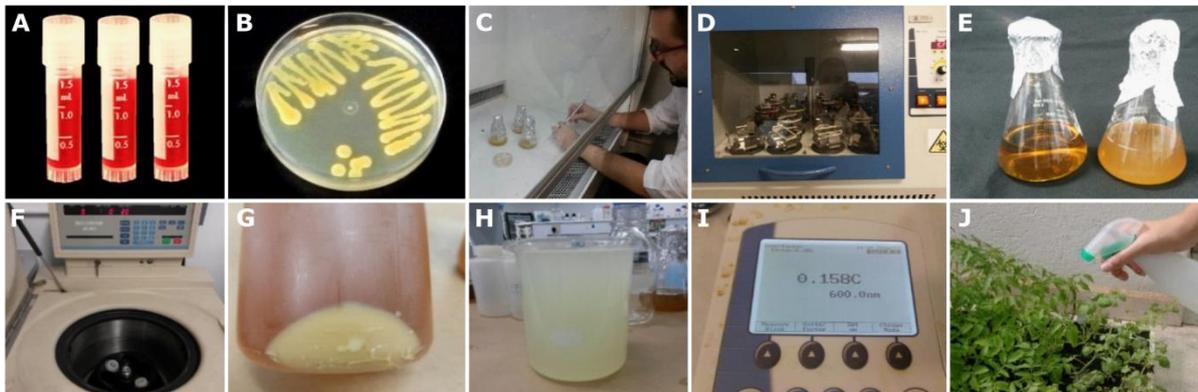
A espécie utilizada para este estudo de inoculação das plantas foi *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. Esta escolha foi baseada em estudos preliminares que identificaram a predominância desta espécie tanto no Estado de São Paulo quanto em nível nacional (ARAÚJO et al., 2017; PIOTTO et al., 2015; PIOTTO et al., dados não publicados), conforme será discutido mais adiante. Assim, foram utilizados cinco isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (13A, 18A, 16B, 9C e Xp15), os quais vem sendo mantidos no Lab. GenMicro. Os isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* são oriundos de importantes regiões produtoras de tomate, conforme descrito na Tabela 2.

**Tabela 2.** Relação de isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* utilizados nos experimentos 1, 2 e 3 e respectiva procedência.

Isolado	Procedência
13A	Holambra, SP
18A	São Francisco de Paula, RS
16B	Ribeirão Branco, SP
9C	Itatiba, SP
Xp15	Mogi Guaçu, SP

O método de preparo das suspensões bacterianas está resumido na Figura 1. Os microtubos criogênicos com os estoques bacterianos foram descongelados e plaqueados em meio NA (Nutriente Ágar, 24 g.L<sup>-1</sup>) e condicionados em BOD a 28 °C. Após três dias, colônias individuais foram transferidas para erlenmeyers contendo meio líquido (CA) enriquecido (*Nutrient Broth* 8 g.L<sup>-1</sup>, Extrato de levedura 1,5 g.L<sup>-1</sup> e NaCl 5 g.L<sup>-1</sup>). Em seguida, os frascos foram mantidos sob agitação por 16 horas a 28 °C, para que os isolados se desenvolvessem. Após este período, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 6000 rpm por 30 minutos, descartando-se o

sobrenadante e ressuspendendo o *pellet* em solução de 10 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. A concentração final foi ajustada para OD<sub>600nm</sub> = 0,15 (3 x 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>), utilizando um espectrofotômetro *Ultrospec 3000 Amersham Pharmacia Biotech*.



**Figura 1.** Preparo de inóculo de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e inoculação. A) Estoque de *Xanthomonas* spp. em tubos criogênicos do Lab. GenMicro; B) Placa de Petri contendo um dos isolados bacterianos em meio NA; C) Inoculação de colônias bacterianas em meio CA enriquecido; D) Agitação de bactérias em *shaker* para estímulo do crescimento; E) Ilustração do crescimento bacteriano em erlenmeyer (direita) em comparação ao meio CA enriquecido estéril (esquerda); F) Centrifuga utilizada para separar o *pellet* bacteriano do meio de cultura; G) *Pellet* bacteriano após centrifugação; H) Suspensão bacteriana em solução salina; I) Ajuste da concentração da suspensão bacteriana em espectrofotômetro; J) Inoculação das plantas com suspensão bacteriana usando um borrifador.

Paralelamente, as plântulas de tomateiro permaneceram durante 20 horas em uma câmara úmida antes de serem inoculadas (Figura 2). Este condicionamento, realizado com o auxílio de umidificadores, permitiu a manutenção de uma elevada umidade, criando um ambiente ideal para uma infecção efetiva e uniforme. A suspensão de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* foi aspergida sobre as plântulas, ainda em bandejas, com um volume aproximado de 1 mL por plântula, conforme descrito por Somodi et al. (1994).



**Figura 2.** Condicionamento de plântulas de tomateiro em câmara úmida antes da inoculação com os isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans*.

### 2.2.4. Instalação, condução e avaliação dos experimentos em casa de vegetação

No mesmo dia da inoculação, as mudas foram transplantadas para vasos de 5L contendo solo e mantidas em casa de vegetação. Esta foi dividida em seis partes, as quais continham os genótipos inoculados com cada um dos isolados, além de um controle sem inoculação. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com quatro repetições nos primeiros dois experimentos e três repetições no terceiro experimento. As parcelas consistiram de quatro plantas por vaso. As mudas foram irrigadas por meio de sistema de aspersão na frequência de seis vezes por dia e três minutos cada rega, a fim de condicionar um molhamento foliar que favorecesse o desenvolvimento da doença.

A avaliação da severidade dos sintomas da doença foi feita em cada planta em torno de 15 dias após a inoculação, obtendo-se a média da parcela. Foi utilizada a escala de Horsfall e Barratt (1945), a qual consiste na atribuição de notas de 1-12 conforme o percentual de área foliar afetada com a doença (Tabela 3).

**Tabela 3.** Escala de Horsfall e Barratt (1945).

Nota	Porcentagem de área 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

Os três experimentos foram realizados em três diferentes épocas, entre os anos de 2017 e 2018, em casa de vegetação do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba-SP. As condições ambientais do período de realização dos experimentos (dia da inoculação ao dia de avaliação da doença) estão detalhadas na Tabela 4, conforme registrado na base de dados da Estação Meteorológica Automática da Área de Física e Meteorologia da ESALQ/USP (Série de Dados Climatológicos do Campus "Luiz de Queiroz" de Piracicaba-SP, 2020). De forma geral, as condições de umidade e temperatura no

período de realização dos experimentos foram adequadas para a infecção e estabelecimento das bactérias.

**Tabela 4.** Valores médios estimados de temperatura média (T MÉD), temperatura máxima (T MÁX), temperatura mínima (T MÍN) e umidade relativa do ar (UR), referentes ao período de inoculação a avaliação da mancha bacteriana em cada experimento. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2017 e 2018.

Exp.	Mês/Ano	T MÉD (°C)	T MÁX (°C)	T MÍN (°C)	UR (%)
Exp. 1	Abr-Mai/2017	20,7	26,1	15,4	82,0
Exp. 2	Dez/2017	25,7	32,3	19,1	70,3
Exp. 3	Abr/2018	22,3	29,4	15,3	71,0

\*Série de Dados climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba-SP. Departamento de Engenharia de Biosistemas. ESALQ/USP, 2020. Exp. 1 = Época 1, Exp. 2 = Época 2 e Exp. 3 = Época 3.

### 2.2.5. Análises estatísticas

Os dados de severidade de cada experimento foram submetidos à análise de variância conjunta, conforme o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ijkn} = \mu + g_i + a_k + l_n + b_{j(kn)} + ga_{ik} + gl_{kn} + gal_{ikn} + \varepsilon_{ijkn}$$

Em que:

$y_{ijkn}$  é o valor da observação referente ao genótipo  $i$  no bloco  $j$ , na época  $k$  dentro do isolado  $n$ ;

$\mu$  é a média geral;

$g_i$  é o efeito fixo do genótipo  $i$ ;

$b_{j(kn)}$  é o efeito fixo do bloco  $j$  dentro da época  $k$  dentro do isolado  $n$ ;

$a_k$  é o efeito fixo da época  $k$ ;

$l_n$  é o efeito fixo do isolado  $n$ ;

$ga_{ik}$  é o efeito fixo da interação genótipos x épocas;

$gl_{kn}$  é o efeito fixo da interação genótipos x isolados;

$gal_{ikn}$  é o efeito fixo da interação genótipos x épocas x isolados;

$\varepsilon_{ijkn}$  é o efeito aleatório do erro experimental do genótipo  $i$  no bloco  $j$ , época  $k$  e isolado  $n$ , assumindo-se que os erros são independentes e normalmente distribuídos com média zero e variância  $\sigma^2$ .

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F sendo os resíduos transformados por meio da fórmula  $(1 - \alpha^{0,26})/0,26$  e verificados pelo teste de Shapiro-Wilk ( $P < 0,04$ ), usando o Software R v.3.6.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020). A qualidade experimental foi estimada utilizando-se o coeficiente de variação experimental (CVe) e as médias comparadas pelo teste LSD (*least significant difference*) a 5% de probabilidade de erro.

A análise de estabilidade dos genótipos em relação aos isolados foi verificada pelo método GGE Biplot (*Genotype and Genotype-Environment Interaction*) no software R, utilizando o pacote *GGEbiplotGUI* (FRUTOS; GALINDO; LEIVA, 2014), de acordo com o modelo abaixo:

$$G + GE = [(g_i + ge_{ij})] \sum_{s=1}^n \lambda_s \gamma_{is} \delta_{js} + \rho_{ij}$$

Em que:

G + GE: matriz dos efeitos dos genótipos somados aos efeitos das interações genótipos por isolados;

$\lambda_s$ : valor singular do s-ésimo efeito principal;

$\gamma_{is}$  e  $\delta_{js}$ : autovetores do s-ésimo componente principal associado ao efeito do genótipo i e isolado j, respectivamente;

n: número de componentes principais retidos do modelo;

$\rho_{ij}$ : ruído.

A partir dos escores foram obtidos gráficos, os quais também são plotados pelo mesmo pacote mencionado acima, com base tanto no modelo com ênfase nos genótipos de tomateiro, fornecendo informação quanto à sua reação e estabilidade (gráficos “Média vs. Estabilidade”), quanto no modelo com foco na patogenicidade e capacidade discriminatória dos isolados (gráficos Quem-Vence-Onde) de *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, conforme descrito por Yan, Falk (2002).

## 2.3. Resultados e Discussão

### 2.3.1. Identificação e seleção dos isolados para os experimentos

Dentre os 17 isolados oriundos de folhas com sintomas de mancha bacteriana de diferentes regiões produtoras, somente 13 foram confirmados como sendo de *Xanthomonas* spp. Destes 13 isolados, um foi identificado como sendo da espécie *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (Presidente Prudente-SP), um da espécie *X. vesicatoria* (Campinas-SP) e os outros 11 pertencentes

à espécie *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Itapeva-SP, Taquarivaí-SP, Riberão Branco-SP, Itatiba-SP, Mogi Guaçu-SP, Santo Antônio da Posse-SP e Luminárias-MG). Posteriormente, outros dois isolados foram recebidos para análise, os quais também foram caracterizados quanto à espécie *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Holambra-SP e São Francisco de Paula-RS). De acordo com este levantamento, ficou evidente que a espécie de ocorrência mais frequente no Estado de São Paulo (84,6% do total) é a *X. euvesicatoria* pv. *perforans*.

Estes dados foram posteriormente corroborados pelo trabalho de Araújo et al. (2017), no qual uma análise de 204 isolados de *Xanthomonas* spp., coletados em todo o Brasil, constatou que, deste total, 188 eram da espécie *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. Neste mesmo estudo, dentre os 24 isolados coletados no Estado de São Paulo, a identificação mostrou que 21 eram de *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, cuja proporção de ocorrência em relação às demais (87,5%) foi muito similar àquela encontrada na presente pesquisa (84,6%).

Com base nestas informações, a espécie *X. euvesicatoria* pv. *perforans* foi selecionada para uso neste trabalho, sob o contexto do melhoramento à mancha bacteriana. Contudo, não havia informações sobre a variabilidade e diferenças nos níveis de patogenicidade dos isolados, os quais pudessem ajudar a identificar um isolado típico de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* a ser utilizado nas demais etapas da pesquisa. Por este motivo, foram pré-selecionados cinco isolados, sendo quatro do Estado de São Paulo e um do Estado do Rio Grande do Sul, para um estudo da interação entre genótipos de tomateiro e isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, de modo a obter informações sobre a patogenicidade e estabilidade de induzir doenças em genótipos com diferentes níveis de reação ao patógeno. Os genótipos selecionados para esta etapa haviam sido classificados previamente quanto à reação à *X. euvesicatoria* pv. *perforans* isolado Xp15 (PIOTTO et al., 2015; PIOTTO et al., dados não publicados), quando foram avaliados um total de 90 acessos de tomateiro.

### **2.3.2. Reação dos genótipos em função de diferentes isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans***

Considerando que os isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* foram coletados em distintas regiões e áreas de cultivo de tomateiro, esperou-se que eles fossem geneticamente diferentes, expressando, portanto, níveis de patogenicidade variados. Para tanto, cinco isolados foram inoculados em setes acessos de tomateiro, para os quais já havia informações prévias sobre a reação a um dos isolados (Xp15). Neste estudo, a ideia foi identificar discrepâncias entre os isolados na capacidade de induzir sintomas em diferentes genótipos, cultivados em diferentes condições

ambientais, de modo a detectar possíveis interações entre estes fatores. Este tipo de informação é de extrema importância para definir um isolado que seja mais estável na indução de sintomas entre os diferentes genótipos, mantendo sua característica de patogenicidade em diferentes condições ambientais e, conseqüentemente, mais próximo de representar as variações presentes nas condições de cultivo do tomateiro.

Com base nesta ideia, os quadrados médios da análise de variância para cada um dos fatores destacados acima podem ser visualizados na Tabela 5, bem como para os diferentes níveis de interação entre eles, os quais serão desdobrados mais adiante.

**Tabela 5.** Resumo da análise de variância conjunta para as notas de severidade da mancha bacteriana nas épocas de avaliação 1, 2 e 3 (tratamentos inoculados). Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2017 e 2018.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios
Bloco/Isolado/Época	40	1,860**
Genótipo	6	27,609**
Isolado	4	33,720**
Época	2	57,745**
Isolado x Época	8	5,860**
Genótipo x Isolado	24	1,081*
Genótipo x Época	12	3,570**
Genótipo x Isolado x Época	48	1,273**
Erro	240	0,549
CVe (%)		25,92%
Média		2,860

\* e \*\*: significativo a 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

Todos os efeitos principais e respectivas interações foram significativos ( $P < 0,05$ ). Este resultado revela que houve uma reação variável de pelo menos um dos genótipos em relação aos demais, bem como uma significativa variação na patogenicidade de pelo menos um isolado em relação aos demais. O CVe foi relativamente alto, o que pode estar relacionado ao método visual de avaliação da doença e efetuado por apenas um avaliador (BOCK et al., 2010a).

O efeito significativo de época já era esperado, uma vez que é reflexo das condições climáticas de cada período, sobretudo em função das variações na umidade relativa e temperatura média do ar, que são os fatores ambientais mais influentes no estabelecimento e infecção das plantas por *X. euvesicatoria* pv. *perforans*.

Embora os experimentos tenham sido realizados em casa de vegetação com irrigação controlada, diversas variáveis podem afetar a infecção por um patógeno foliar e respectiva reação das plantas em experimentos realizados em casa de vegetação (FOOLAD et al., 2000). Entre elas, podem-se citar diferenças no número de plantas dentro das parcelas (efeito do estande), qualidade

e quantidade de inóculo, técnica de inoculação, entre outras (RAMALHO; FERREIRA; OLIVEIRA, 2012).

Especialmente no caso dos genótipos de tomateiro, uma possível fonte de variação foi a idade da plântula ao receber os inóculos que, conforme mencionado, variou com base na germinação e desenvolvimento das mudas. Nita, Ellis e Madden (2003), por exemplo, verificaram que o tamanho do folíolo e número de lesões tiveram efeito significativo na estimativa da severidade de uma doença foliar, usando, inclusive, a escala de Horsfall e Barratt (1945).

Em relação ao efeito significativo entre isolados, elevadas variações quanto à patogenicidade dentro de uma mesma espécie fitopatogênica já foram relatados por diversos autores (JAUNET; WANG, 1999; PONTES; MOITA; QUEZADO-DUVAL, 2012; YAHIAOUI-ZAIDI; LADJOUZI; BENALLAOUA, 2010), reforçando a necessidade de estudos que identifiquem isolados mais estáveis e representativos das regiões-alvo do melhoramento do tomateiro. Já o efeito significativo de genótipo era esperado, dadas as diferenças previamente conhecidas dos padrões de severidade entre os mesmos.

Todos os efeitos de interações foram significativos, indicando a reação específica de genótipos aos isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* sob condições ambientais diferentes. Essas interações podem também ser analisadas nas tabelas abaixo, que apresentam as médias de severidade de cada genótipo em função da reação a cada isolado, em cada uma das épocas avaliadas (Tabela 6) e na média das três épocas (Tabela 7). Tais interações entre todos os efeitos também serão melhor exploradas na seção “Análise de estabilidade – GGE Biplots”, apresentada adiante neste capítulo.

Entre os tratamentos que receberam inoculação por algum isolado, as médias de severidade variaram de 1,00 a 5,94 na época 1, 1,33 a 3,21 na época 2 e 1,33 a 6,05 na época 3. Cerca de 66% das parcelas que receberam nota média 1,00 foram inoculadas com o isolado Xp15, o qual apresentou baixa patogenicidade. As médias de severidade observadas nos experimentos 1 e 3 foram semelhantes: 3,14 e 3,43, respectivamente, o que pode ter sido devido, entre outros fatores, ao fato de terem sido realizados na mesma época (outono) de anos diferentes.

Das Tabelas 6 e 7, destacam-se a classificação consistente de maior resistência dos genótipos C1218 e C1137 e de suscetibilidade do genótipo IPA6 na média de infecção pelos isolados, ao longo dos três experimentos. Estes resultados refletem o observado por Piotto et al. (dados não publicados) ao usar apenas o isolado Xp15, mas tal classificação não foi a mesma para todos os isolados. Portanto, um estudo detalhado do comportamento destes genótipos em relação a diferentes isolados é necessário para se ter um panorama de suas especificidades e, assim, poderem ser usados como padrões em ensaios para avaliação da reação à doença.

Em todas as épocas avaliadas, Yoshi classificou-se como o terceiro genótipo mais resistente, não tendo diferido estatisticamente de C1218 e C1137. Yoshi é uma cultivar selecionada para resistência à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) e cultivo em condições de elevada umidade e temperatura (MARTINS et al., 2013). Curiosamente, este genótipo revelou um padrão de resistência entre intermediário e alto também à *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. O mesmo não deve ter ocorrido com a cultivar Rotam, que embora seja reconhecida por sua maior resistência à murcha e pinta (*Pseudomonas syringae*) bacterianas (BOSCH et al., 1990), reagiu de forma intermediária a suscetível ao longo das três épocas avaliadas. No entanto, tal genótipo foi selecionado sob condições ambientais e de pressão de patógenos diferentes daquelas encontradas no Brasil, como é o caso do ambiente de seleção da cultivar Yoshi. Por esta razão, não há evidências de que haja alguma correlação entre resistência à murcha e mancha bacterianas, com base nos dados destes experimentos.

**Tabela 6.** Médias dos valores de severidade da mancha bacteriana (notas da escala de Horsfall & Barratt, 1945) dos genótipos de tomateiro inoculados com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2017 e 2018.

Experimento 1						
Genótipos	Isolados					Média
	13A	16B	18A	9C	Xp15	
C1218	2,38	2,00	2,19	2,63	1,00	2,04
C1137	2,38	2,63	2,13	2,50	1,00	2,13
Yoshi	2,56	2,75	2,38	2,69	1,25	2,33
O8245	4,88	3,25	2,75	3,31	1,44	3,13
OSD	4,31	4,19	3,19	3,75	2,75	3,64
Rotam	4,50	3,88	3,81	4,44	1,69	3,66
IPA6	5,94	4,63	5,00	5,44	4,19	5,04
Média	3,85	3,33	3,06	3,54	1,90	3,14
Amplitude	3,56	2,63	2,88	2,94	3,19	3,00

LSD<sub>Genótipos</sub> = 0,31; LSD<sub>Isolados</sub> = 0,27

Experimento 2						
Genótipos	Isolados					Média
	13A	16B	18A	9C	Xp15	
C1218	2,25	1,63	1,81	1,73	1,58	1,80
C1137	1,79	1,38	2,17	2,00	1,40	1,75
Yoshi	1,79	1,92	2,02	2,17	1,52	1,88
O8245	2,63	2,40	3,14	1,48	2,27	2,38
OSD	2,56	3,11	2,50	1,67	1,50	2,27
Rotam	3,13	2,88	2,63	1,33	1,88	2,37
IPA6	2,71	2,46	3,21	2,79	1,94	2,62
Média	2,41	2,25	2,50	1,88	1,73	2,15
Amplitude	1,34	1,73	1,40	1,46	0,88	0,88

LSD<sub>Genótipos</sub> = 0,38; LSD<sub>Isolados</sub> = 0,32

Experimento 3						
Genótipos	Isolados					Média
	13A	16B	18A	9C	Xp15	
C1218	4,33	3,33	3,44	2,50	1,00	2,92
C1137	3,00	4,00	3,00	1,67	1,00	2,53
Yoshi	3,83	3,00	3,11	3,33	1,72	3,00
O8245	3,17	3,61	2,78	4,83	1,17	3,11
OSD	4,33	4,33	3,44	2,56	2,89	3,51
Rotam	5,33	4,17	6,00	5,33	1,00	4,37
IPA6	5,50	5,17	6,05	4,83	1,44	4,60
Média	4,21	3,94	3,98	3,58	1,46	3,43
Amplitude	2,50	2,17	3,27	3,67	1,89	2,07

LSD<sub>Genótipos</sub> = 0,82; LSD<sub>Isolados</sub> = 0,69

Apesar de muito usada como fonte de resistência à mancha bacteriana em diversos estudos (LOBO; GIORDANO; LOPES, 2005; LOBO; LOPES; GIORDANO, 2005; PEREIRA, 2010; PONTES; MOITA; QUEZADO-DUVAL, 2012; ROBBINS et al., 2009), o genótipo O8245

apresentou uma severidade intermediária nas épocas 1 e 3 e relativamente alta na época 2. Este resultado aponta para o fato de que padrões de resistência utilizados em experimentos podem apresentar níveis de reação distintos sob a pressão de outras variantes do patógeno. Além disso, reforça a importância de se encontrarem genótipos com resistência de amplo espectro aos isolados que acometem regiões produtoras brasileiras, a fim de serem usados em programas de melhoramento no país. A classificação da reação à mancha bacteriana na média das três épocas (Tabela 7) se manteve semelhante ao das épocas individuais, inclusive a severidade intermediária a suscetível do genótipo OSD, repetindo o padrão observado por Piotto et al. (dados não publicados).

Quanto aos isolados, 13A foi o mais agressivo nas épocas 1 e 3, tendo diferido significativamente dos demais na primeira época de avaliação. Já o Xp15 foi o menos agressivo em todas as épocas, sendo significativamente diferente dos demais nas épocas 1 e 3. Isso revela a variabilidade que pode existir até mesmo em uma pequena amostra de variantes patogênicas. Embora Xp15 tenha induzido um pouco mais de severidade de sintomas no genótipo OSD (épocas 1 e 3), este isolado não variou significativamente em sua capacidade de induzir sintomas. Pontes, Moita, Quezado-Duval (2012) também observaram que a severidade de algumas cultivares não variou ao usarem isolados específicos, tendo associado este resultado à baixa agressividade dos mesmos.

As maiores amplitudes nos valores de severidade foram observadas para o isolado 9C na época 3 (3,67) e para o 13A (3,56) na época 1, indicando preliminarmente um potencial destes em melhor discriminar a reação de genótipos e servir como padrão em futuros experimentos. Contudo, é importante checar que o ranking das severidades não foi constante entre isolados e épocas. O isolado 18A, por exemplo, classificou O8245 como o segundo mais suscetível na época 2 e como o mais resistente na época 3, evidenciando que há forte interação entre épocas, genótipos de tomateiro e isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans*.

A patogenicidade da maioria das espécies de *Xanthomonas* está relacionada à produção de goma xantana, um exopolissacarídeo essencial para a progressão da doença (BIANCO et al., 2016). De fato, o isolado 13A, que induziu o maior nível de severidade, foi o que visualmente apresentou maior produção de goma sob cultivo em placa de Petri, seguido pelo 9C (dados não publicados). Além disso, o isolado Xp15, que induziu uma menor quantidade de sintomas, foi o que produziu menor quantidade de goma em placa. A associação entre produção da goma e patogenicidade de *Xanthomonas* spp. patogênicas foliares já é relatada na literatura (REDONDO et al., 2015; RYAN et al., 2011). Assim, a correlação positiva entre produção de goma *in vitro* e severidade da doença em casa de vegetação, ressaltada por este estudo, pode ser uma informação útil na seleção de outros

isolados de *Xanthomonas* spp. associados à infecção pela mancha bacteriana a serem empregados em experimentos futuros. A menor produção de goma xantana e menor patogenicidade de isolados em seus hospedeiros podem estar associadas ao maior tempo de armazenamento e de cultivo das bactérias em meios de cultura (KAMOUN; KADO, 1990) que, no caso do Xp15, foi superior (dados não publicados), sendo este o primeiro isolado coletado entre os utilizados neste estudo.

**Tabela 7.** Médias de notas de severidade dos genótipos de tomateiro à mancha bacteriana por isolado e época de condução. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2017 e 2018.

	GENÓTIPO	ISOLADO					ÉPOCAS			Média
		13A	16B	18A	9C	Xp15	1	2	3	
	<b>C1137</b>	2,33	2,55	2,38	2,09	1,14	2,13	1,75	2,53	<b>2,10</b>
	<b>C1218</b>	2,86	2,23	2,39	2,27	1,21	2,04	1,80	2,92	<b>2,19</b>
	<b>Yoshi</b>	2,63	2,52	2,45	2,67	1,48	2,33	1,88	3,00	<b>2,35</b>
	<b>O8245</b>	3,59	3,04	2,90	3,06	1,67	3,13	2,38	3,11	<b>2,85</b>
	<b>OSD</b>	3,68	3,83	3,01	2,67	2,33	3,64	2,27	3,51	<b>3,10</b>
	<b>Rotam</b>	4,23	3,59	3,98	3,55	1,57	3,66	2,37	4,37	<b>3,38</b>
	<b>IPA6</b>	4,64	3,98	4,64	4,31	2,62	5,04	2,62	4,60	<b>4,04</b>
		<b>3,42</b>	<b>3,11</b>	<b>3,11</b>	<b>2,95</b>	<b>1,72</b>	<b>3,14</b>	<b>2,15</b>	<b>3,43</b>	<b>2,86</b>

LSD<sub>Genótipos</sub> = 0,24; LSD<sub>Isolados</sub> = 0,22. LSD<sub>Épocas</sub> = 0,26.

A época que proporcionou maior nível de sintomas foi a época 3, seguida da época 1 e, por último, a época 2. Como explicado acima, a variação observada, sobretudo com relação às discrepâncias observadas na época 2, deve-se possivelmente a fatores climáticos característicos de cada época, a diferenças nos inóculos de cada um dos experimentos ou à análise subjetiva utilizando notas de escalas. Provavelmente, uma melhor robustez e melhores conclusões poderiam ser obtidas com múltiplas tomadas da severidade ao longo do tempo, calculando-se a taxa de progresso da doença. Além disso, considerando a amplitude da escala de notas de Horsfall e Barratt, que vai de 1 a 12, a média de severidade de sintomas observada para as três épocas, 2,86, foi baixa. Este resultado está possivelmente associado ao fato de a avaliação da doença ter sido realizada de forma precoce e em apenas uma tomada de valores de severidade, como já mencionado, e devido à predominância de genótipos previamente caracterizados como resistentes e intermediários, não devendo ser analisado de forma isolada.

Até aqui, de forma geral, foram apresentados os resultados dos efeitos gerais de isolados, genótipos e épocas. Contudo, detectaram-se interações aos pares entre todos os fatores, além de interação significativa entre os três fatores. Nesse caso, o desdobramento de todas as interações será generalizado, no tópico a seguir, por meio da abordagem GGE Biplot, a fim de conhecer melhor os padrões relativos à estabilidade e/ou especificidade da capacidade de cada isolado bacteriano de induzir sintomas nas plantas.

Esta abordagem é uma adaptação da análise de interação Genótipo por Ambiente, a qual neste caso será tomada como uma análise de interação Genótipo por Isolado, conforme descrito por Yan; Falk (2002). Com isso, será possível classificar os genótipos quanto à estabilidade na resposta à inoculação com diferentes isolados e avaliar, de maneira geral, a capacidade de cada isolado em induzir sintomas de forma estável entre os genótipos. Esta análise deverá contribuir para a seleção de um isolado a ser utilizado como padrão para os trabalhos que virão na sequência deste capítulo.

### **2.3.3. Estabilidade da reação de genótipos de tomateiro em função da inoculação de diferentes isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans***

Por meio da análise GGE Biplot, assumindo o modelo de interação Genótipo por Isolado em três épocas diferentes, será apresentado a seguir um estudo demonstrando a relação entre a média e a estabilidade para notas de severidade da mancha bacteriana de sete genótipos de tomateiro em função da inoculação com cinco isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. Neste estudo, as menores médias indicam menor quantidade de sintomas – menores notas atribuídas às plantas –, o que representa, em última análise, maior resistência dos genótipos.

A Figura 3 apresenta os gráficos biplots da relação entre a média e a estabilidade para as notas de severidade de sintomas da mancha bacteriana, avaliadas em cada uma das três épocas, bem como o gráfico contemplando a análise para todas as combinações de isolados e épocas, em função dos genótipos. Neste modelo, os genótipos são avaliados tanto quanto ao seu desempenho quanto à sua estabilidade de resposta à ocorrência de sintomas, em função dos isolados, em uma adaptação da metodologia GGE Biplot na qual os isolados atuam como diferentes ambientes (YAN; FALK, 2002; YAN; TINKER, 2006). Os valores singulares são particionados inteiramente nos genótipos (SVP = JK), com escala em 0 e a centralização em G (genótipo) + GE (interação genótipo e isolado), facilitando especialmente a comparação entre genótipos (YAN, 2002).

O total da variação explicada pelos biplots, indicada pela soma dos dois primeiros componentes principais foi de 96,01%, 85,30%, 87,58% e 83,58%, para as épocas 1, 2, 3 e no conjunto delas, respectivamente. Vale salientar que a estabilidade de genótipos é melhor representada nos gráficos que captam maior proporção da variação total (YAN; TINKER, 2006). A coordenada contendo uma seta (abscissa) refere-se à média dos genótipos ao longo dos diferentes isolados, sendo esta apontada para a direção de maior magnitude de notas de severidade. Logo, confirmando a discussão do item anterior, observa-se que o genótipo IPA6 foi o mais suscetível em todos os experimentos, seguido de Rotam e OSD, exceto na época 2, em que O8245 foi a

segunda mais suscetível. Já os genótipos C1137 e C1218 foram, em média, os mais resistentes em todas as épocas analisadas.

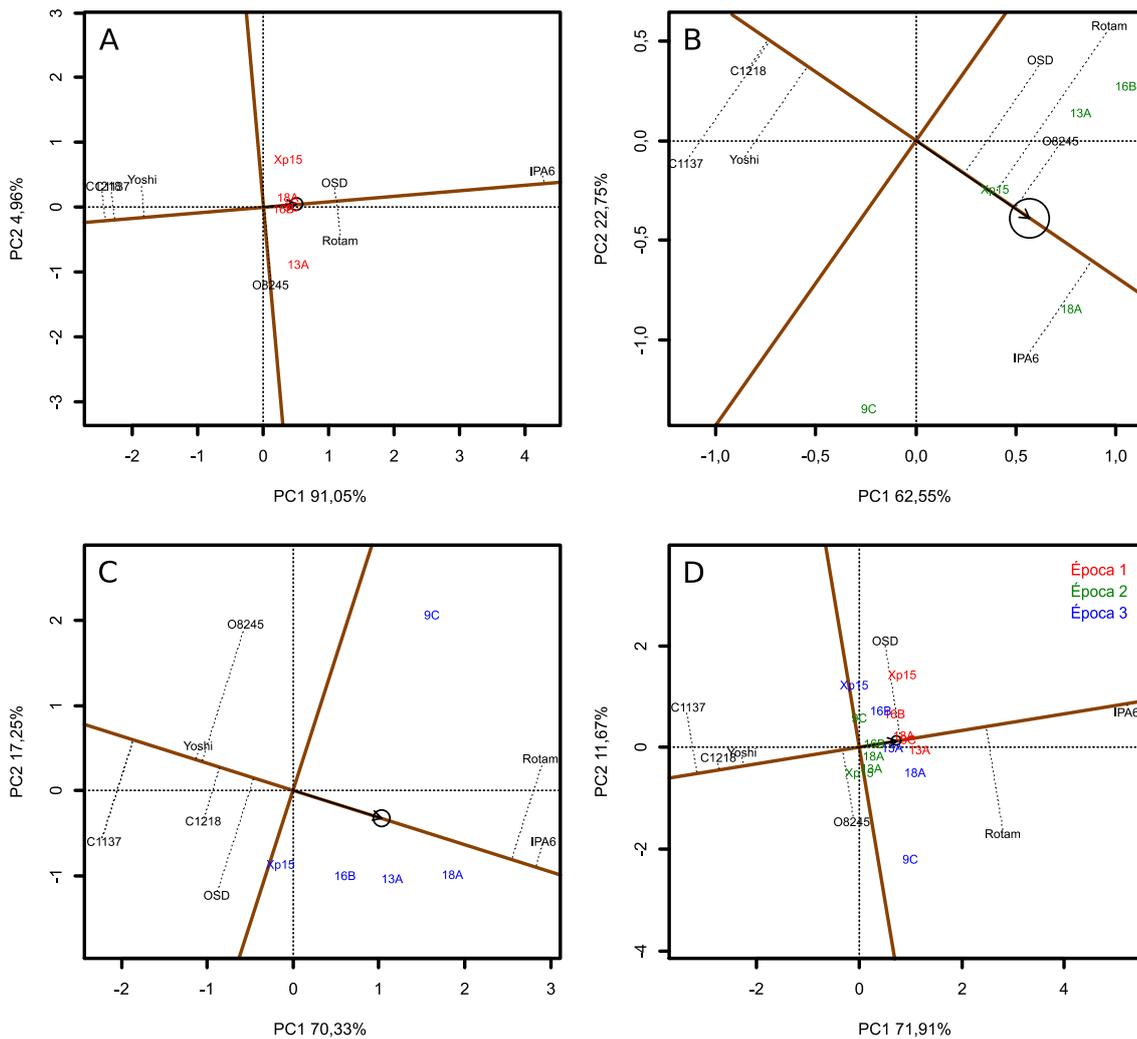
A abcissa do gráfico biplot também é uma referência para a magnitude da estabilidade de um genótipo. Quanto mais distante um genótipo se situa deste eixo, menos estável é o comportamento em nível de ocorrência de sintomas em relação aos isolados avaliados (esta distância pode ser observada pelo comprimento das linhas pontilhadas nos biplots). Assim, em média, C1218 e Rotam caracterizaram-se como os genótipos mais e menos estáveis, respectivamente, sendo que Rotam foi o que apresentou comportamento menos previsível em relação aos demais. O genótipo IPA6 também teve um comportamento relativamente estável em relação à sua alta suscetibilidade à *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, mostrando elevadas notas de severidade de sintomas em todos os experimentos, embora tenha demonstrado menor estabilidade na época 2. Isso ocorreu porque ele obteve uma média maior que a esperada para os isolados 18A e 9C, porém menor que a esperada quando infectado pelos isolados 13A e 16B. Já sua severidade ao isolado Xp15 foi próxima à esperada com base na nota média apresentada por ele frente aos demais isolados.

Aparentemente, a menor estabilidade geral entre os genótipos na época 2 pode estar relacionada ao baixo nível de severidade e semelhança na reação dos mesmos, o que dificultou a identificação mais precisa das diferenças nos níveis de sintomas e atribuição de notas. De forma geral, a maior estabilidade e menor severidade do genótipo C1218, bem como a maior estabilidade e maior severidade do genótipo IPA6, indicam o potencial de ambos como genótipos-controle de resistência e suscetibilidade, respectivamente, em experimentos de avaliação da reação à *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. Interessantemente, tal resultado destaca o genótipo C1218 como uma possível fonte de alelos favoráveis a ser usada em programas de melhoramento visando resistência à mancha bacteriana, podendo apresentar alelos ou genes de resistência ainda não conhecidos. A continuação de pesquisas com este acesso, seja por meio de estudos de herança, testes de alelismo, piramidação com outros genes de resistência e de outros caracteres de interesse agrônômico, ou até mesmo apropriando-se de técnicas genômicas, poderá revelar ainda mais o potencial deste genótipo.

Outro genótipo que merece destaque é a cultivar Yoshimatsu (Yoshi), que também apresentou estabilidade na reação à mancha bacteriana. Este genótipo foi desenvolvido no Brasil, para cultivo em condições de ambiente quente e úmido (MARTINS et al., 2013), o que indica que o mesmo possui um bom *background* genético, podendo ser um bom genitor para programas de melhoramento cujo objetivo seja o desenvolvimento de linhagens resistentes à mancha bacteriana. Já os genótipos C1137 e C1218, caracterizados como sendo da variedade botânica *cerasiforme*

(*Solanum esculentum* var. *cerasiforme*), apesar da elevada resistência ao patógeno em questão, possuem frutos pequenos, número reduzido de frutos por racemo e outras características não favoráveis quando se deseja obter novas linhagens promissoras. Contudo, os mesmos seriam ótimas alternativas para o pré-melhoramento e introdução de genes de resistência em populações de tomateiro.

Por fim, o genótipo O8245, conhecido como uma tradicional fonte de resistência à mancha bacteriana (LOBO; GIORDANO; LOPES, 2005; LOBO; LOPES; GIORDANO, 2005; PEREIRA, 2010; PONTES; MOITA; QUEZADO-DUVAL, 2012; ROBBINS et al., 2009), não foi suficientemente resistente sob as condições destes experimentos, embora tenha sido classificado pouco acima da média na análise conjunta. Assim, haja vista a grande diversidade e dinamismo do patógeno (ARAÚJO et al., 2017), as complexas interações entre este e o hospedeiro e a ausência de genótipos comerciais resistentes no Brasil (PIOTTO et al., 2015, PIOTTO et al., dados não publicados), indicam a urgência de melhor conhecer o patossistema sob o cenário nacional e buscar alternativas para se obter novas cultivares com estabilidade de resistência à *Xanthomonas* spp.



**Figura 3.** Relação entre a média e a estabilidade da severidade da mancha bacteriana de sete genótipos de tomateiro a cinco isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. A) Época 1 (Abr-Mai, 2017); B) Época 2 (Nov-Dez, 2017); C) Época 3 (Mar-Abr, 2018); D) Análise em conjunto das épocas 1, 2 e 3. Gráficos plotados com foco nos genótipos.

De forma geral, a análise GGE Biplot com foco nos genótipos, baseada na severidade de sintomas induzidos pelos diferentes isolados, contribuiu para posicionar os genótipos em relação à sua resposta e estabilidade geral em função da inoculação do patógeno. Embora bastante útil, não foi possível identificar com clareza os padrões de ação de cada isolado sobre os genótipos, uma vez que foi detectada forte interação entre Isolados x Genótipos x Épocas. Com isso, foi necessário utilizar uma abordagem com foco no patógeno, a fim de identificar aquele com maior capacidade de diferenciar os genótipos e maior estabilidade na sua patogenicidade, entre genótipos e épocas diferentes.

### 2.3.4. Estabilidade da patogenicidade de isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* inoculados em diferentes genótipos de tomateiro

Considerando a elevada magnitude das interações entre Isolados x Genótipos x Épocas e a necessidade de conhecer melhor o efeito geral dos isolados sobre os genótipos, foi utilizada a abordagem GGE Biplot com foco nos primeiros, considerando a média geral das notas de severidade das três épocas. Assim, foi possível colocar em evidência a patogenicidade e estabilidade dos isolados, assumindo cada genótipo como se fosse um tipo de ambiente para o patógeno.

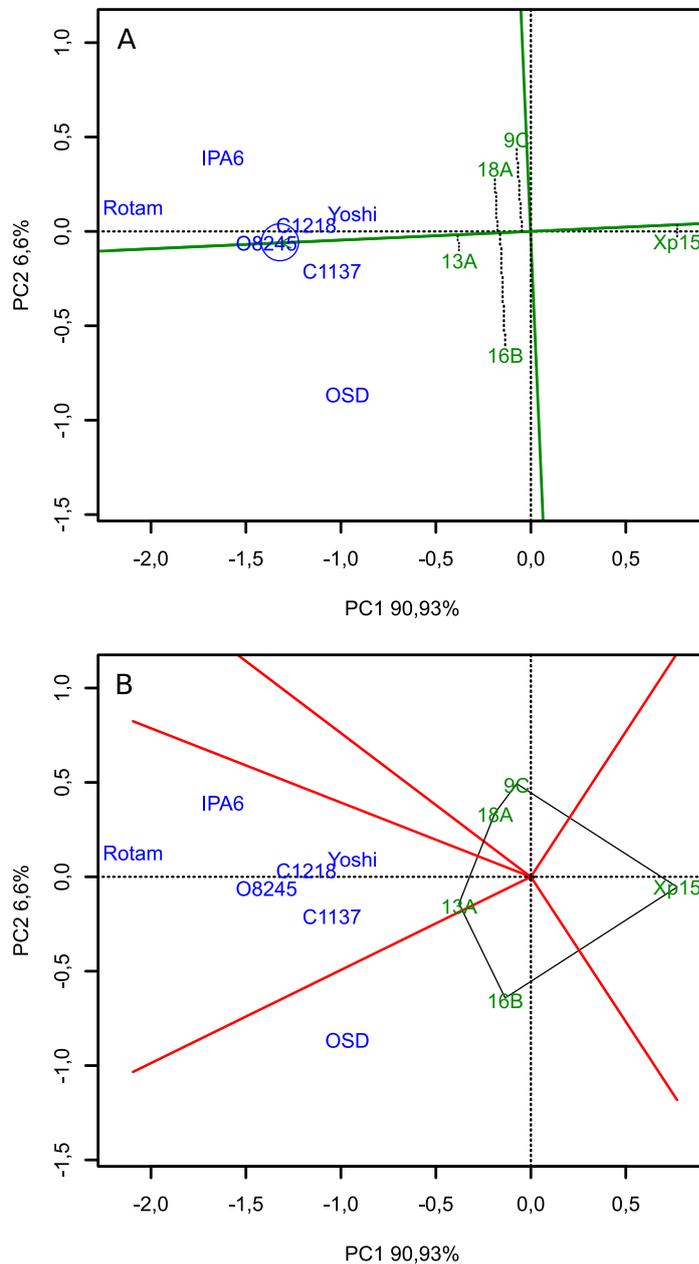
Os dados desta análise conjunta resultaram em dois biplots (Figura 4) que explicaram 97,53% da variação total, o que indica uma ótima eficiência da análise. Tais gráficos foram construídos de tal forma em que os valores singulares são particionados inteiramente nos isolados (SVP = GH), com escala em 0 e a centralização em G (genótipo) + GE (interação genótipo e isolado), o que coloca o patógeno em destaque para fins da análise de sua patogenicidade (YAN, 2002; YAN; FALK, 2002).

A distribuição de genótipos do hospedeiro em diferentes setores indica a presença de interação, bem como especificidade na patogenicidade de isolados. Na presença desta especificidade, quanto mais distantes estão os genótipos da origem do biplot, maior é a sua capacidade discriminatória quanto aos isolados do patógeno (YAN; FALK, 2002). Logo, Rotam e IPA6 foram os genótipos que melhor discriminaram a patogenicidade dos isolados utilizados, enquanto que aqueles mais próximos da origem do biplot (Yoshi, C1218, O8245 e C1137) apresentaram menor diferença quanto à sua reação aos isolados bacterianos.

O gráfico da relação entre a média e a estabilidade (Figura 4A) de notas de severidade evidencia a maior estabilidade na patogenicidade dos isolados 13A e Xp15, sendo que o primeiro foi o que apresentou a maior severidade de sintomas para grande parte dos genótipos em estudo (Tabela 7). Além disso, grupos de isolados localizados próximos à origem do biplot são considerados menos específicos (YAN; FALK, 2002), corroborando o comportamento mais genérico do isolado 13A.

A relação entre isolados também pode ser visualizada no gráfico Quem-vence-onde (Figura 4B), que apresenta o padrão da patogenicidade de isolados para cada genótipo. As linhas vermelhas separam o biplot em setores, auxiliando a análise da interação, e os vértices do polígono situados em cada setor são os mais ou menos virulentos para um ou todos os genótipos. Assim, o fato do isolado Xp15 não ter quaisquer genótipos circunvizinhos, confirma o seu padrão menos agressivo para todos eles. Da mesma forma, o isolado 13A posicionou-se no vértice mais próximo de quase todos os genótipos, sinalizando a sua maior patogenicidade em relação à maioria destes.

Já o isolado 9C foi, em média, o mais agressivo para o genótipo OSD, isolando-o em um mesmo setor do gráfico.



**Figura 4.** Relação entre a média e a estabilidade (A) e gráfico “Quem-vence-onde” (B) da severidade (média das três épocas) da mancha bacteriana de sete genótipos de tomateiro a cinco isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. Gráficos plotados com foco nos isolados.

A presença de interação isolado-genótipo é clara ao se observar que alguns isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* classificaram-se distantes um dos outros, apresentando níveis de patogenicidade variáveis nos diferentes genótipos de tomateiro, o que corrobora a complexidade deste patossistema. De forma complementar aos resultados explorados aqui, Timilsina et al.

(2019b) também notaram que padrões genômicos analisados em grupos filogenéticos de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* na Flórida parecem estar correlacionados com a especificidade a hospedeiros, além do desempenho geral do patógeno.

É importante destacar, ainda, que o isolado 13A foi obtido de plantas infectadas no estado de São Paulo sendo, portanto, típico da região em que os experimentos deste estudo foram conduzidos. Além disso, este isolado apresentou crescimento mais rápido associado à maior produção de goma dentre os isolados analisados durante o crescimento em placa.

Os resultados apresentados acima demonstram a importância de se conhecer as relações entre os genótipos de tomateiro e os isolados de *Xanthomonas* spp. que acometem as áreas de cultivo. No melhoramento, a resistência satisfatória e de amplo espectro de linhagens é de enorme valia na obtenção de ganhos genéticos, o que só é possível obter se bem conhecidas as relações entre o patógeno e o hospedeiro. Além de resistentes, igualmente importante é a obtenção de genótipos produtivos e com outras características de interesse, as quais devem ser incluídas nestas pesquisas.

Estudos envolvendo abordagens genômicas em larga escala para esta doença ainda são incipientes no Brasil e prometem gerar informações úteis ao melhoramento, como já observado em outros países (LIABEUF; SIM; FRANCIS, 2018; SIM et al., 2015; WANG; ZHANG; ZHU, 2019). Sendo uma doença cuja resistência apresenta herança quantitativa e fortemente influenciada pelo ambiente, uma fenotipagem mais acurada revela-se como ferramenta prioritária para que seja possível se avançar neste sentido (DUAN et al., 2015; NIEDERHEITMANN et al., 2019; SUN et al., 2014).

## 2.4. Conclusões

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- Existem diferenças entre genótipos de tomateiro quanto à reação aos diferentes isolados de *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, uma vez que foram detectadas interações complexas entre Genótipos, Isolados e Épocas;

- Dentre os genótipos estudados, C1218 e IPA6 destacaram-se pela sua maior resistência e suscetibilidade, respectivamente, mostrando reação estável em relação à ocorrência de sintomas de mancha bacteriana em função de diferentes isolados e em diferentes épocas, o que indica o potencial de ambos como genótipos-controle em experimentos de seleção à *X. euvesicatoria* pv. *perforans*;

- O genótipo C1218 apresentou potencial como fonte de resistência estável em programas de melhoramento;

- O isolado 13A de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* foi, em média, o mais agressivo e estável, tendo discriminado genótipos suscetíveis e resistentes. Por estas razões, ele foi selecionado como isolado padrão para experimentos de fenotipagem em larga escala visando à resistência à mancha bacteriana.

## Referências

- ADHIKARI, P. 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. 1–14, 2020.
- ARAÚJO, E. R. et al. Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, n. 1, p. 159–168, 2017.
- ASTUA-MONGE, G. et al. *Xv4-vrxv4*: A new gene-for-gene interaction identified between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race T3 and the wild tomato relative *Lycopersicon pennellii*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 12, p. 1346–1355, 2000.
- BALLVORA, A. et al. Genetic mapping and functional analysis of the tomato *Bs4* locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 5, p. 629–638, 2001.
- BERNAL, E.; LIABEUF, D.; FRANCIS, D. M. Evaluating quantitative trait locus resistance in tomato to multiple *Xanthomonas* spp. **Plant Disease**, v. 104, n. 2, p. 423–429, 2020.
- BIANCO, M. I. et al. Xanthan pyruvilation is essential for the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29, n. 9, p. 688–699, 2016.
- 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.
- BOSCH, S. E. et al. ‘Rotam 4’, a Multiple Disease-resistant Fresh-market Tomato. **HortScience**, v. 25, n. 10, p. 1313–1314, 1990.
- CONSTANTIN, E. C. et al. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology**, v. 65, n. 5, p. 792–806, 2016.

- DUAN, J. et al. Development and validation of a standard area diagram set to aid estimation of bacterial spot severity on tomato leaves. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, n. 4, p. 665–675, 2015.
- FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, p. 275–296, 1971.
- FOOLAD, M. R. et al. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaflet evaluations of tomato germ plasm for early blight resistance. **Plant Disease**, v. 84, n. 9, p. 967–972, 2000.
- FRUTOS, E.; GALINDO, M. P.; LEIVA, V. An interactive biplot implementation in R for modeling genotype-by-environment interaction. **Stochastic Environmental Research and Risk Assessment**, v. 28, n. 7, p. 1629–1641, 2014.
- HORSFALL, J. G.; BARRATT, R. W. An improved grading system for measuring plant diseases. **Phytopathology**, v. 35, p. 655, 1945.
- HUTTON, S. 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.
- HUTTON, S. F.; SCOTT, J. W.; JONES, J. 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, 2010.
- JAUNET, T. X.; WANG, J. F. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. **Phytopathology**, v. 89, n. 4, p. 320–327, 1999.
- JONES, J. B. et al. A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Plant Disease**, 1995.
- JONES, J. B. et al. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 1211–1219, 2000.
- JONES, J. 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.
- KAMOUN, S.; KADO, C. I. Phenotypic switching affecting chemotaxis, xanthan production, and virulence in *Xanthomonas campestris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 3855–3860, 1990.
- KOENRAADT, H. et al. Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. **Acta Horticulturae**, v. 808, p. 99–102, 2009.
- LIABEUF, D.; SIM, S. C.; FRANCIS, D. M. Comparison of marker-based genomic estimated breeding values and phenotypic evaluation for selection of bacterial spot resistance in tomato. **Phytopathology**, v. 108, n. 3, p. 392–401, 2018.

- LI, N.; ZHANG, X.; YANG, W. Marker-assisted development and characterization of near-isogenic lines carrying the *Rx4* gene for hypersensitive resistance to *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* race T3 in tomato. **Molecular Breeding**, v. 39, n. 12, 2019.
- LIU, X. et al. Tomato SIPUB24 enhances resistance to *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* race T3. **Horticulture Research**, v. 8, n. 1, 2021.
- LOBO, V. L. DA S.; GIORDANO, L. DE B.; LOPES, C. A. Herança da resistência à mancha bacteriana em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 343–349, 2005.
- LOBO, V. L. DA S.; LOPES, C. A.; GIORDANO, L. 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, n. 1, p. 17–20, 2005.
- MARTINS, L. H. P. et al. Tomate Yoshimatsu – uma cultivar adaptada ao trópico úmido brasileiro. In: NODA, H.; SOUZA, L. A. G. DE; SILVA FILHO, D. F. DA (Eds.). **Agricultura Familiar no Amazonas – Conservação Dos Recursos Ambientais**. Manaus, AM: Wega, 2013. p. 15–26. p. 15–26.
- MINSAVAGE, G. V.; JONES, J. B.; STALL, R. E. Cloning and sequencing of an avirulence gene (*avrRxv3*) isolated from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* tomato race 3. (Abstr.) **Phytopathology**, v. 86, p. S15, 1996.
- NIEDERHEITMANN, M. et al. **Machine Learning-assisted Image Analysis to quantify Foliar Disease Severity from Tomato Bacterial Spot**. Proceedings of the International Meeting on Plant Breeding - V.3 - 2019. **Anais...Piracicaba: 2019**. Disponível em: <<https://gvenck.github.io/proceedings/>>. Acesso em: 23 nov. 2020.
- 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.
- OSDAGHI, E. et al. Multilocus sequence analysis reveals a novel phylogroup of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* causing bacterial spot of tomato in Iran. **Plant Pathology**, v. 67, n. 7, p. 1601–1611, 2018.
- PEI, C. et al. Fine mapping and analysis of a candidate gene in tomato accession PI128216 conferring hypersensitive resistance to bacterial spot race T3. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 124, n. 3, p. 533–542, 2012.
- PEREIRA, M. **Avaliação de híbridos comerciais e linhagens de tomate indústria e acessos do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças quanto a resistência à mancha bacteriana. (Monografia)**. Brasília: Faculdade da Terra de Brasília, 2010.
- 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**

- PONTES, N. DE C.; MOITA, A. W.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Estabilidade da resistência de “Ohio 8245” e “Heinz 9553” à mancha bacteriana do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 99–105, 2012.
- POTNIS, N. et al. Bacterial spot of tomato and pepper: Diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 9, p. 907–920, 2015.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>.
- RAMALHO, M.; FERREIRA, D.; OLIVEIRA, A. DE. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. 3ª ed. Lavras: Editora UFLA, 2012.
- REDONDO, C. et al. Influence of selected bactericides on biofilm formation and viability of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Crop Protection**, v. 78, p. 204–213, 2015.
- ROBBINS, M. 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.
- RYAN, R. P. et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: Understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 344–355, 2011.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ª ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 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.
- SCOTT, J. W. et al. A single gene controls the hypersensitive response of Hawaii 7981 to race 3 (T3) of the bacterial spot pathogen. **Rpt Tomato Genet Coop**, v. 46, p. 23, 1996.
- SCOTT, J. W. et al. Resistance to race T2 of the bacterial spot pathogen in tomato. **HortScience**, v. 32, n. 4, p. 724–727, 1997.
- SCOTT, J. W. et al. Tomato bacterial spot resistance derived from PI 114490; inheritance of resistance to race T2 and relationship across three pathogen races. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 5, p. 698–703, 2003.
- SCOTT, J. W. et al. Resistance to bacterial spot race T4 and breeding for durable, broad-spectrum resistance to other races. **Rep. Tomato Genet. Coop.**, v. 56, p. 33–36, 2006.
- SCOTT, J. W.; JONES, J. B. Sources of resistance to bacterial spot in tomato. **HortScience**, v. 21, p. 304–306, 1986.

**Série de Dados Climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba, SP.**

Departamento de Engenharia de Biosistemas. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, LEB - ESALQ - USP. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/leb/postocon.html>>. Acesso em: 23 nov. 2020.

SHARLACH, M. et al. Fine genetic mapping of *RXopJ4*, a bacterial spot disease resistance locus from *Solanum pennellii* LA716. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 3, p. 601–609, 2013.

SIM, S. C. et al. Association analysis for bacterial spot resistance in a directionally selected complex breeding population of tomato. **Phytopathology**, v. 105, n. 11, p. 1437–1445, 2015.

SOMODI, G. C. et al. Screening tomato seedlings for resistance to bacterial spot. **HortScience**, v. 29, n. 6, p. 680–682, 1994.

SOUZA, M. F. M. 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.

STALL, R. E.; JONES, J. B.; MINSAVAGE, G. V. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, n. 1, p. 265–284, 2009.

SUN, H. 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. TIMILSINA, S. et al. Reclassification of *Xanthomonas gardneri* (ex Šutič 1957) Jones et al. 2006 as a later heterotypic synonym of *Xanthomonas cynarae* Trébaol et al. 2000 and description of *X. cynarae* pv. *cynarae* and *X. cynarae* pv. *gardneri* based on whole genome analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 343–349, 2019a.

TIMILSINA, S. et al. Multiple recombination events drive the current genetic structure of *Xanthomonas perforans* in Florida. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 448, p. 1–13, 2019b. WANG, H. et al. Molecular mapping of hypersensitive resistance from tomato “Hawaii 7981” to *Xanthomonas perforans* race T3. **Phytopathology**, v. 101, n. 10, p. 1217–1223, 2011.

WANG, J. F. et al. A new race of the tomato group of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, v. 80, p. 1070, 1990.

WANG, J. F.; STALL, R. E.; VALLEJOS, C. E. Genetic analysis of a complex hypersensitive reaction to bacterial spot in tomato. **Phytopathology**, v. 84, p. 126–132, 1994.

WANG, T.; ZHANG, H.; ZHU, H. CRISPR technology is revolutionizing the improvement of tomato and other fruit crops. **Horticulture Research**, v. 6, n. 1, 2019.

- WHALEN, M. C. et al. Avirulence gene *avrRxv* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Hawaii 7998. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 1993.
- YAHIAOUI-ZAIDI, R.; LADJOUZI, R.; BENALLAOUA, S. Pathogenic variability within biochemical groups of *Pectobacterium carotovorum* isolated in Algeria from seed potato tubers. **Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2010.
- YAN, W. Singular-value partitioning in biplot analysis of multienvironment trial data. **Agronomy Journal**, v. 94, n. 5, p. 990–996, 2002.
- YAN, W.; FALK, D. E. Biplot analysis of host-by-pathogen data. **Plant Disease**, v. 86, n. 12, p. 1396–1401, 2002.
- YAN, W.; TINKER, N. A. Biplot analysis of multi-environment trial data: Principles and applications. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 3, p. 623–645, 2006.
- YANG, W. et al. Resistance in *Lycopersicon esculentum* intraspecific crosses to race T1 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* causing bacterial spot of tomato. **Phytopathology**, v. 95, n. 5, p. 519–527, 2005.
- YU, Z. H. et al. Genomic localization of tomato genes that control a hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. **Genetics**, v. 141, n. 2, p. 675–682, 1995.



### 3. FENOTIPAGEM PARA RESISTÊNCIA À MANCHA BACTERIANA EM TOMATEIRO USANDO ANÁLISE DE IMAGENS

#### RESUMO

A severidade de doenças foliares em plantas é frequentemente estimada por meio do uso de escalas de notas ou diagramáticas. Esta forma de avaliação gera dados de natureza não-paramétrica, limitando seu uso efetivo em estudos de associação e outras abordagens genômicas. A análise de imagens utilizando segmentação baseada em algoritmos de *machine learning* consiste em uma ferramenta eficaz para se obter informações quantitativas de severidade de doenças. Os sintomas foliares da mancha bacteriana, uma doença importante em muitas regiões produtoras de tomateiro ao redor do mundo, incluem lesões nas bordas das folhas e manchas marrons, angulares e de aspecto encharcado. Esse padrão de sintomas contrasta com a cor da folha e fundo de imagens, o que pode ser reconhecido por algoritmos de classificação de pixels. Assim, este estudo teve como objetivo testar dez métodos baseados em segmentação de imagens na mensuração dos sintomas da mancha bacteriana. Foram utilizadas 466 imagens de folhas de 20 genótipos de tomateiro com severidades variáveis da doença. As imagens também foram avaliadas com a escala de Horsfall & Barratt (HB), comumente utilizada para avaliar a doença. Os métodos de análise computacional variaram quanto ao número de imagens treinadas para segmentação (uma a dez). As folhas foram classificadas e mensuradas quanto à severidade da doença usando os plugins *Trainable Weka Segmentation* e *Color Pixel Counter*, respectivamente, ambos disponíveis no software gratuito e de código aberto Fiji/ImageJ. Os métodos foram avaliados com base na herdabilidade ( $h^2$ ) das estimativas de severidade, correlações ( $r$ ) com os dados obtidos por meio da escala HB e tempo computacional de análise. Os resultados revelaram alta  $h^2$  e correlação significativa com a severidade estimada por meio da escala HB. No entanto, a comparação do percentual de sintomas indicado por cada tipo de avaliação indicou uma tendência em superestimar valores de escala de notas, além de uma maior variação entre as estimativas de ambos os tipos de avaliação sob notas da escala HB mais altas. Os dados obtidos indicaram o potencial de uso do método de análise de imagens para a mensuração da severidade da mancha bacteriana em folhas de tomateiro. Assim, o método N10, o qual proporcionou maior  $h^2$  (0,78) e  $r$  (0,91), foi selecionado para os experimentos de fenotipagem realizados posteriormente, para fins de estudos em associação genômica.

**Palavras-chave:** classificação de pixels; *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, melhoramento de plantas; *Solanum lycopersicum* L., *machine learning*.

#### ABSTRACT

Foliar disease severity in plants is often assessed using rating or diagrammatic scales. Scaled evaluations generate data of nonparametric nature, limiting their effective use in genome-wide association studies and other genomic approaches. Image analysis utilizing segmentation based on machine learning algorithms, provides a

straightforward tool for obtaining quantitative information of disease severity. Foliar symptoms of bacterial spot, a major disease in many tomato-growing regions worldwide, include lesions at the margin of leaves and water-soaked, brown, angular spots. These patterned symptoms contrast with the leaf and background color, which can be recognized by pixel classification algorithms. Thus, in this study, ten methods based on image segmentation were tested to assess bacterial spot in 466 leaf images from 20 tomato genotypes displaying variable disease severities. The images were also rated with the Horsfall & Barratt (HB) scale, commonly used to assess the disease. Computational analysis methods varied according to the number of images trained for segmentation (one to ten). The leaves were classified and measured for disease severity using the Trainable Weka Segmentation and Color Pixel Counter plugins, respectively, both available in the free and open environment software Fiji/ImageJ. Methods were assessed based on severity heritability estimates ( $h^2$ ), correlations ( $r$ ) with rating data and computational time. Results revealed high  $h^2$  and significant correlation with disease severity estimated using the HB scale. However, a comparison of symptoms percentage indicated by each type of assessment indicated a tendency in overestimating scale rating values, in addition to a greater variation between those measurements suggested by both types of assessment under higher HB scale ratings. The data collected indicated the potential of using the image analysis method to determine bacterial spot severity in tomato leaves. Thus, the method N10, which provided the highest  $h^2$  (0.78) and  $r$  (0.91), was selected for the phenotyping experiments carried out afterward, used to perform a genome-wide association study.

**Keywords:** pixel classification; *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, plant breeding; *Solanum lycopersicum* L., machine learning.

### 3.1. Introdução

A ciência da fenotipagem e fenômica de plantas tem avançado em ritmo acelerado, impactando a forma como informações genômicas se associam à plasticidade fenotípica. A enorme variação existente entre indivíduos quanto a características de interesse ao estudo agrônomo como, por exemplo, a severidade de uma doença foliar, é resultado de interações complexas entre o genótipo e o ambiente (HOULE; GOVINDARAJU; OMHOLT, 2010). A precisa mensuração destes efeitos é essencial para sua aplicação eficiente em diversos ramos de estudos, tendo contribuído muito no melhoramento de plantas ao longo dos últimos anos (ARAUS et al., 2018; ARAUS; CAIRNS, 2014; COBB et al., 2013; SINGH et al., 2016).

A quantificação da severidade de doenças foliares para fins de análises em genética e melhoramento é majoritariamente realizada por meio de uso de escalas de notas ou diagramáticas, tanto em campo quanto em casa de vegetação. É o caso da avaliação da reação à mancha bacteriana, uma doença de grande relevância nas regiões produtoras de tomate ao redor do mundo, cuja severidade é mensurada principalmente por meio do uso da escala de Horsfall & Barratt (1945), que varia de 1 a 12. Esta escala não linear foi desenvolvida de forma a compensar o erro humano

na estimação da porcentagem de folhas infectadas, mas sua acurácia e confiabilidade têm sido questionadas (BOCK et al., 2009, 2010b; FORBES; KORVA, 1994; NUTTER; ESKER, 2006; SUN et al., 2014). Avaliações visuais são subjetivas, exigem experiência e apresentam uma ampla variação entre avaliadores e unidades experimentais, requerendo análises estatísticas mais elaboradas e podendo impactar estudos genômicos (GREEN et al., 2012; POLAND; NELSON, 2011). Além disso, a herança quantitativa da mancha bacteriana, as variações nas condições ambientais e entre populações de patógenos e a imprecisão do olho humano ao avaliar a doença (BOCK et al., 2010a), demonstram a necessidade de utilizar estratégias e ferramentas mais acuradas para realizar a fenotipagem de forma adequada (COBB et al., 2013; SUN et al., 2014).

Somado à este fato, tem-se que a avaliação em campo é dificultada pela influência de outras doenças que podem ocorrer ao mesmo tempo (BARBEDO, 2016). Desta forma, a mensuração dos sintomas de doenças realizadas de maneira quantitativa caracteriza-se como a melhor opção por contribuir para o aumento na acurácia de seleção e melhor determinação da variância genética disponível, fatores estes diretamente proporcionais ao aumento de ganhos genéticos (FALCONER; MACKAY, 1996).

A análise de imagens como ferramenta de estudos em fenotipagem de plantas, incluindo a mensuração da severidade de sintomas de doenças, tem se tornado cada vez mais popular pela vasta disponibilidade de tecnologias, de caracterizações detalhadas e aplicabilidade de técnicas de segmentação, detecção e acompanhamento da evolução dos objetos de estudo (HOULE; GOVINDARAJU; OMHOLT, 2010). Além disso, o processamento automático de imagens permite uma maior confiabilidade e repetibilidade, seja desde caracterizações microscópicas àquelas em nível de campo (ROUSSEAU; DEE; PRIDMORE, 2015), levando à obtenção de dados cada vez mais numerosos e permitindo a avaliação de populações maiores (ARAUS et al., 2018).

A informação contida em imagens precisa ser compreendida pelas ferramentas computacionais para que possa ser extraída, ou seja, traduzida de características biológicas para termos geométricos (ROUSSEAU; DEE; PRIDMORE, 2015). No caso de imagens de folhas com sintomas da mancha bacteriana, a informação biológica a ser detectada são lesões nas bordas das folhas e manchas marrons, angulares e de aspecto encharcado, bem como os limites de cada folha. Ao se tratar de sintomas causados pela espécie *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, tem-se ainda perfurações, uma vez que a bactéria é capaz de infectar o tecido foliar de tal modo a destacar o tecido necrosado (MARKS, 2017; QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010). Esse padrão de sintomas contrasta com a cor da folha e fundo de imagens, o que pode ser reconhecido por algoritmos de classificação de pixels, por exemplo. Algoritmos como estes funcionam como filtros, sendo alguns desenvolvidos

especificamente para detectar bordas, cores, formatos, ruídos, texturas e regiões de interesse específicas, por exemplo.

Imagens de folhas isoladas e obtidas sob as mesmas condições facilitam o processamento por meio de técnicas de processamento de imagens por não apresentarem os desafios inerentes à fenotipagem de campo, como no caso de imagens de plantas inteiras, cujos elementos podem se sobrepor (KELLY et al., 2016; TSAFTARIS; MINERVINI; SCHARR, 2016). Alguns softwares/plataformas já foram desenvolvidos para a mensuração do nível de severidade de doenças a partir de imagens (BAKR, 2005; BYLESJÖ et al., 2008; DELTA T DEVICES LTDA, 2020; GREEN et al., 2012; LAMARI, 2008; LEE et al., 2018; MACHADO et al., 2016; PEAT, 2020; PETHYBRIDGE; NELSON, 2018; ROUSSEAU et al., 2013; SOMMER et al., 2011; VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2001), mas nem todos são gratuitos, de código aberto, passíveis de automação e baseados em *machine learning*, e nenhum registro se tem quanto à mensuração da severidade da mancha bacteriana. Diversas combinações de algoritmos (ou filtros) de *machine learning* e maneiras de se anotar imagens para “ensinar” o software o que queremos obter são possíveis, o que resulta em variadas classificações de pixels e, conseqüentemente, diferentes capacidades em capturar os efeitos genéticos relacionados à reação à doença (ROUSSEAU; DEE; PRIDMORE, 2015).

O plugin *Trainable Weka Segmentation* (TWS) (ARGANDA-CARRERAS et al., 2017) é uma ferramenta do Software Fiji/ImageJ (SCHINDELIN et al., 2012) capaz de segmentar pixels de interesse em imagens. Por ser baseada em algoritmos de *machine learning* do ambiente WEKA (*Waikato Environment for Knowledge Analysis*) (HALL et al., 2009), anotações manuais são feitas a fim de treinar o programa sobre as estruturas a serem classificadas. No caso de folhas infectadas com a mancha bacteriana, por exemplo, seleções podem ser feitas sobre o tecido sadio, sobre os sintomas da doença e sobre o fundo da imagem, o que é suficiente para se fazer um cálculo da severidade (porcentagem da área foliar infectada). O aprendizado obtido pode ser ajustado – retreinado e/ou combinado ao aprendizado anterior – sobre outras imagens representativas e aplicado no restante das imagens de forma automatizada. As severidades previstas para as imagens podem, então, ser comparadas com aquelas obtidas pelo uso de escalas de notas ou outros métodos de mensuração da doença (SUN et al., 2014) ou comparadas com valores reais (segmentados manualmente) por meio de validações cruzadas (SOMMER et al., 2011), por exemplo. Uma excelente revisão das diferenças entre métodos de avaliação de doenças, sejam eles visuais ou digitais, bem como a descrição de ferramentas estatísticas comuns nesta área pode ser encontrada em BOCK et al. (2010).

Dado o potencial do processamento de imagens via *machine learning* como abordagem fenotípica para extrair informações de forma mais precisa, este estudo teve como objetivo desenvolver uma metodologia para segmentação de imagens de folhas com os sintomas da mancha bacteriana do tomateiro. Com esta abordagem, buscou-se quantificar, com a maior precisão possível, o percentual de área afetada com a doença, para fins de análise em larga escala demandada para estudos de associação genômica.

## 3.2. Material e Métodos

### 3.2.1. Local e época de condução do experimento

O experimento de fenotipagem foi realizado em três casas de vegetação do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da ESALQ/USP, localizado no município de Piracicaba-SP, entre setembro e outubro de 2018. Os valores médios das variáveis ambientais do período de condução deste experimento (dia da inoculação ao último dia de obtenção de fotos) estão resumidas na Tabela 8, conforme registrado na base de dados da Estação Meteorológica Automática da Área de Física e Meteorologia da ESALQ/USP (Série de Dados Climatológicos do Campus "Luiz de Queiroz" de Piracicaba-SP, 2020). De forma geral, as condições de umidade e temperatura no período de realização do experimento foram adequadas para a infecção e estabelecimento das bactérias.

**Tabela 8.** Valores médios estimados de temperatura média (T MÉD), temperatura máxima (T MÁX), temperatura mínima (T MÍN) e umidade relativa do ar (UR) referentes ao período de inoculação a avaliação da mancha bacteriana no experimento. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2018.

Mês/Ano	T MÉD (°C)	T MÁX (°C)	T MÍN (°C)	UR (%)
Set-Out/2018	23,5	29,4	17,5	76,0

\*Série de Dados climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba-SP. Departamento de Engenharia de Biosistemas. ESALQ/USP, 2020.

### 3.2.2. Material vegetal e bacteriano, inoculação e condução dos experimentos

Ao todo, 245 acessos do Banco Ativo de Germoplasma do Departamento de Genética da ESALQ/USP foram utilizados no experimento, de onde foi selecionado um subconjunto de 20 acessos com diferentes níveis de reação à mancha bacteriana. O isolado de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* utilizado para induzir sintomas neste experimento foi o 13A. Este isolado foi selecionado com base nos resultados obtidos nos experimentos do Capítulo 1, identificado como o mais

agressivo e satisfatoriamente estável na indução de sintomas de mancha bacteriana em genótipos de tomateiro. O preparo do inóculo, inoculação, pré-condicionamento de mudas e aspectos gerais de condução dos experimentos foram executados conforme descrito no Capítulo 1. As mudas foram inoculadas aos 25 dias após a semeadura.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com três repetições. Cada parcela foi composta por um vaso de 3L com quatro plantas. Aos 18 dias após a inoculação, foram coletadas as duas folhas mais sintomáticas de cada planta, compreendidas entre a segunda e a quinta folha expandida, colocadas sobre uma superfície branca e fotografadas utilizando uma câmera digital Nikon Coolpix P510. As imagens foram captadas sempre sob a mesma altura, mantendo a mesma escala ao longo de todo o processo. Também foram atribuídas notas para as imagens obtidas, utilizando a escala de Horsfall & Barratt (1945) (HB), que varia de 1 a 12 [avaliação visual do percentual de área afetada com sintomas (S-HB): 1 = 0%, 2 = 0-3%, 3 = 3-6%, 4 = 6-12%, 5 = 12-25%, 6 = 25-50%, 7 = 50-75%, 8 = 75-87%, 9 = 87-94%, 10 = 94-97%, 11 = 97-100%, 12 = 100%], para mensurar área afetada com sintomas.

### 3.2.3. Análise de imagens

Um subconjunto de 466 imagens dos 20 genótipos selecionados foi submetido a análises no software gratuito e de código aberto Fiji/ImageJ (IJ) (SCHINDELIN et al., 2012). Assim, cada genótipo foi representado por até 24 imagens de folhas (3 blocos x 4 plantas x 2 folhas). A relação dos genótipos e respectivas médias de notas S-HB atribuídas às imagens estão detalhados na Tabela 9.

As imagens foram submetidas a um processamento nos plugins *Trainable Weka Segmentation* (TWS) v.3.2.29 (ARGANDA-CARRERAS et al., 2017) e *Color Pixel Counter* (CPC) (PICHETTE, 2010), conforme ilustrado na Figura 5. O processo de aprendizado no TWS consistiu em fazer seleções (anotações) em diferentes pontos de uma determinada imagem de entrada (Figura 5A) utilizando ferramentas de processamento de imagens do IJ, classificando-os como pertencentes ao fundo da imagem (FI), ao tecido sadio da folha (TS) ou ao tecido doente (TD, ou seja, sobre os sintomas da mancha bacteriana (Figura 5B).

Comparou-se a eficiência do treinamento de classificação de pixels a partir de uma até dez imagens de entrada (métodos N1 até N10): DSCN17989, DSCN1896, DSCN1900, DSCN1995, DSCN2074, DSCN9155, DSCN9921, DSCN9507, DSCN9512 e DSCN9151. Estas apresentavam padrões distintos, porém representativos da severidade da mancha bacteriana, sendo que o treinamento realizado na segunda imagem incluía também a informação do treinamento feito para

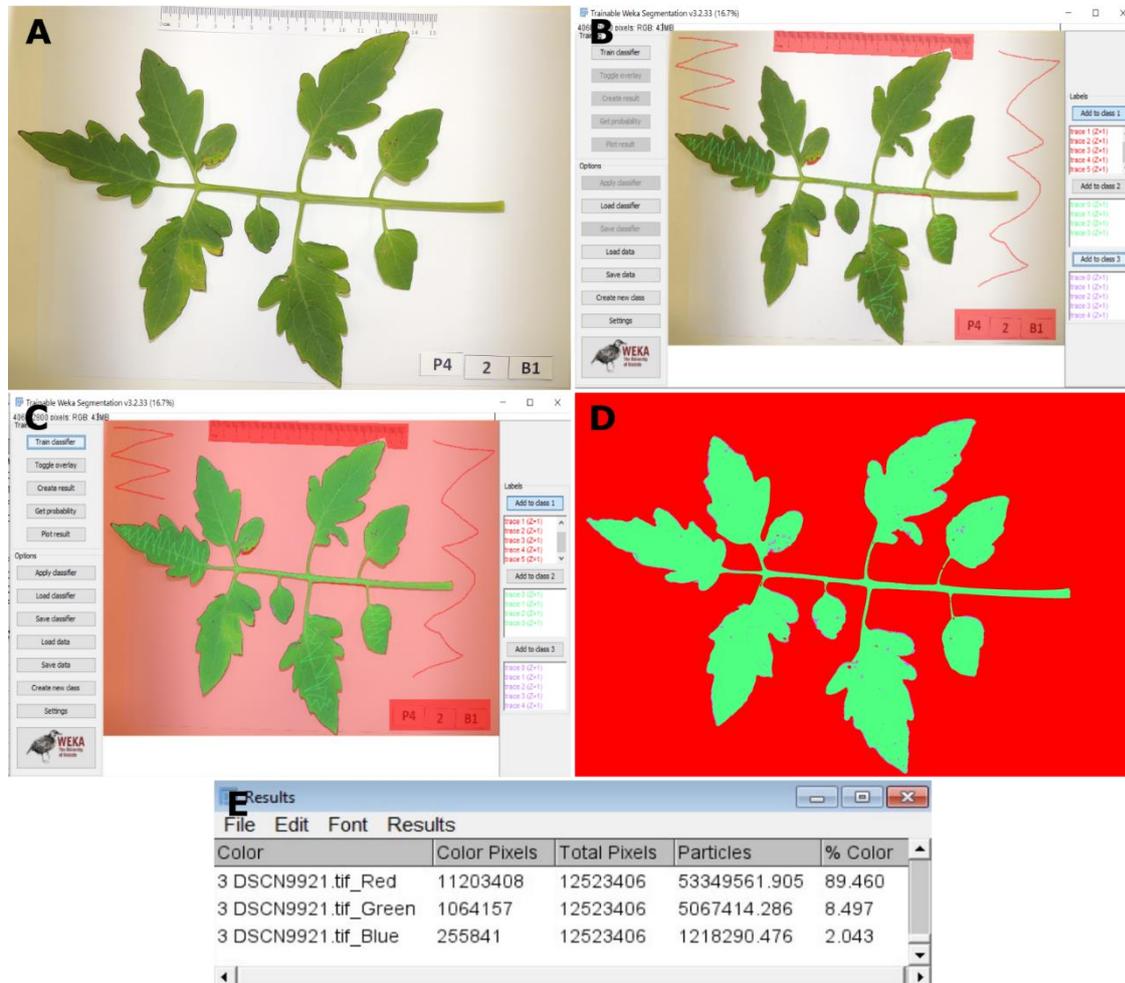
a primeira imagem, a terceira incluía a informação do primeiro e segundo treinamentos, e assim por diante. A classificação dos pixels foi feita utilizando três algoritmos de *machine learning* disponíveis no TWS, *Hessian* (H), *Membrane Projections* (Mp) e *Sobel Filter* (Sf). Estes permitem a inferência da segmentação de classes desejada (Figura 5C) e a compilação do aprendizado obtido em um arquivo “classificador”, o qual pôde ser aplicado em um número maior de imagens, utilizando a ferramenta *batch* disponível no software.

**Tabela 9.** Relação dos genótipos de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) utilizados no estudo das metodologias de análise de imagens e notas de severidade médias obtidas pela escala de Horsfall & Barratt (1945) (S-HB), atribuídas às imagens. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2018.

Código do genótipo	Acesso USP	Acesso/Cultivar	S-HB
1	USP001	Olena Ukrainien	3,83
2	USP002	Pusa Ruby	2,96
10	USP009	Yoshimatsu-L3	3,04
16	USP015	Indigo Rose	3,33
22	USP021	Géante D´Orenburg	3,54
30	USP028	Olirose de St Domingue	4,54
32	USP030	IPA-6	4,92
43	USP042	LA2706/Moneymaker	3,13
48	USP047	LA1664	6,13
53	USP052	LA2644	1,88
75	USP082	CNPH0527	2,41
78	USP085	CNPH0616	2,88
93	USP100	CNPH1137	2,08
94	USP101	CNPH1218	2,21
95	USP102	CNPH1200	3,79
97	USP104	CNPH0528	3,33
133	USP139	Podland Pink	4,33
149	USP157	PNZ009AG45 (Ohio 8245)	4,38
151	USP158B	PNZ102/Rotam-4	2,79
199	GT0135	Santa Cruz Kada	2,08

Cada treinamento foi feito utilizando-se uma média de quatro anotações por classe da imagem (FI, TS e TD), não ultrapassando 15 seleções totais para cada imagem. Tanto a escolha da combinação dos algoritmos quanto o número de seleções por classe e totais foram determinados após análises minuciosas destes atributos (dados não apresentados). As imagens geradas pelo TWS tiveram seus pixels classificados em três cores, facilitando a mensuração da severidade da doença (Figura 5D). A quantificação do número de pixels de cada cor/classe foi feita no plugin CPC, o qual também pôde ser aplicado para diversas imagens (função *batch*) (Figura 5E). Por fim, o percentual de área foliar com sintomas [S-AI (%): Severidade determinada pela análise de imagens] foi calculado por meio da seguinte fórmula:

$$S_{AI} (\%) = \frac{\text{Área com sintomas}}{\text{Área total da folha}} \times 100 = \frac{\text{Número de pixels lilás}}{\text{Número de pixels (lilás + verdes)}} \times 100$$



**Figura 5.** Pipeline de processamento de imagens. A) Imagem de entrada; B) Imagem carregada no plugin *Trainable Weka Segmentation* (TWS) (Fiji/ImageJ Software). Seleções (anotações) são feitas para classificar porções da imagem como pertencentes ao i) fundo, ii) tecido sadio ou iii) tecido doente; C) A classificação dos pixels é feita utilizando combinações de algoritmos de *machine learning* disponíveis no TWS e aplicada ao total de imagens; D) Imagens resultantes com pixels classificados em três cores: fundo (vermelho), tecido sadio (verde) e tecido doente (lilás); E) Quantificação de pixels vermelhos, verdes e lilás no plugin *Color Pixel Counter*.

Todas as demais configurações foram mantidas conforme o padrão do TWS/IJ. O classificador padrão é uma versão otimizada do algoritmo *Random Forest* (BREIMAN, 2001), denominada *FastRandomForest* (ARGANDA-CARRERAS, 2020; FRANK; HALL; WITTEN, 2016). Além disso, também se comparou o tempo computacional demandado por cada método. As análises foram realizadas em um computador Dell G7 15, memória RAM de 16GB e processador 2.20GHz Intel® Core™ i7.

### 3.2.4. Determinação do melhor modelo para análise de imagens

O critério utilizado para definir qual o melhor modelo de análise de imagens para a determinação da área afetada com sintomas de mancha bacteriana (S-AI) foi a herdabilidade desta, bem como a correlação da S-AI com as notas atribuídas às imagens por meio da escala de notas de Horsfall & Barratt (1945) (S-HB). Cada conjunto de dados obtidos, para cada um dos dez treinamentos sequenciais, foi analisado conforme o seguinte modelo, a partir do qual foram obtidas as estimativas das variâncias genéticas e ambientais, de acordo com os dados de fenótipo S-AI:

$$y_{ij} = \mu + g_i + b_j + \varepsilon_{ij}$$

Em que:

$y_{ij}$  é o valor da observação referente ao genótipo  $i$  no bloco  $j$ ;

$\mu$  é a média geral;

$g_i$  é o efeito aleatório do genótipo  $i$ ;

$b_j$  é o efeito fixo do bloco  $j$ ;

$\varepsilon_{ij}$  é o efeito aleatório do erro experimental do genótipo  $i$  no bloco  $j$ , assumindo-se que os erros são independentes e normalmente distribuídos com média zero e variância  $\sigma^2$ .

As herdabilidades foram estimadas pela seguinte fórmula:

$$h^2 = \frac{\hat{\sigma}_G}{\hat{\sigma}_G + \frac{\hat{\sigma}_E}{r}}$$

Em que:

$h^2$  é a herdabilidade no sentido amplo;

$\hat{\sigma}_G$  é a estimativa da variância genética;

$\hat{\sigma}_E$  é a estimativa da variância ambiental;

$r$  é o número de repetições.

Por fim, as correlações de Pearson ( $r_{S-AI; S-HB}$ ) foram calculadas ao nível de média de parcela, a qual foi composta por 8 imagens (4 plantas x 2 folhas). As estimativas das herdabilidades

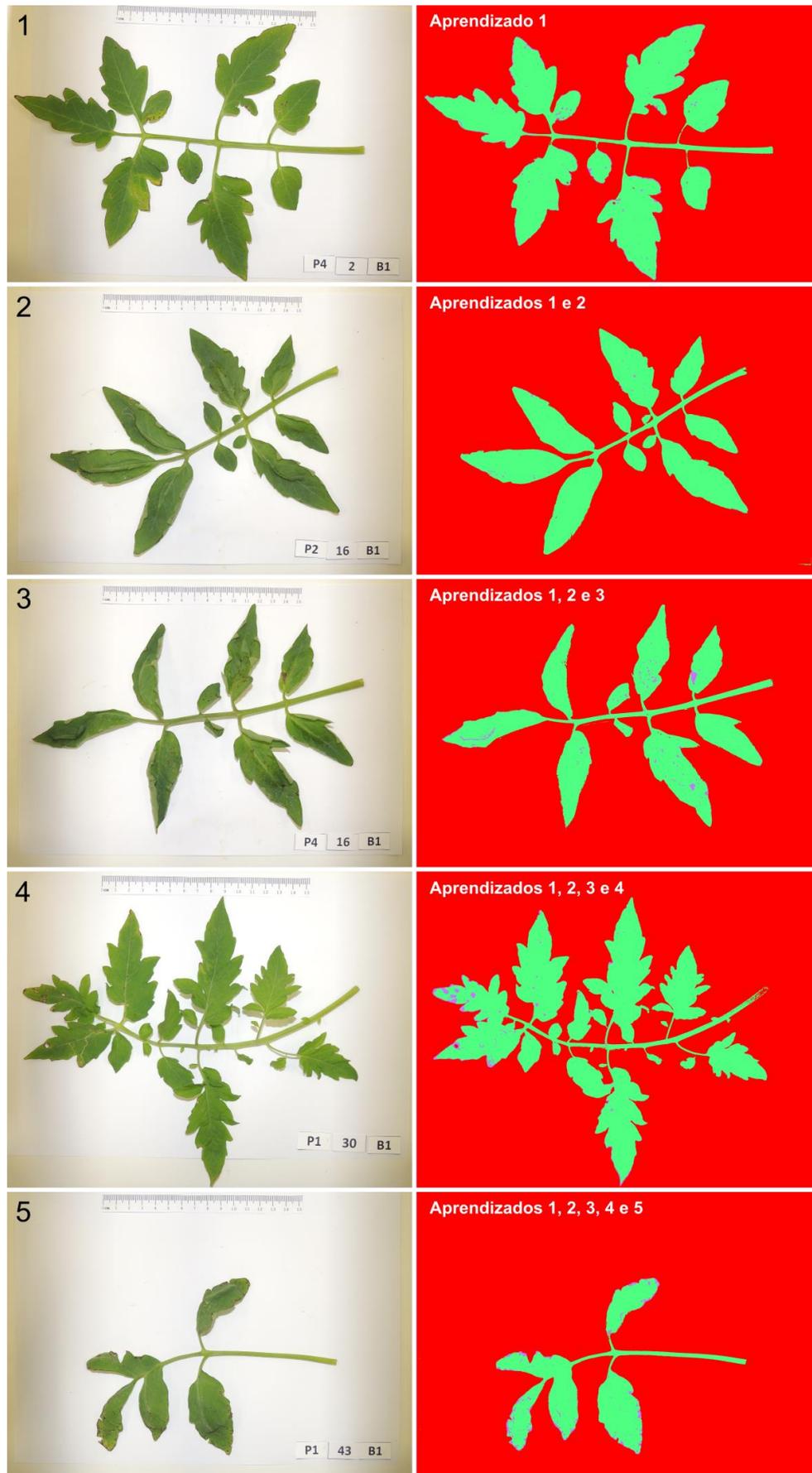
e das correlações foram realizadas no software R v.3.6.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020).

### 3.3. Resultados e Discussão

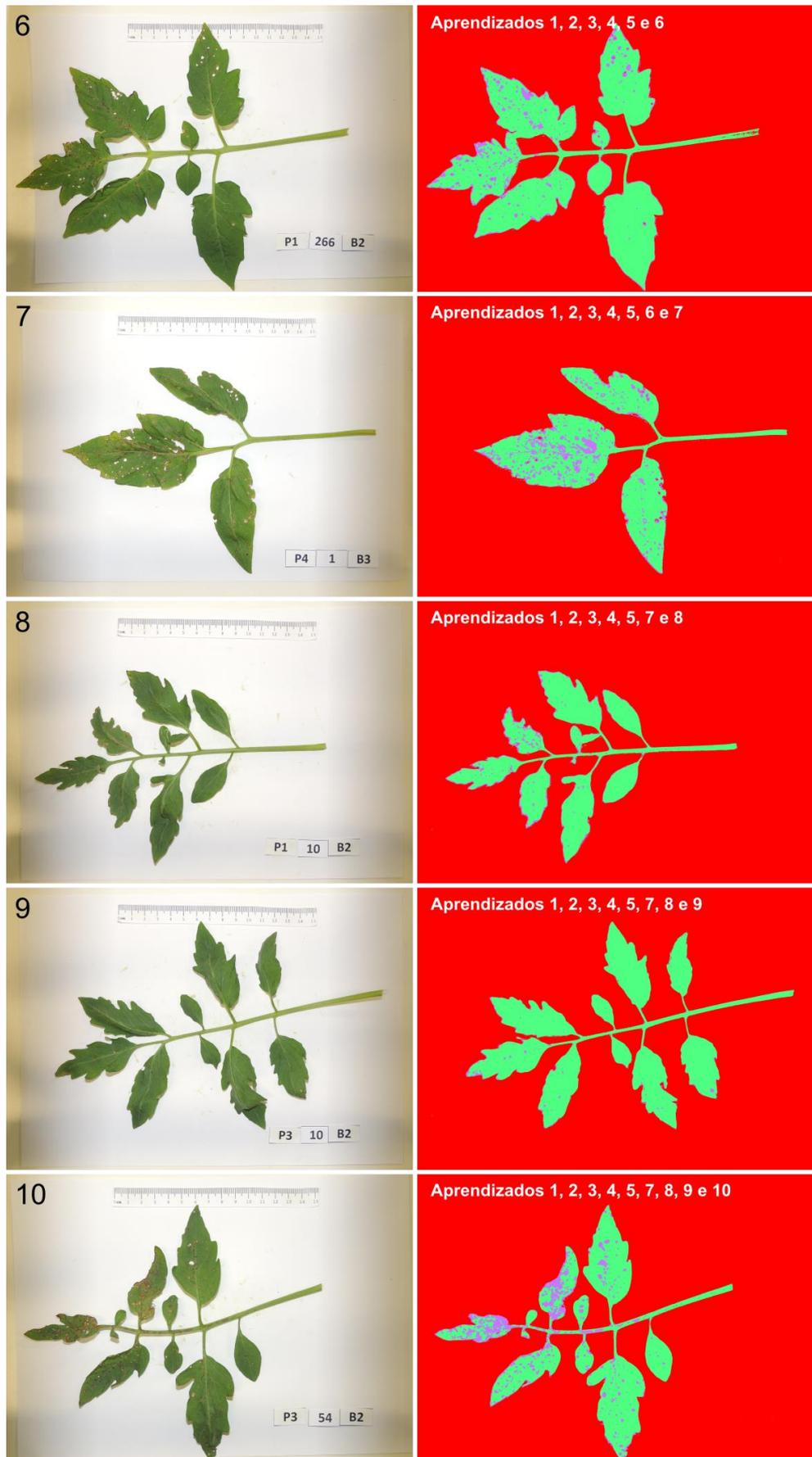
As Figuras 6 e 7 ilustram as dez imagens usadas como entrada para os dez aprendizados acumulados realizados no TWS e respectivas imagens classificadas. Ressalta-se que neste conjunto de treinamento buscou-se contemplar padrões que poderiam impactar a aplicação dos aprendizados no restante das imagens, tais como diferentes sintomas da mancha bacteriana (presença ou ausência de perfurações), contrastes com nervuras, dobras e curvaturas das folhas, sombras e tonalidades de verde. Estes são os fatores que podem causar maiores confundimentos nas classificações realizadas.

A manipulação de sombras em imagens, por exemplo, é um tópico específico dentro do ramo da visão computacional (SANIN; SANDERSON; LOVELL, 2012), sendo que Rousseau et al. (2015) alertam que evitar este tipo de ruído na captura de imagens simplifica muito o processamento das mesmas. De fato, a penumbra entre folha e fundo da imagem continha pixels cujas cores se assemelhavam aos dos sintomas da mancha bacteriana, prejudicando a classificação. Uma forma de tentar contornar esse problema seria usar uma vidraça sobre as folhas, tornando-as mais planas (WOLFE; TONSOR, 2014), escaneá-las com um equipamento específico (O'NEAL; LANDIS; ISAACS, 2002; SUN et al., 2014) ou realizar um melhor ajuste nos componentes de iluminação (HARTMANN et al., 2011). Com relação à coloração das folhas do tomateiro, SUN et al. (2014) também obtiveram discrepâncias na avaliação da severidade da mancha bacteriana ante a variação desta característica e verificaram, ainda, que a análise da severidade de uma folha por imagem era a melhor abordagem.

As herdabilidades ( $h^2$ ) estimadas a partir das análises de imagens oriundas de cada método computacional de avaliação de sintomas, bem como as correlações entre os percentuais de área com sintomas e avaliação por meio de notas da escala HB ( $r_{S-AI,S-HB}$ ) estão compilados na Tabela 10, ranqueados de acordo com o método que proporcionou maior herdabilidade à menor herdabilidade. Embora fossem possíveis inúmeras combinações e ordens de imagens de entrada a serem treinadas, o incremento do aprendizado com o aumento do número de imagens treinadas na ordem pré-determinada foi nítido, como observa-se por estas duas relevantes métricas ( $h^2$  e  $r_{S-AI,S-HB}$ ) obtidas pelos diferentes números de treinamentos.



**Figura 6.** Imagens de entrada (1 a 5) e imagens classificadas para detecção da mancha bacteriana no plugin *Trainable Weka Segmentation* do Software Fiji/ImageJ por meio dos aprendizados acumulados 1 a 5.



**Figura 7.** Imagens de entrada (6 a 10) e imagens classificadas para detecção da mancha bacteriana no plugin *Trainable Weka Segmentation* do Software Fiji/ImageJ por meio dos aprendizados acumulados 6 a 10.

Os valores de herdabilidade variaram de 0,68 (N1 - uso de uma única imagem de entrada) a 0,78 (N10 - uso de dez imagens de entrada, cada uma treinada de diferentes formas e usando os aprendizados anteriores), notando-se um aumento significativo ( $P < 0,01$ ) conforme o aumento no número de aprendizados. Entretanto, não foram observados incrementos expressivos na  $h^2$  após o quarto aprendizado (N4) indicando que o treinamento com quatro imagens já poderia ser suficiente para o bom desempenho da classificação de pixels. As correlações entre métodos de fenotipagem ( $r_{S-AI; S-HB}$ ) obtidas pelos diferentes treinamentos foram significativas para todas as comparações (Tabela 10).

O tempo computacional demandado para o processamento de imagens também foi significativamente superior ( $P < 0,01$ ) com o aumento do número de imagens de entrada utilizadas, de modo que o uso de muitas imagens pode tornar o processo ineficiente. A fim de lidar com conjuntos maiores de imagens de entrada de forma mais otimizada que no TWS/IJ, O'MARA et al. (2017) apresentam um outro plugin do IJ, *ImageSURF*, o qual apropria-se de um processo iterativo *offline* de anotação de classes, treinamento e validação, além de algoritmos e estruturas de dados com requisitos de processamento e armazenamento reduzidos. Todavia, este plugin não apresenta a mesma flexibilidade e funcionalidade do TWS/IJ, justamente por não ser compatível com a grande gama de classificadores e ferramentas de análise do WEKA.

**Tabela 10.** Resumo dos resultados dos métodos de mensuração da severidade da mancha bacteriana usando análise de imagens (S-AI): tempo computacional (TC), herdabilidade ( $h^2$ ) e correlação ( $r$ ) com notas de severidade baseadas na escala de Horsfall & Barratt (1945) (S-HB). Métodos classificados do menor número de imagens de entrada treinadas (N1) ao maior (N10). Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2020.

Método	Imagem de entrada	TC <sup>1</sup>	$h^2$	$r_{S-HB; S-AI}$
N1	DSCN1789	4,39	0,68	0,82
N2	DSCN1896	4,54	0,65	0,82
N3	DSCN1900	4,91	0,70	0,87
N4	DSCN1995	5,12	0,75	0,89
N5	DSCN2074	4,95	0,75	0,89
N6	DSCN9155	5,45	0,76	0,87
N7	DSCN9921	5,94	0,77	0,87
N8	DSCN9507	6,23	0,77	0,88
N9	DSCN9512	6,27	0,78	0,90
N10	DSCN9151	6,54	0,78	0,91

<sup>1</sup>Tempo por imagem (média em minutos)

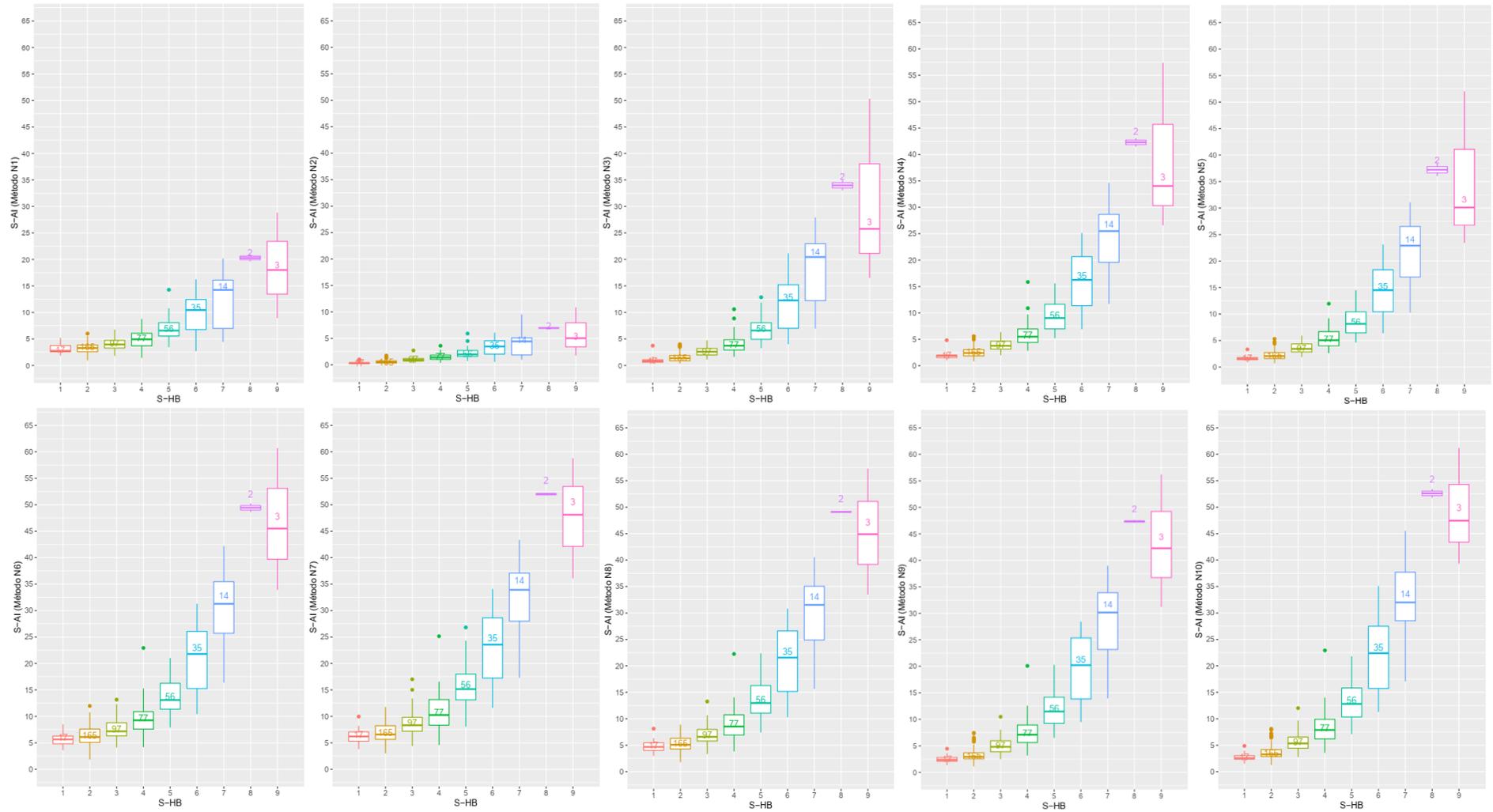
Diferentes autores têm usado o plugin TWS/IJ na detecção de regiões de interesse em diversas áreas de estudos, tais como ciências arqueológicas e evolucionárias (O'MAHONEY et al., 2020), médicas (BIANCHETTI et al., 2020; SIKPA et al., 2019; SOMASUNDARAM et al., 2018), e também na agricultura (CUNEO et al., 2020; SCOTT et al., 2020). SCOTT et al. (2020), por

exemplo, ao avaliarem danos de cigarrinha em folhas de *Camellia sinensis* por meio do TWS/IJ usaram, de forma iterativa, um subconjunto de 30 folhas para treinar o classificador, testaram o resultado em um conjunto-teste de dez imagens e obtiveram uma alta acurácia na detecção dos danos.

Na Figura 8, é possível observar *boxplots* representando a variação no percentual de S-AI para cada nota da escala de Horsfall & Barratt (1945) atribuída às 466 imagens, para cada um dos métodos de análise de imagens testados. Uma nítida melhora na discriminação da severidade entre as categorias é observada a partir do uso de três imagens de entrada (método N3), porém, pequenos refinamentos nos valores de S-AI ainda foram obtidos com o uso de mais imagens treinadas posteriormente.

A associação entre a mensuração de sintomas obtidos pelos diferentes métodos de análise de imagens com a atribuição de notas S-HB para as mesmas imagens foi positiva e exponencial, com um padrão similar ao obtido por Sun et al. (2014) ao analisar imagens de folhas contendo sintomas de mancha bacteriana, também comparando resultados de uma análise de imagens com notas da escala de HB. No conjunto de imagens testados aqui, as notas S-HB atribuídas variaram de um a nove, o que corresponde a uma amplitude de 0% a 87-94% de sintomas (HORSFALL; BARRATT, 1945). Contudo, é interessante observar que a S-AI variou de 0,09% a 61,17%. Já em níveis médios, S-HB variou de 1,88 a 6,13, enquanto que S-AI variou de 0,47% a 27,82% ao longo dos métodos, mostrando que notas de escalas podem divergir drasticamente dos valores de áreas sintomáticas indicados pela análise de imagens, uma vez que a escala de notas reflete um intervalo de valores. Além disso, a subjetividade da avaliação visual leva a uma variação entre avaliadores, o que pode interferir na estimativa do efeito dos alelos em estudos genômicos, como destacado por Poland & Nelson (2011).

Na Figura 8, é possível verificar, também, que grande parte das imagens (72,75%) foi classificada entre as notas dois (0-3%) e quatro (6-12%), o que é comum em experimentos de avaliação precoce (SOMODI et al., 1994). Esta variação, contudo, foi quantitativamente distribuída entre 1,25% a 22,92% para S-AI, no caso do método N10, por exemplo, o que aumentou a capacidade discriminatória entre genótipos. Esta capacidade deve ser ainda maior sob médios a altos níveis de severidade da mancha bacteriana, visto que uma maior amplitude de valores foi obtida para notas S-HB acima de cinco (Figura 8).



**Figura 8.** Relação entre o valor de severidade média detectado pelos métodos de análise de imagens do *Trainable Weka Segmentation* do Software Fiji/ImageJ (S-AI) e as estimativas visuais dadas às imagens usando a escala de notas de Horsfall & Barratt (1945) (S-HB) para 466 imagens provenientes de 20 genótipos com diferentes níveis de severidade. Valores dentro dos *boxplots* referem-se ao número de imagens para cada categoria de S-HB.

Acredita-se que, ao fazer uma avaliação visual, o olho humano é capaz de avaliar tecidos sintomáticos para áreas foliares de até 50%, e tecidos sadios apenas abaixo de 50%, de forma que são esperadas as maiores variações em torno de 50% de área foliar doente (PARKER; SHAW; ROYLE, 1995). De fato, embora poucas imagens tenham apresentado severidade neste patamar, no caso do método N10, 14 imagens com S-AI entre 17,05% e 45,54% receberam nota sete (HB: 50-75%), duas imagens com S-AI de 51,78% e 53,42% receberam nota oito (HB: 75-87%) e três imagens com S-AI de 39,33%, 47,44% e 61,17% receberam nota nove (HB: 87-94%). Já em comparação semelhante realizada por Sun et al. (2014) com análise de folíolos no Software Assess v.2.2, níveis de severidade obtidos pelo programa foram superiores aos obtidos pela escala de HB, ou seja, a escala categórica não detectou altas severidades tão bem quanto o indicado pelo software de imagens. Contudo, estas maiores discordâncias ocorreram, também, nas faixas em que a escala de HB possui intervalos mais amplos.

As divergências entre métodos apontam para uma necessidade de mais estudos visando à melhoria de como a mensuração da severidade desta doença é feita. Eles devem envolver, no entanto, avaliações com notas atribuídas às plantas – como pesquisas anteriores e programas de melhoramento costumam proceder – e, especialmente, envolvendo uma maior amplitude dos níveis de severidade, aproximando-se das condições de campo.

Adicionalmente, O'MARA et al. (2017) destacam a grande subjetividade na escolha de parâmetros ao utilizar segmentação de imagens em pesquisa e consequentes dificuldades na reprodutibilidade e comparação entre estudos. Por essa razão, o treinamento de um conjunto de imagens de entrada e a definição de parâmetros de análise é muito importante, pois isso deve ditar o sucesso na classificação do conjunto inteiro que, no caso dos experimentos realizados para a finalidade desta tese, compuseram um total de 13.496 imagens. Devido ao grande número de genótipos e consequente grande diversidade no tamanho e tonalidade do verde das folhas, nos sintomas de doença, presença ou ausência de dobras e outras variações, buscou-se incluir imagens mais representativas possíveis dos sintomas da mancha bacteriana. Os resultados obtidos com o treinamento de dez imagens revelaram medidas comparáveis e mais precisas que as oferecidas por notas da escala HB. Por esta razão, considera-se que o método N10 é o mais adequado para realizar a fenotipagem de um número elevado de imagens, para fins de estudos de associação genômica e estimativa de parâmetros genéticos.

### 3.4. Conclusões

As análises de métodos de mensuração da severidade à mancha bacteriana baseados em imagens no plugin *Trainable Weka Segmentation* do Software Fiji/ImageJ (TWS/IJ) revelaram que, quanto mais imagens de entrada são treinadas para a classificação das categorias de interesse, maior é a  $h^2$  obtida para a resistência à mancha bacteriana, bem como maiores são as correlações com as notas da escala de Horsfall & Barratt (1945). Contudo, o tempo computacional também é maior, de forma que todos estes fatores devam ser considerados em conjunto para uma boa eficiência no processamento. De forma complementar, a análise de imagens mostrou ser uma boa ferramenta de fenotipagem para mensurar os percentuais de área foliar com sintomas de mancha bacteriana em tomateiro. Por estas razões, optou-se por usar o método N10 em estudos genéticos subsequentes, os quais envolveram a fenotipagem e genotipagem em larga escala para a resistência à mancha bacteriana.

### Referências

- ARAUS, J. L. et al. Translating High-Throughput Phenotyping into Genetic Gain. **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 5, p. 451–466, 2018.
- ARAUS, J. L.; CAIRNS, J. E. Field high-throughput phenotyping: The new crop breeding frontier. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 1, p. 52–61, 2014.
- ARGANDA-CARRERAS, I. et al. Trainable Weka Segmentation: A machine learning tool for microscopy pixel classification. **Bioinformatics**, v. 33, n. 15, p. 2424–2426, 2017.
- ARGANDA-CARRERAS, I. **Trainable Weka Segmentation - ImageJ**. Disponível em: <[https://imagej.net/Trainable\\_Segmentation](https://imagej.net/Trainable_Segmentation)>. Acesso em: 9 maio. 2020.
- BAKR, E. M. A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. **Journal of Applied Entomology**, v. 129, n. 3, p. 173–175, 2005.
- BARBEDO, J. G. A. A review on the main challenges in automatic plant disease identification based on visible range images. **Biosystems Engineering**, v. 144, p. 52–60, 2016.
- BIANCHETTI, G. et al. Machine-learning assisted confocal imaging of intracellular sites of triglycerides and cholesteryl esters formation and storage. **Analytica Chimica Acta**, v. 1121, p. 57–66, 2020.
- 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, 2009.
- 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.
- BREIMAN, L. Random forests. **Machine Learning**, v. 45, n. 1, p. 5–32, 2001.
- BYLESJÖ, M. et al. LAMINA: A tool for rapid quantification of leaf size and shape parameters. **BMC Plant Biology**, v. 8, p. 1–9, 2008.
- COBB, J. 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.
- CUNEO, I. F. et al. Differences in grapevine rootstock sensitivity and recovery from drought are linked to fine root cortical lacunae and root tip function. **New Phytologist**, 2020.
- DELTA T DEVICES LTDA. **WinDIAS Leaf Image Analysis System**, 2020. Disponível em: <<https://www.delta-t.co.uk/product/wd3/>>. Acesso em: 10 set. 2020.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to Quantitative Genetics**. 4<sup>th</sup> ed. Longman Group Ltda, 1996.
- 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.
- FRANK, E.; HALL, M. A.; WITTEN, I. H. **The WEKA Workbench. Online Appendix for Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques**. 4<sup>a</sup> ed., Morgan Kaufmann, 2016.
- GREEN, J. M. et al. PhenoPhyte: A flexible affordable method to quantify 2D phenotypes from imagery. **Plant Methods**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2012.
- HALL, M. et al. The WEKA data mining software: an update. **ACM SIGKDD Explorations Newsletter**, v. 11, n. 4, p. 10–18, 2009.
- HARTMANN, A. et al. HTPPheno: An image analysis pipeline for high-throughput plant phenotyping. **BMC Bioinformatics**, v. 12, 2011.
- HORSFALL, J. G.; BARRATT, R. W. An improved grading system for measuring plant diseases. **Phytopathology**, v. 35, p. 655, 1945.
- HOULE, D.; GOVINDARAJU, D. R.; OMHOLT, S. Phenomics: The next challenge. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 12, p. 855–866, 2010.
- KELLY, D. et al. An opinion on imaging challenges in phenotyping field crops. **Machine Vision and Applications**, v. 27, n. 5, p. 681–694, 2016.

- LAMARI, L. **ASSESS 2.0: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification**. St. Paul, MN, 2008.
- LEE, U. et al. An automated, high-throughput plant phenotyping system using machine learning-based plant segmentation and image analysis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–17, 2018.
- MACHADO, B. B. et al. BioLeaf: A professional mobile application to measure foliar damage caused by insect herbivory. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 129, p. 44–55, 2016.
- MARKS, M. Bacterial spot of tomato. **University of Wisconsin Garden Facts**. Madison, WI: Disponível em: <[https://hort.extension.wisc.edu/files/2017/03/Bacterial\\_Spot\\_of\\_Tomato.pdf](https://hort.extension.wisc.edu/files/2017/03/Bacterial_Spot_of_Tomato.pdf)>. Acesso em 23 Nov 2020.
- NUTTER, F. W.; ESKER, P. 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.
- O'MAHONEY, T. et al. A machine learning based approach to the segmentation of micro CT data in archaeological and evolutionary sciences. **bioRxiv**, 859983 (preprint), 2020.
- O'MARA, A. et al. ImageSURF: An ImageJ Plugin for Batch Pixel-Based Image Segmentation Using Random Forests. **Journal of Open Research Software**, v. 5, p. 5–11, 2017.
- O'NEAL, M. E.; LANDIS, D. A.; ISAACS, R. An inexpensive, accurate method for measuring leaf area and defoliation through digital image analysis. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n. 6, p. 1190–1194, 2002.
- 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.
- PEAT. - Progressive Environmental & Agricultural Technologies. **Plantix: A Mobile Application for Agriculture Sector**, 2020. Disponível em: <<https://www.plantix.net/>>. Acesso em: 9 ago. 2020.
- PETHYBRIDGE, S. J.; NELSON, S. C. Estimate, a new iPad application for assessment of plant disease severity using photographic standard area diagrams. **Plant Disease**, v. 102, n. 2, p. 276–281, 2018.
- PICHETTE, B. **Color Pixel Counter**. Disponível em: <[https://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:color:color\\_pixel\\_counter:start#download](https://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:color:color_pixel_counter:start#download)>.
- POLAND, J. A.; NELSON, R. J. In the eye of the beholder: The effect of rater variability and different rating scales on QTL mapping. **Phytopathology**, v. 101, n. 2, p. 290–298, 2011.
- QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A. Mancha bacteriana: uma atualização para o Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria. **Circular Técnica Embrapa**, v. 84, p. 23, 2010.

- R DEVELOPMENT CORE TEAM. A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em 23 nov. 2020.
- ROUSSEAU, C. et al. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. **Plant Methods**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2013.
- ROUSSEAU, D.; DEE, H.; PRIDMORE, T. Imaging methods for phenotyping of plant traits. In: KUMAR, J.; PRATAP, A.; KUMAR, S. (Eds.). **Phenomics in Crop Plants: Trends, Options and Limitations**. New Delhi: Springer, 2015. p. 61–74.
- SANIN, A.; SANDERSON, C.; LOVELL, B. C. Shadow detection: A survey and comparative evaluation of recent methods. **Pattern Recognition**, v. 45, n. 4, p. 1684–1695, 2012.
- SCHINDELIN, J. et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012.
- SCOTT, E. R. et al. Changes in Tea Plant Secondary Metabolite Profiles as a Function of Leafhopper Density and Damage. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. 636, p. 1–15, 2020.
- Série de Dados Climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba, SP.** Departamento de Engenharia de Biosistemas. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, LEB - ESALQ - USP. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/leb/postocon.html>>. Acesso em: 23 nov. 2020.
- SIKPA, D. et al. Automated detection and quantification of breast cancer brain metastases in an animal model using democratized machine learning tools. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.
- SINGH, A. et al. Machine Learning for High-Throughput Stress Phenotyping in Plants. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 2, p. 110–124, 2016.
- SOMASUNDARAM, E. et al. Fully Automated Tissue Classifier for Contrast-enhanced CT Scans of Adult and Pediatric Patients. **Physics in Medicine and Biology**, v. 63, n. 13, p. 1–31, 2018.
- SOMMER, C. et al. **Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit**. 2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, Chicago, IL, p. 230–233, 2011.
- SOMODI, G. C. et al. Screening tomato seedlings for resistance to bacterial spot. **HortScience**, v. 29, n. 6, p. 680–682, 1994.
- SUN, H. 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.

- TSAFTARIS, S. A.; MINERVINI, M.; SCHARR, H. Machine Learning for Plant Phenotyping Needs Image Processing. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 12, p. 989–991, 2016.
- VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. **QUANT. A software plant disease severity assessment**. 8<sup>th</sup> International Workshop on Plant Disease Epidemiology: “Understanding Epidemics for Better Disease Management”. **Anais...**2001
- WOLFE, M. D.; TONSOR, S. J. Adaptation to spring heat and drought in northeastern Spanish *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 201, n. 1, p. 323–334, 2014.



## 4. ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA PARA RESISTÊNCIA À MANCHA BACTERIANA EM TOMATEIRO

### RESUMO

O melhoramento para resistência à mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) tem sido desafiador pela sua herança poligênica, presença de componentes não aditivos e emergência de novas raças do patógeno, não havendo cultivares comerciais resistentes à doença no Brasil. Além disso, não há estudos envolvendo genotipagem em larga escala em acessos da cultura do tomateiro no país, sendo estas pesquisas ferramentas valiosas na avaliação de caracteres complexos e aplicações em programas de melhoramento ao redor do mundo. Em vista deste cenário, este trabalho teve como objetivo identificar regiões do genoma do tomateiro relacionadas à resistência à mancha bacteriana por meio de um estudo de associação genômica ampla (GWAS). 251 acessos de tomateiro do Banco de Germoplasma de tomateiro do Departamento de Genética da ESALQ/USP foram inoculadas com *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e avaliadas durante três épocas (E1: setembro-outubro/2018, E2: abril-maio/2019 e E3: outubro-novembro/2019). As avaliações foram realizadas em casas de vegetação em um delineamento em blocos casualizados, com três repetições em E1 e duas repetições em E2 e E3, e parcelas de quatro plantas. A severidade da mancha bacteriana foi estimada após cerca de duas semanas da inoculação, em duas folhas por planta, tanto por meio de análise de imagens, usando metodologia descrita anteriormente, quanto pela escala de Horsfall & Barratt (1945) (HB), sendo estas duas formas de avaliação comparadas no estudo de associação genômica. As linhagens foram genotipadas por meio do *SolCAP Infinium Array*, desenvolvido para tomateiro, e por meio de genotipagem por sequenciamento (GBS). Após o controle de qualidade de SNPs (polimorfismo, *Call Rate*, MAF), 7631 marcadores foram obtidos para comporem a matriz de dados genômicos do estudo de associação genômica. O modelo utilizado foi o *FarmCPU*, implementado no pacote *GAPIT* do Software R, incluindo a estrutura populacional e a matriz de parentesco como covariáveis. Foram identificados 25 SNPs significativos ( $FDR \leq 0,05$ ), sendo 15 usando dados fenotípicos provenientes de análise de imagens e dez usando dados provenientes da escala HB. Dez SNPs foram localizados em regiões genômicas próximas a marcadores e haplótipos relacionados à resistência à doença já reportados na literatura. Considerando as duas fontes de dados fenotípicos, pelo menos um SNP por cromossomo foi encontrado, indicando que a resistência à mancha bacteriana pode ser controlada por diversas regiões do genoma. Este estudo genômico pioneiro no Brasil foi eficiente na detecção de marcadores associados à mancha bacteriana, evidenciando informações que poderão contribuir em futuras pesquisas de melhoramento do tomateiro.

**Palavras-chaves:** GWAS, *Solanum lycopersicum* L., *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, *SolCAP Infinium array*, genotipagem por sequenciamento, SNP.

## ABSTRACT

Plant breeding for bacterial spot resistance (*Xanthomonas* spp.) has been challenging because of its polygenic inheritance, presence of non-additive components and emergence of new pathogen races, with no resistant commercial cultivars in Brazil. In addition, there are no studies involving large-scale genotyping in Brazilian tomato accessions. This kind of research is a valuable tool in the evaluation of complex characters and applications in breeding programs worldwide. Given this scenario, this work aimed to identify regions of the tomato genome related to resistance to bacterial spot through a Genome-Wide Association Study (GWAS). 251 tomato accessions from the tomato germplasm collection from the Department of Genetics of ESALQ/USP were inoculated with *X. euvesicatoria* pv. *perforans* and assessed during three seasons (E1: September-October/2018, E2: April-May/2019 and E3: October-November/ 2019). The experiments were carried out in greenhouses in a randomized block design, with three replications in E1 and two replications in E2 and E3, and plots of four plants. Bacterial spot severity was estimated about two weeks after inoculation, in two leaves per plant. The screening was performed both through image analysis, using the methodology described previously, and through Horsfall & Barratt scale (1945) (HB), and these two forms of evaluation were compared in the genome-wide association study. The inbred lines were genotyped with SNP markers from the SolCAP Infinium array, developed for tomato, and from Genotyping-by-Sequencing (GBS). After the SNP quality control (polymorphism, Call Rate, MAF), 7631 markers were obtained to make up the genomic data matrix for the genome-wide association study. GWAS analyses were performed according to the FarmCPU model, implemented in the GAPIT package of Software R, including the population structure and the kinship matrix as covariates. Twenty-five significant SNPs were identified ( $FDR \leq 0.05$ ), of which 15 using phenotypic data from image analysis and ten using data from the HB scale. Ten SNPs were located in genomic regions close to markers and haplotypes related to disease resistance already reported in the literature. Considering the two sources of phenotypic data, at least one SNP per chromosome was found, indicating that resistance to bacterial spot may be controlled by several genome regions. This pioneering genomic study in Brazil was efficient in detecting markers associated with bacterial spot, unveiling information that may contribute to future research on tomato breeding.

**Keywords:** GWAS; *Solanum lycopersicum* L.; *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, SolCAP Infinium array, genotyping-by-sequencing; SNP.

### 4.1. Introdução

Desde a sua domesticação, o tomateiro sofreu uma intensa seleção genética e fenotípica (BLANCA et al., 2015), o que levou ao estreitamento de sua base genética ao longo do tempo. Com o surgimento de novas enfermidades afetando a cultura, cultivares tradicionais se revelaram muito suscetíveis, demandando novas ferramentas do melhoramento genético para auxiliar na introgressão de mais de 30 genes de resistência (contemplando cerca de dez doenças) a partir de espécies selvagens, desde a década de 1930 (LABATE et al., 2007). No entanto, algumas doenças

bacterianas do tomateiro, tal como a mancha bacteriana, causada por espécies do gênero *Xanthomonas* spp., possuem herança genética complexa e difícil controle, tendo desafiado programas de melhoramento na busca de cultivares mais resistentes, sobretudo diante da diversidade de ambientes de cultivo, sistemas de produção e variantes patogênicas. Sob este cenário, entender a variação genética disponível é essencial para otimizar a utilização dos recursos genéticos disponíveis na espécie (BAUCHET et al., 2017a).

Novas abordagens genômicas, avanços nas tecnologias de sequenciamento e redução de seus custos têm proporcionado um melhor detalhamento da variabilidade genética e oferecido novas formas de se obter cultivares melhoradas. A Associação Genômica Ampla, também conhecida como Mapeamento Associativo ou GWAS (*Genome-wide Association Study*) é uma ferramenta analítica usada para compreender a arquitetura genética de caracteres complexos, sendo amplamente aplicada a diversas espécies de plantas (ZHU et al., 2008). Esta abordagem é baseada na detecção de mutações antigas que foram mantidas na população ao longo do tempo e a associação é atribuída ao desequilíbrio de ligação (DL) entre marcadores e polimorfismos funcionais em um conjunto de genótipos (YU et al., 2006). Desta forma, a técnica permite descobrir QTLs (locos que controlam características quantitativas) e genes de interesse ao melhoramento, por meio da detecção de associações significativas em grandes populações multiparentais. Os estudos de associação genômica possuem vantagens em relação a outras metodologias de mapeamento – tais como mapeamento de QTLs – como, por exemplo, uma maior resolução e número de alelos detectados, um tempo menor necessário para conduzir a pesquisa (SEMAGN; BJØRNSTAD; XU, 2010), sendo muito apropriada em pesquisas envolvendo caracteres complexos (YU; BUCKLER, 2006).

Com um tamanho predito aproximado de 900 Mb e 35000 genes, o primeiro genoma do tomateiro foi sequenciado em 2012 (THE TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012). Este foi um marco histórico para que pesquisadores do mundo todo tivessem milhões de SNPs disponíveis para estudos da espécie, podendo revisitar com detalhes as estruturas, localização e funcionamento de genes gerando, conseqüentemente, inúmeras oportunidades de aplicações destes conhecimentos. Neste sentido, diversos QTLs já foram encontrados para características complexas e de relevância no melhoramento do tomateiro usando abordagens de associação genômica, incluindo componentes qualitativos e quantitativos de frutos (BAUCHET et al., 2017a, 2017b; BAUCHET; CAUSSE, 2012; PHAN et al., 2019; RANC et al., 2012; RUGGIERI et al., 2014; SACCO et al., 2015; ZHANG et al., 2015; ZHAO et al., 2019), crescimento da planta e precocidade (BAUCHET et al., 2017a), resistência à mancha bacteriana (SIM et al., 2015), entre outros.

Embora muitos estudos de associação genômica em tomateiro tenham usado painéis de acessos selvagens pelo seu alto nível de polimorfismo, tem-se demonstrado que tanto associações conhecidas quanto novas podem ser identificadas usando populações de melhoramento complexas, resultantes da seleção direcional (BAUCHET et al., 2017a; SIM et al., 2015). De qualquer forma, é certo que o conhecimento da estrutura populacional e da matriz de parentesco dos painéis de genótipos usados em estudos de associação genômica é essencial no auxílio do controle de associações falso-positivas (BRESEGHELLO; SORRELLS, 2006; SUL; MARTIN; ESKIN, 2018), havendo vários modelos e softwares disponíveis para a manipulação estatística destas covariáveis (HUANG et al., 2018; LI et al., 2014; LIPKA et al., 2012; LIU et al., 2016; SEGURA et al., 2012; TANG et al., 2016; WANG et al., 2014; YU et al., 2006; ZHANG et al., 2010).

O Laboratório de Melhoramento de Hortaliças (LMH) da ESALQ/USP dispõe de um germoplasma de tomateiro com acessos de origens nacionais e internacionais, sendo a maioria composta pela espécie *Solanum lycopersicum* L.. Muitos deles já foram caracterizados fenotipicamente e possuem potencial de uso no melhoramento, mas suas características genômicas não haviam sido exploradas até a realização deste estudo. Inclusive, não existem quaisquer pesquisas prévias no Brasil envolvendo genotipagem em larga escala no tomateiro com o objetivo de detectar associações com caracteres de interesse no melhoramento. Por estas razões, este trabalho pioneiro no país do ponto de vista genômico teve como objetivo realizar um estudo de associação genômica para resistência à mancha bacteriana, utilizando um painel de acessos de tomateiro. Para este fim, foi utilizado um isolado de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* típico de regiões produtoras brasileiras e de comportamento já estudado (capítulo 1), bem como marcadores SNPs provenientes do *SolCAP Infinium Array*, desenvolvido para tomateiro, e de genotipagem por sequenciamento (GBS).

## **4.2. Material e Métodos**

### **4.2.1. Material vegetal**

O painel utilizado consistiu em 251 acessos de tomateiro do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Laboratório de Melhoramento de Hortaliças (LMH), do Departamento de Genética da ESALQ/USP, Campus de Piracicaba-SP. Os acessos são linhagens da espécie *Solanum lycopersicum* L., sendo parte da var. *esculentum* e alguns da var. *cerasiforme*, os quais estão listados no Anexo I.

#### 4.2.2. Fenotipagem

A fenotipagem dos acessos quanto à severidade da mancha bacteriana foi realizada em três épocas em casas de vegetação do Departamento de Genética da ESALQ/USP, seguindo a metodologia descrita no capítulo 1. Para o estudo de associação genômica, dois métodos de fenotipagem foram considerados: 1) S-AI: a severidade média calculada pelo método de análise de imagens N10, por seu melhor desempenho descrito no capítulo 2, resultante de três épocas (E1, E2 e E3) e 2) S-HB: a severidade média oriunda da atribuição de notas às plantas por meio da escala de Horsfall e Barratt (1945), proveniente de duas épocas (E2 e E3). Os valores médios das variáveis ambientais dos períodos de condução dos experimentos (dia da inoculação ao último dia de obtenção de fotos) estão resumidas na Tabela 11, conforme registrado na base de dados da Estação Meteorológica Automática da Área de Física e Meteorologia da ESALQ/USP (Série de Dados Climatológicos do Campus "Luiz de Queiroz" de Piracicaba-SP, 2020). De forma geral, as condições de umidade e temperatura no período de realização do experimento foram adequadas para a infecção e estabelecimento das bactérias.

**Tabela 11.** Valores médios de temperatura média (T MÉD), temperatura máxima (T MÁX), temperatura mínima (T MÍN) e umidade relativa do ar (UR), referentes ao período de inoculação a avaliação da mancha bacteriana nos experimentos E1, E2 e E3. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 2018 e 2019.

Exp.	Mês/Ano	T MÉD	T MÁX	T MÍN	UR
		(°C)	(°C)	(°C)	(%)
E1	Set-Out/2018	23,5	29,4	17,5	76,0
E2	Abr-Mai/2019	23,7	29,5	17,8	78,0
E3	Nov-Dez/2019	23,5	30,1	17,0	77,0

\*Série de Dados climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba-SP. Departamento de Engenharia de Biosistemas. ESALQ/USP, 2020.

A análise de dados fenotípicos foi feita por meio do pacote *lme4* (BATES et al., 2015) do software R v.3.6.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020), sendo as médias corrigidas para valores BLUP (*Best Linear Unbiased Predictor*) a partir do seguinte modelo estatístico:

$$y_{ijk} = \mu + g_i + a_k + b_{j(k)} + ga_{ik} + \varepsilon_{ijkn}$$

Em que:

$y_{ijk}$  é o valor da observação referente ao genótipo  $i$  no bloco  $j$  e época  $k$ ;

$\mu$  é a média geral;

$g_i$  é o efeito aleatório do genótipo  $i$ ;

$a_k$  é o efeito aleatório da época  $k$ ;

$b_{j(k)}$  é o efeito aleatório do bloco  $j$  dentro da época  $k$ ;

$ga_{ik}$  é o efeito aleatório da interação genótipos x épocas;

$\varepsilon_{ijk}$  é o efeito aleatório do erro experimental do genótipo  $i$ , no bloco  $j$  e época  $k$ , assumindo-se que os erros são independentes e normalmente distribuídos com média zero e variância  $\sigma^2$ .

Os valores BLUPs obtidos compuseram o vetor fenotípico do modelo de associação genômica, como apresentado mais adiante.

#### 4.2.3. Extração de DNA

Tecidos foliares dos acessos foram coletados de folhas jovens, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em biofreezer no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento da ESALQ/USP (LDGM). A extração de DNA foi efetuada a partir de 40 mg do material congelado, o qual foi macerado em nitrogênio líquido e extraído pelo kit de extração DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). O DNA obtido foi quantificado em método baseado em fluorescência Qubit (Invitrogen) e normalizado a 30 ng/ $\mu\text{L}^{-1}$ , produzindo um número uniforme de sequências *tags* e *reads* de cada amostra para prosseguir com a genotipagem.

#### 4.2.4. Genotipagem, chamada de SNPs e filtragem dos dados

Dois grupos de marcadores compuseram a genotipagem do painel de acessos. Primeiramente, foi utilizado um conjunto otimizado de 384 marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Estes foram selecionados de um *SNP Infinium array* contendo um total de 7750 SNPs, o qual foi desenvolvido como parte do *Solanaceae Coordinated Agricultural Project (SolCAP)* (SIM et al., 2012a). Esta seleção de 384 SNPs foi feita com base na recombinação genética e posição física (SIM et al., 2012b), de forma a cobrir o genoma de tomateiro. Os SNPs foram convertidos para uso em um ensaio de sequenciamento baseado em amplicons (PlexSeq, AgriPlex Genomics, Cleveland, Ohio, USA). A genotipagem seguiu o protocolo do fabricante, a partir de um total de 250 ng de DNA genômico. As chamadas de SNP foram feitas usando o Software Plexcall™ (AgriPlex Genomics).

Também foram utilizados marcadores provenientes do método de genotipagem por sequenciamento (GBS) (ELSHIRE et al., 2011), aumentando a cobertura do genoma. Bibliotecas genômicas foram obtidas por meio de modificações do protocolo proposto por Poland et al. (2012), conforme rotina no LDGM. Foram selecionadas duas enzimas de restrição, *PstI* e *MseI*, que

apresentaram um perfil satisfatório com fragmentos de sequências menores que 800 pares de bases e que, posteriormente, indicaram a presença do dímero adaptador no gel Bionalyzer 2100. Adaptadores específicos para a tecnologia Illumina foram ligados aos fragmentos digeridos, sendo que cada amostra recebeu um adaptador com sequências barcodes específicas para o seu reconhecimento. Os fragmentos foram reunidos em um único pool (multiplex), o qual foi purificado e amplificado via PCR. Por fim, as bibliotecas foram validadas, quantificadas e sequenciadas em um Illumina HighSeq2500, no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP.

As sequências resultantes, obtidas para cada um dos acessos, foram demultiplexadas e limpas usando o `process-radtags` no Software STACKS v.2.4 (CATCHEN et al., 2013; ROCHETTE; RIVERA-COLÓN; CATCHEN, 2019). Sequências de cada amostra foram inspecionadas e a qualidade do sequenciamento e contaminação por restos de adaptadores foram conferidas usando o FastQC (ANDREWS, 2020). Em seguida, as sequências obtidas foram alinhadas com o genoma de referência de tomateiro SL3.0 (SOLANACEAE GENOMICS PROJECT, 2018) por meio da função `aln` do programa Burrows-Wheeler Aligner (BWA) v.0.7.15 (LI; DURBIN, 2009). Os arquivos alinhados foram classificados e convertidos para o formato BAM por meio do SAMtools 1.10 (LI et al., 2009)(LI et al. 2009). Por fim, o programa `gstacks` (STACKS) foi utilizado para criar os loci RAD incorporando as sequências alinhadas e ordenadas. O programa `populations` (STACKS) foi utilizado para criar arquivos VCF e GENEPOP para as análises *downstream* no R.

Os dados de marcadores SNPs oriundos das duas plataformas de genotipagem foram unidos utilizando ferramentas do Software R v.3.6.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020). Para garantir a qualidade dos mesmos, marcadores com MAF (*Minor Allele Frequency*)  $< 0,01$  e com mais de 10% de dados perdidos (*Call Rate*  $< 0.9$ ) foram removidos. Os SNPs resultantes de tais filtragens foram utilizados nas análises de associação genômica, sendo ordenados com base em suas posições físicas no genoma de referência do tomateiro, obtido da base de dados SGN (versão SL3.0, <http://solgenomics.net>) (THE TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012).

#### 4.2.5. Estrutura populacional e matriz de parentesco

A estrutura populacional e a matriz de parentesco do painel de linhagens foram verificadas no pacote `GAPIT` (LIPKA et al., 2012; TANG et al., 2016), implementado no Software R v.3.6.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020). Uma análise de componentes principais (PCA) (PRICE et al., 2006) foi utilizada para o estudo da estrutura populacional, sendo a definição do

número de PC determinada por meio de uma análise gráfica do decaimento da variância dos componentes principais em relação aos autovetores. Este resultado foi utilizado para a determinação da matriz de incidência P, no modelo de associação genômica.

A matriz de parentesco ou *kinship* (matriz K) foi calculada por meio do algoritmo de *VanRaden* (VANRADEN, 2008), sendo também utilizada como covariável no controle de possíveis associações espúrias devido ao relacionamento genético entre os indivíduos.

#### 4.2.6. Análises de Associação Genômica Ampla (GWAS)

As análises de associação genômica foram realizadas utilizando o modelo FarmCPU (*Fixed and random model Circulating Probability Unification*) (LIU et al., 2016), um modelo linear misto de múltiplos locos, implementado no pacote *GAPIT* (LIPKA et al., 2012; TANG et al., 2016) do software R v.3.6.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020). Este método estatístico realiza testes de marcadores com SNPs associados como covariáveis em um modelo de efeito fixo, além de otimizar os marcadores-covariáveis associados em um modelo de efeito aleatório, separadamente. Assim, ele acaba por controlar falsos positivos, além de aumentar o poder estatístico e reduzir o tempo computacional em relação a outros modelos comumente utilizados em análises de associação genômica (GAPIT, 2020; LIU et al., 2016).

Associações entre marcadores e a resistência à mancha bacteriana foram consideradas significativas tanto com base na correção de Bonferroni, na qual o *threshold* de significância é calculado como  $P \leq 0,01/\text{número total de SNPs}$ , quanto pela correção FDR (*False Discovery Rate*) a 5% (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). Estes *thresholds* são plotados pelo GAPIT em *Manhattan plots*, gráficos em que o  $-\log(\text{p-valor})$  é representado no eixo Y, permitindo uma melhor visualização de marcadores mais significativos na parte superior, e a região genômica é representada pelo eixo X, na ordem numérica dos cromossomos.

O desequilíbrio de ligação (DL) foi estimado para cada par de SNPs por meio do quadrado do coeficiente de correlação ( $r^2$ ) entre os alelos de dois locos, sendo plotado contra a distância física entre estes. A média de marcadores adjacentes foi calculada usando uma janela de dez marcadores.

Embora não se tenha realizado uma busca referente à anotação funcional de possíveis genes relacionados aos SNPs significativos encontrados, a posição física destes foi contrastada com aquela obtida por outros autores que estudaram a mesma doença. As informações relativas às posições físicas nos 12 grupos de ligação do genoma do tomateiro podem ser encontradas em SIM et al. (2012a).

### 4.3. Resultados e Discussão

#### 4.3.1. Marcadores obtidos e desequilíbrio de ligação

O alinhamento de sequências oriundas da genotipagem por sequenciamento (GBS) com o genoma de tomateiro foi em torno de 97,6%, considerado ótimo em análises genômicas. As genotipagens realizadas por meio do conjunto otimizado do *SNP Infinium Array* e GBS geraram 363 e 70.359 SNPs polimórficos, respectivamente. Após o processo de controle de qualidade dos dados, foram obtidos 7.631 SNPs dispersos ao longo dos 12 cromossomos (Tabela 12). Estes SNPs foram utilizados nas análises de associação genômica quanto à resistência à mancha bacteriana. Nota-se que o tamanho do genoma abrangido pelos marcadores utilizados corresponde à praticamente 100% do tamanho do genoma de tomateiro montado, disponível na base de dados utilizada para o alinhamento (SOLANACEAE GENOMICS PROJECT, 2018).

**Tabela 12.** Características dos SNPs polimórficos utilizados.

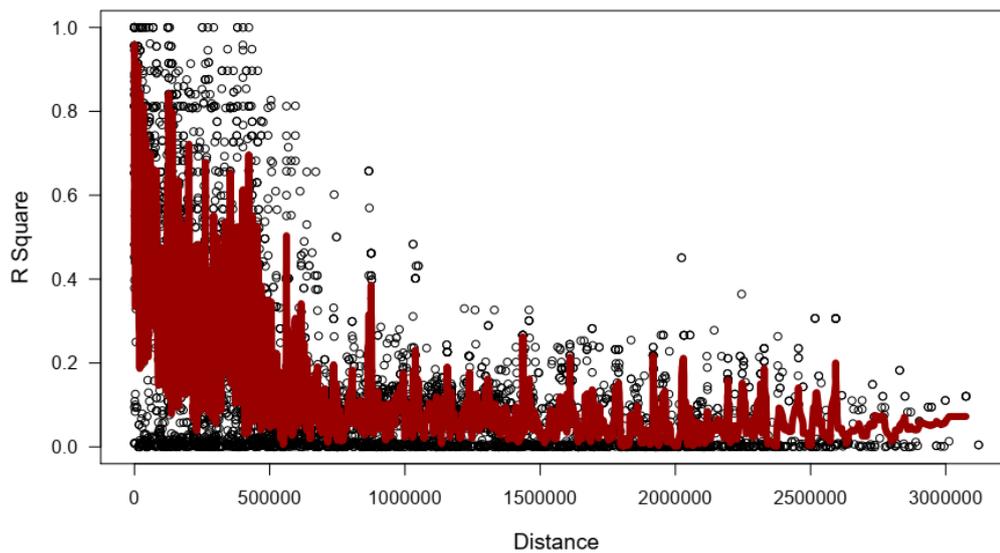
Cromossomo	Número de SNPs			
	SNP Array	GBS	Total	Tamanho abrangido (Mbp) <sup>1</sup>
1	32	786	818	98,16 (99,69%)
2	25	809	834	53,59 (95,73%)
3	28	737	765	72,24 (99,93%)
4	60	630	690	66,45 (99,84%)
5	35	436	471	66,43 (99,57%)
6	17	1085	1102	49,67 (99,75%)
7	17	241	258	67,05 (98,34%)
8	22	221	243	65,90 (99,86%)
9	35	1113	1148	72,88 (99,96%)
10	23	321	344	65,55 (99,88%)
11	15	436	451	56,49 (99,81%)
12	43	464	507	67,93 (99,71%)
<b>Total</b>	<b>352</b>	<b>7.279</b>	<b>7.631</b>	<b>802,33 (99,39%)</b>

<sup>1</sup>Valor entre parênteses refere-se ao total tamanho do genoma de tomateiro montado, disponível na base de dados utilizada para o alinhamento (SOLANACEAE GENOMICS PROJECT, 2018).

A distribuição média de marcadores ao longo do genoma foi de 636 por cromossomo, sendo a maior quantidade localizada no cromossomo 9 (1.148) e a menor quantidade no cromossomo 8 (243) (Tabela 12).

O desequilíbrio de ligação (DL), medida que representa a associação não-aleatória entre alelos de diferentes locos, está representado na Figura 9 para cada par de marcadores SNPs. Cada ponto no gráfico representa a distância entre dois marcadores na janela considerada, em função do coeficiente de correlação ao quadrado ( $r^2$ ). Nota-se que, quanto maior a distância entre dois

marcadores, menor é o  $r^2$ , que é uma medida diretamente proporcional ao DL. Mínimos valores de  $r^2$  foram atingidos com distâncias em torno de 50 kb, mas valores próximos de  $r^2 = 0,3$  foram encontrados para pares de SNPs distantes em 2.500 kb. De fato, é esperado que o DL se estenda por longas distâncias em acessos comerciais de tomateiro, o que se deve à sua condição de espécie autógama, combinado a uma variabilidade limitada pela contínua seleção de melhoristas e reutilização de linhagens doadoras a partir de um pool gênico limitado (VAN BERLOO et al., 2008).



**Figura 9.** Decaimento do desequilíbrio de ligação (DL), expresso em termos de  $r^2$  entre pares de SNPs, em função de suas distâncias físicas (pares de bases). A linha vermelha representa a média móvel dos dez marcadores adjacentes.

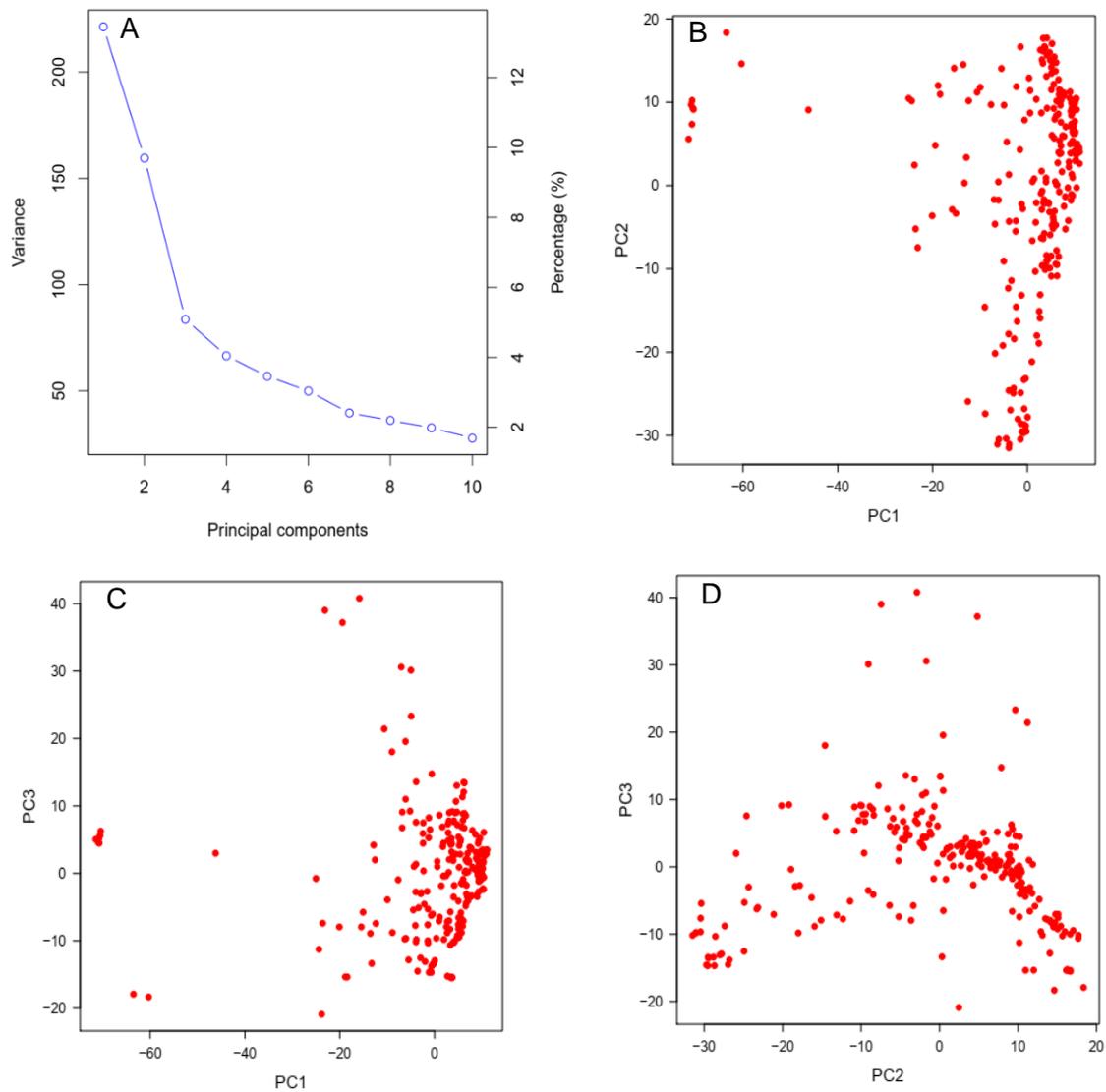
Em uma população proveniente de cruzamentos aleatórios, o padrão de decaimento do DL reflete a intensidade de seleção, recombinação e migração que a população sofreu. Assim, ele é uma medida que varia entre e dentro de espécies (FLINT-GARCIA; THORNSBERRY; EDWARD IV, 2003; SAUVAGE et al., 2014), e pode variar até mesmo entre diferentes métodos de medição do DL (SIM et al., 2012b). No caso de espécies autógamas, como o tomateiro, espera-se um decaimento mais lento do DL (maiores taxas de DL entre SNPs), uma vez que a recombinação é menor sob autogamia, condição esta em que os indivíduos tendem a estar em homozigose para a maioria dos locos. Se o DL entre marcadores se estende por milhares de pares de bases, como o obtido neste trabalho, o número de marcadores utilizado pode ser considerado bom, ou até diminuído. No entanto, a resolução da associação genômica em espécies autógamas tende a ser menor que em alógamas, devido ao nível mais baixo de diversidade molecular e alto DL daquelas (RANC et al., 2012).

### 4.3.2. Estrutura populacional e matriz de parentesco

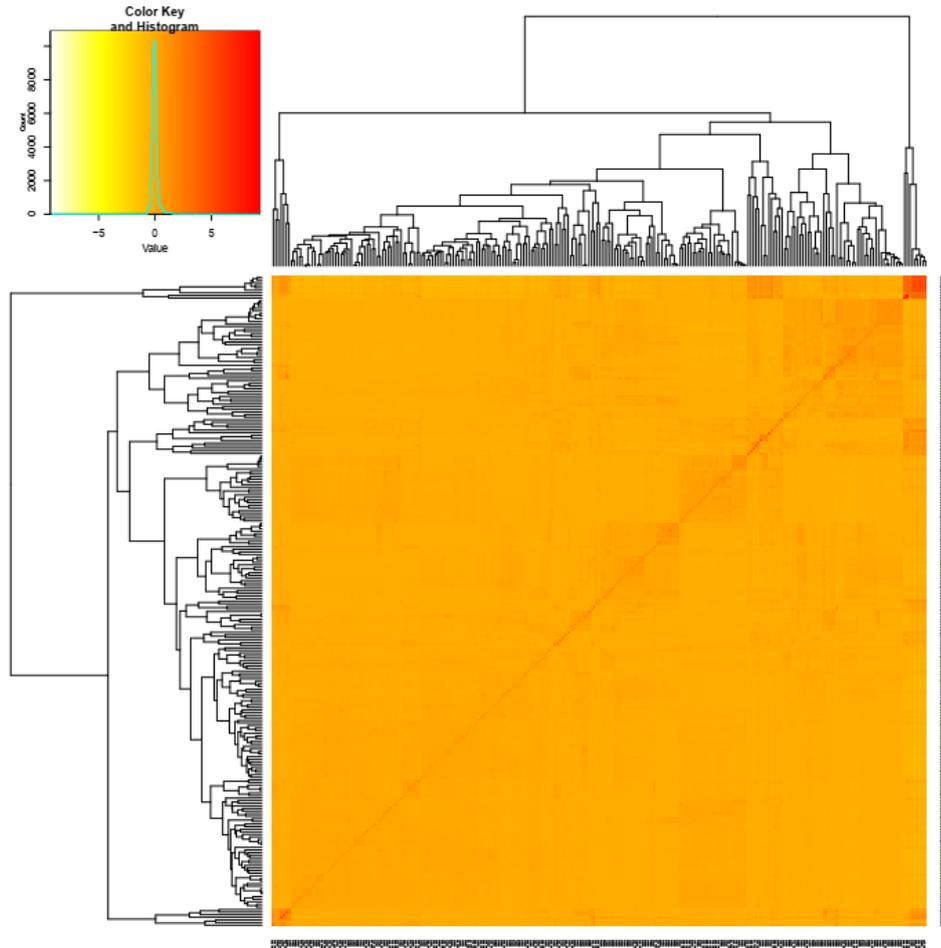
O conhecimento de como populações de melhoramento são estruturadas e seus acessos são relacionados entre si são essenciais em estudos de associação genômica e correta interpretação dos marcadores associados aos fenótipos de interesse (SUL; MARTIN; ESKIN, 2018). A estrutura populacional do painel de linhagens de tomateiro, representada pela matriz P, foi avaliada por meio de uma análise de componentes principais (PCA) no pacote *GAPIT* (LIPKA et al., 2012; TANG et al., 2016) (Figura 10). Os autovetores dos três primeiros componentes principais explicaram a maior parte da variância: 13%, 10% e 5%, respectivamente (Figura 10A).

Aparentemente, podem ser observados três grupos de genótipos, contudo, observa-se que boa parte deles são geneticamente próximos. Este fator pode estar relacionado à estreita base genética de acessos cultivados da espécie *S. lycopersicum*, causada pela intensa seleção, migração e domesticação, fatores exacerbados pela natureza autogâmica da espécie (BLANCA et al., 2015; GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 2006; PATIL et al., 2010; RANC et al., 2012). Com efeito, os acessos do BAG do LMH utilizados neste painel são, em sua maioria, acessos que passaram por um processo de seleção, e uma exploração e introdução de uma maior diversidade genética pode contribuir em futuros estudos de associação genômica para caracteres de interesse.

A matriz de parentesco (matriz K ou matriz de *kinship*) é outra variável de extrema importância em modelos de associação genômica, especialmente quando calculada com base em marcadores. De maneira resumida, esta matriz ajusta a probabilidade de dois indivíduos aleatórios serem relacionados com base em seus alelos em comum (YU et al., 2006). A matriz K do painel de tomateiro está ilustrada no *heat map* da Figura 11, conforme calculado pelo algoritmo de *VanRaden* (VANRADEN, 2008). A informação dos dendrogramas complementa as análises de estrutura populacional, indicando a presença de três grupos de indivíduos, embora a maioria indique um estreito relacionamento, como discutido acima. Combinando as matrizes P e K em um modelo de associação genômica, assegura-se que múltiplos níveis de relacionamento entre indivíduos sejam considerados, diminuindo as chances de se obterem SNPs significativos que, na verdade, sejam apenas associações espúrias.



**Figura 10.** A) Gráfico do acúmulo da variância dos autovetores entre os principais componentes principais (PC), revelando que três PCs contribuíram para a variância; B, C e D) Análise de Componentes Principais (PCA) indicando a relação genética entre 251 linhagens do painel de tomateiro com base em dados de marcadores SNP. Representação do primeiro e segundo componentes principais (PC1 e PC2) (B), primeiro e terceiro componentes principais (PC1 e PC3) (C) e segundo e terceiro componentes principais (PC2 e PC3) (D).



**Figura 11.** *Heat map* da matriz de parentesco baseada na distância genética entre acessos de tomateiro usando marcadores SNP.

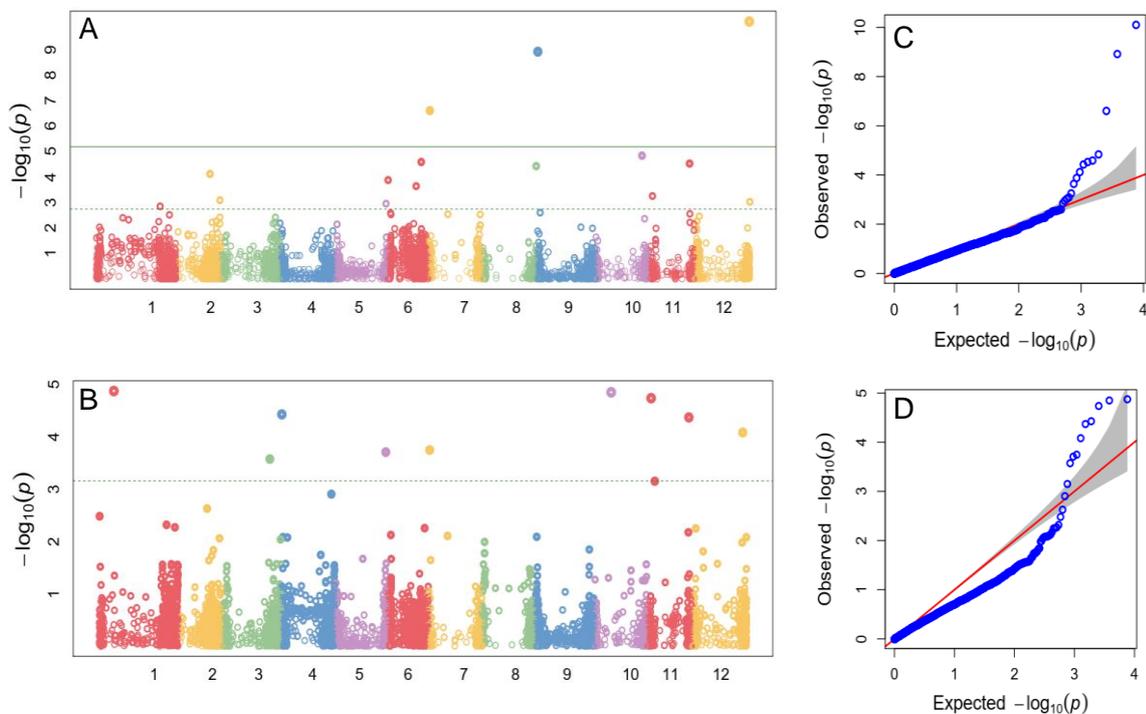
#### 4.3.3. Análise GWAS: associações entre SNPs e resistência à mancha bacteriana

Os resultados de associação genômica ampla contemplam associações de SNPs tanto quanto à severidade da mancha bacteriana estimada com base em análise de imagem (S-AI) quanto aquela baseada em escala de notas de Horsfall e Barratt (1945) (S-HB). Em ambos os casos, o modelo de associação genômica utilizado, *FarmCPU*, incluiu a matriz P, referente à estrutura populacional, bem como a matriz K, referente ao parentesco entre os indivíduos, contribuindo para a detecção de marcadores significativos relacionados à resistência e, portanto, melhor controle de falsos positivos.

Para uma boa visualização dos SNPs associados significativamente à severidade da mancha bacteriana, foram obtidos *Manhattan plots* (Figuras 12A e 12B), onde a abcissa representa os cromossomos, ou seja, a posição física dos SNP, enquanto que a ordenada indica o logaritmo negativo, na base 10, do p-valor encontrado para os mesmos. É interessante ressaltar que, no

modelo *FarmCPU*, estes gráficos geram SNPs significativos pontualmente e não por meio de picos, como é típico de modelos lineares gerais ou mistos (MOROSINI, 2017). Para S-AI, três SNPs foram encontrados abaixo do nível de significância corrigido por Bonferroni ( $P < 6,55 \times 10^{-6}$ ), conforme Tabela 13. Sob este *threshold*, nenhum SNP foi significativo para S-HB. Se considerado o *threshold* calculado pela correção FDR (False Discovery Rate), contudo, 12 SNPs foram significativos para S-AI e 10 para S-HB (Figuras 13A e 13B). Considerando os dois métodos de fenotipagem, pelo menos 1 SNP foi encontrado por cromossomo, sugerindo que a resistência à mancha bacteriana pode ser controlada por diversas regiões do genoma.

Os gráficos *Q-Q plots* obtidos também são apresentados na Figura 12 (C e D). Eles ajudam a averiguar a adequação do modelo utilizado ao compararem a distribuição esperada do teste de associação, com base na hipótese nula, com os SNPs observados. No caso de S-AI, o modelo utilizado resultou em um bom ajuste, com apenas alguns desvios na parte superior da reta vermelha. Tais desvios são esperados e representam os SNPs significativos, ou seja, uma pequena proporção de hipóteses alternativas verdadeiras. Já para S-HB, a presença de pontos abaixo da reta indica que menos associações foram encontradas do que se era esperado (BURGHARDT; YOUNG; TIFFIN, 2017), o que sugere que outros modelos de associação genômica e novos cenários de covariáveis poderiam ser testados neste conjunto de dados para um melhor ajuste.



**Figura 12.** *Manhattan plots* e *Q-Q plots* resultantes de análise GWAS, para os resultados de severidade estimada com base em A) análise de imagens (S-AI) e em B) notas de escala de Horsfall e Barratt (1945) (S-HB). A ordenada indica o  $-\log_{10}$  dos p-valoros e a abscissa indica as posições físicas dos SNPs nos 12 cromossomos.

Os SNPs significativos sob o *threshold* de Bonferroni para S-AI estão localizados no cromossomo 7, 9 e 10 (Figura 12A, Tabela 13). Entre eles, *solcap\_snp\_sl\_22109*, presente no cromossomo 7, foi significativo também para S-HB (Figuras 13A e 13B, Tabela 13). A efetividade da associação deste SNP à resistência à mancha bacteriana é reforçada pelo fato de que este mesmo marcador faz parte de um haplótipo significativo encontrado por Sim et al. (2015), ao buscar associações para a mesma doença, porém sob a inoculação de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (raça T1). Este trabalho utilizou uma população de melhoramento complexa, tendo encontrado uma significativa associação entre o haplótipo *solcap\_snp\_sl\_22109-solcap\_snp\_sl\_15789* e a resistência à mancha bacteriana em condições de campo, avaliada com a escala de Horsfall and Barratt (1945). A correspondência entre o estudo realizado por estes autores e o apresentado aqui aponta para uma resistência de amplo espectro, o que é extremamente útil em programas de melhoramento, visto que a mesma região do genoma pode estar envolvida à resistência a múltiplas espécies do patógeno.

A resistência à mancha bacteriana também já foi encontrada em estudos envolvendo mapeamento de QTLs e genes de efeito maior a partir de populações F<sub>2</sub>, linhagens quase isogênicas (NILs) e oriundas de retrocruzamentos. Entre os locos de grande efeito já associados à essa resistência em nível de campo, destacam-se o *Rx-3*, no cromossomo 5 (YANG et al., 2005), *Rx-4* (ROBBINS et al., 2009), *Xv3* (ASTUA-MONGE et al., 2000b; WANG et al., 2011), *QTL-11C* e *QTL-11A* no cromossomo 11 (BERNAL; LIABEU; FRANCIS, 2020). Neste recente trabalho, os autores demonstraram que a combinação destes diferentes locos de resistência no cromossomo 11 proporcionaram resistência a diversas variantes de *Xanthomonas*. Além dos locos citados, 17 SNPs e 37 haplótipos foram associados a raças T1 e/ou T3 de *Xanthomonas* spp. em oito diferentes cromossomos por Sim et al. (2015).

A importância do cromossomo 11 na resistência a *X. euvesicatoria* pv. *perforans* também pôde ser evidenciada no presente estudo, uma vez que nele foram encontrados cinco SNPs, sendo dois para S-AI e três para S-HB. Os marcadores significativos *gbs\_Chr11\_50241396* (S-AI), *gbs\_Chr11\_5507348* (S-HB) e *gbs\_Chr11\_52473810* (S-HB) foram encontrados na mesma região que oito haplótipos e dois marcadores relevantes reportados por Sim et al. (2015), indicando coerência com resultados já obtidos.

**Tabela 13.** SNPs e respectivos cromossomos, posição física, p-valor e MAF, associados significativamente com à severidade da mancha bacteriana, avaliada por meio de análise de imagem (S-AI) e escala de notas de Horsfall & Barratt (1945) (S-HB) durante três épocas dos anos 2018 e 2019. SNPs classificados do menor para o maior. Piracicaba-SP, Brasil.

Método de fenotipagem	SNP	Cromossomo	Posição (Mbp)	p-valor	MAF	Alelo resistente
S-AI	gbs_Chr12_67289600	12	67,29	$7,91 \times 10^{-11}$	0,03	C
	gbs_Chr09_1758016	9	1,76	$1,21 \times 10^{-9}$	0,03	G
	solcap_snp_sl_22109	7	1,82	$2,49 \times 10^{-7}$	0,24	G
	gbs_Chr10_57197730	10	57,20	$1,45 \times 10^{-5}$	0,47	A
	gbs_Chr06_40841837	6	40,84	$2,58 \times 10^{-5}$	0,09	T
	gbs_Chr11_50241396	11	50,24	$2,97 \times 10^{-5}$	0,21	C
	gbs_Chr08_65611987	8	65,61	$3,75 \times 10^{-5}$	0,03	C
	gbs_Chr02_41832744	2	41,83	$7,58 \times 10^{-5}$	0,03	A
	gbs_Chr06_5636	6	0,01	$1,32 \times 10^{-4}$	0,05	T
	gbs_Chr06_34586042	6	34,59	$2,29 \times 10^{-4}$	0,03	G
	gbs_Chr11_4538841	11	4,54	$5,60 \times 10^{-4}$	0,07	C
	gbs_Chr02_54042556	2	54,04	$8,15 \times 10^{-4}$	0,29	C
	gbs_Chr12_67999888	12	68,00	$9,44 \times 10^{-4}$	0,05	C
	gbs_Chr05_64155895	5	64,16	$1,12 \times 10^{-3}$	0,17	A
gbs_Chr01_78619012	1	78,62	$1,42 \times 10^{-3}$	0,04	A	
S-HB	gbs_Chr01_18274069	1	18,27	$1,34 \times 10^{-5}$	0,03	T
	gbs_Chr10_21472578	10	21,47	$1,42 \times 10^{-5}$	0,10	C
	gbs_Chr11_5507348	11	5,51	$1,84 \times 10^{-5}$	0,22	T
	solcap_snp_sl_21317	4	0,85	$3,75 \times 10^{-5}$	0,36	G
	gbs_Chr11_52473810	11	52,47	$4,28 \times 10^{-5}$	0,20	G
	gbs_Chr12_62894724	12	62,89	$8,30 \times 10^{-5}$	0,05	A
	solcap_snp_sl_22109	7	1,82	$1,79 \times 10^{-4}$	0,24	G
	gbs_Chr05_63581515	5	63,58	$1,97 \times 10^{-4}$	0,06	T
	gbs_Chr03_58229540	3	58,23	$2,67 \times 10^{-4}$	0,35	C
gbs_Chr11_10039085	11	10,04	$7,07 \times 10^{-4}$	0,46	A	

Dos 12 SNPs significativos encontrados para S-AI, seis estão em regiões já associadas à mancha bacteriana em estudos anteriores, o mesmo ocorrendo para quatro dos dez associados à S-HB (SIM et al., 2015; WANG et al., 1994; YU et al., 1995). Tais associações haviam sido encontradas em acessos inoculados com as raças T1 (*X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*), T2 (*X. vesicatoria*) e/ou T3 (*X. euvesicatoria* pv. *perforans*), o que reitera uma possível resistência quantitativa, contra várias espécies da bactéria. No caso do cromossomo 11, os dois SNPs encontrados na faixa de 50,24 a 52,47 Mb (Tabela 13) indicam que linhagens do painel utilizado aqui podem ter sido selecionadas de modo a herdar regiões relacionadas à resistência de linhagens como Ha7998, PI 114490 ou PI 128216, com destaque a este último acesso, conhecido doador do loco *Rx-4* (ROBBINS et al., 2009; SIM et al., 2015). O SNP *gbs\_Chr01\_78619012*, no cromossomo 1, também está próximo do loco *Rx-2*, indicando uma possível herança do alelo de resistência da linhagem Ha7998, FL7600 ou OH9242 (SIM et al., 2015; WANG et al., 1994; YU et al., 1995). Por fim, o

*solcap\_snp\_sl\_21317*, situado na mesma região de um haplótipo significativo encontrado por Sim et al. (2015) no cromossomo 4, parece ter sido herdado de germoplasma provenientes do estado de Ohio, Estados Unidos.

Associações apontadas anteriormente por outros autores, mas não encontradas neste estudo, podem ser devidas a uma série de fatores, sobretudo a metodologia. Entre eles, o uso de haplótipos próximos a marcadores já conhecidos, ao invés de marcadores individuais, já demonstrou ser uma abordagem que melhora o poder estatístico (HORNE; CAMP, 2004), aumentando a detecção de alelos idênticos por descendência e por estado, especialmente em populações complexas de melhoramento em que o DL entre genes e marcadores tende a diminuir (SIM et al., 2015). Do ponto de vista de fenotipagem da doença, quando se utilizou o vetor de severidade resultante da análise de imagens, obteve-se, em número absolutos, mais SNPs significativos e próximos a regiões já reportadas em outros estudos do que quando a severidade foi avaliada usando a escala de Horsfall & Barratt (1945). Este fator pode indicar um menor poder estatístico de medidas de natureza categórica, justamente por não representar a grande variação quantitativa que esta doença apresenta. A escala de notas de Horsfall & Barratt (1945) já foi relatada como subjetiva e de ampla variação entre avaliadores e unidades experimentais, sendo que a incerta precisão das estimativas da severidade de doenças demonstrou impactar o poder em detectar QTLs (POLAND; NELSON, 2011). Assim, o uso da escala de notas de Horsfall & Barratt (1945) na maioria dos estudos de mensuração da severidade da mancha bacteriana pode não ter levado à descoberta de associações precisas correlacionadas à doença.

Dos 15 SNPs significativos encontrados mas ainda não reportados em outros estudos, nove foram associados à S-AI e seis à S-HB. Eles indicam potenciais regiões a serem exploradas no genoma do tomateiro, de modo a confirmar sua autenticidade e serem exploradas no melhoramento. Além disso, o efeito destes marcadores e um estudo mais aprofundado de suas anotações funcionais, incluindo genes já identificados, podem ajudar a desvendar o verdadeiro papel dos mesmos nas rotas metabólicas relacionadas à resistência à mancha bacteriana.

#### **4.4. Conclusões**

Os resultados obtidos neste estudo de associação genômica levaram à identificação de SNPs significativos relacionados à resistência à mancha bacteriana, muitos dos quais em regiões próximas a marcadores e haplótipos anteriormente conhecidos. As associações identificadas a partir de fenótipos provenientes de análise de imagens foram mais numerosas e com maior magnitude de significância que aqueles oriundos da atribuição de notas de escala de Horsfall &

Barratt (1945). Os conhecidos e novos locos encontrados, se validados em futuros estudos, podem ser utilizados no melhoramento para a obtenção de cultivares mais resistentes.

## Referências

- ANDREWS, S. **A quality control tool for high throughput sequence data**, 2020. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em 23 Nov. 2020.
- BATES, D. et al. Fitting linear mixed-effects models using lme4. **Journal of Statistical Software**, v. 67, n. 1, 2015.
- ASTUA-MONGE, G. 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.
- BAUCHET, G. et al. Use of modern tomato breeding germplasm for deciphering the genetic control of agronomical traits by Genome Wide Association study. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 130, n. 5, p. 875–889, 2017a.
- BAUCHET, G. et al. Identification of major loci and genomic regions controlling acid and volatile content in tomato fruit: implications for flavor improvement. **New Phytologist**, v. 215, n. 2, p. 624–641, 2017b.
- BAUCHET, G.; CAUSSE, M. Genetic Diversity in Tomato (*Solanum lycopersicum*) and Its Wild Relatives. In: CALISKAN, M. (Ed.). **Genetic Diversity in Plants**. InTech, p. 133–161, 2012.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.
- BERNAL, E.; LIABEU, D.; FRANCIS, D. M. Evaluating quantitative trait locus resistance in tomato to multiple *Xanthomonas* spp. **Plant Disease**, v. 104, n. 2, p. 423–429, 2020.
- BLANCA, J. et al. Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–19, 2015.
- BRESEGHELLO, F.; SORRELLS, M. E. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. **Crop Science**, v. 46, n. 3, p. 1323–1330, 2006.
- BURGHARDT, L. T.; YOUNG, N. D.; TIFFIN, P. A Guide to Genome-Wide Association Mapping in Plants. **Current Protocols in Plant Biology**, v. 2, n. 1, p. 22–38, 2017.
- CATCHEN, J. et al. Stacks: An analysis tool set for population genomics. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 11, p. 3124–3140, 2013.

- ELSHIRE, R. J. et al. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.
- FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J. M.; EDWARD IV, S. B. Structure of Linkage Disequilibrium in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 357–374, 2003.
- GAPIT. **User Manual for GAPIT: Genomic Association and Prediction Integrated Tool (Version 3)**. p. 1–61, 2020.
- GARCÍA-MARTÍNEZ, S. et al. Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting: utility for grouping closely related traditional cultivars. **Genome**, v. 49, n. 6, p. 648–656, 2006.
- HORNE, B. D.; CAMP, N. J. Principal Component Analysis for Selection of Optimal SNP-Sets That Capture Intragenic Genetic Variation. **Genetic Epidemiology**, v. 26, n. 1, p. 11–21, 2004.
- HORSFALL, J. G.; BARRATT, R. W. An improved grading system for measuring plant diseases. **Phytopathology**, v. 35, p. 655, 1945.
- HUANG, M. et al. BLINK: A package for the next level of genome-wide association studies with both individuals and markers in the millions. **GigaScience**, v. 8, n. 2, p. 1–12, 2018.
- LABATE, J. et al. Tomato. In: KOLE, C. (Ed.). **Genome mapping and molecular breeding in plants**. Berlin: Springer-Verlag, 2007. p. 11–135.
- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 2009.
- LI, M. et al. Enrichment of statistical power for genome-wide association studies. **BMC Biology**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2014.
- LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 2009.
- LIPKA, A. E. et al. GAPIT: Genome association and prediction integrated tool. **Bioinformatics**, v. 28, n. 18, p. 2397–2399, 2012.
- LIU, X. et al. Iterative Usage of Fixed and Random Effect Models for Powerful and Efficient Genome-Wide Association Studies. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 2, 2016.
- MOROSINI, J. S. **Associação genômica ampla para caracteres relacionados à eficiência no uso de nitrogênio em linhagens de milho tropical**. Universidade de São Paulo, 2017.
- PATIL, B. et al. Narrow genetic base of private sector tomato varieties revealed by RAPD profiles. **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 1, n. 4, p. 1153–1158, 2010.
- PHAN, N. T. et al. Identification of loci associated with fruit traits using genome-wide single nucleotide polymorphisms in a core collection of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 243, n. 1, p. 567–574, 2019.

- POLAND, J. A. et al. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.
- POLAND, J. A.; NELSON, R. J. In the eye of the beholder: The effect of rater variability and different rating scales on QTL mapping. **Phytopathology**, v. 101, n. 2, p. 290–298, 2011.
- PRICE, A. L. et al. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. **Nature Genetics**, v. 38, n. 8, p. 904–909, 2006.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em 23 nov. 2020.
- RANC, N. et al. Genome-Wide Association Mapping in Tomato (*Solanum lycopersicum*) Is Possible Using Genome Admixture of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 2, n. 8, p. 853–864, 2012.
- ROBBINS, M. 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.
- ROCHETTE, N. C.; RIVERA-COLÓN, A. G.; CATCHEN, J. M. Stacks 2: Analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. **Molecular Ecology**, v. 28, n. 21, p. 4737–4754, 2019.
- RUGGIERI, V. et al. An association mapping approach to identify favourable alleles for tomato fruit quality breeding. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, 2014.
- SACCO, A. et al. Exploring a tomato landraces collection for fruit-related traits by the aid of a high-throughput genomic platform. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–20, 2015.
- SAUVAGE, C. 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.
- SEGURA, V. et al. An efficient multi-locus mixed-model approach for genome-wide association studies in structured populations. **Nature Genetics**, v. 44, n. 7, p. 825–830, 2012.
- SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, Å.; XU, Y. The genetic dissection of quantitative traits in crops. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 5, 2010.
- Série de Dados Climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba, SP.** Departamento de Engenharia de Biosistemas. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, LEB - ESALQ - USP. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/leb/postocon.html>>. Acesso em: 23 nov. 2020.
- SIM, S. C. et al. Development of a large SNP genotyping array and generation of high-density genetic maps in tomato. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012a.

- SIM, S. C. et al. High-Density SNP Genotyping of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Reveals Patterns of Genetic Variation Due to Breeding. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–18, 2012b.
- SIM, S. C. et al. Association analysis for bacterial spot resistance in a directionally selected complex breeding population of tomato. **Phytopathology**, v. 105, n. 11, p. 1437–1445, 2015.
- SOLANACEAE GENOMICS PROJECT. **Genome Assembly SL3.0 - Solanum lycopersicum (tomato)**. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000188115.4](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000188115.4)>.
- SUL, J. H.; MARTIN, L. S.; ESKIN, E. Population structure in genetic studies: Confounding factors and mixed models. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 12, p. 1–22, 2018.
- TANG, Y. et al. GAPIT Version 2: An Enhanced Integrated Tool for Genomic Association and Prediction. **The Plant Genome**, v. 9, n. 2, p. 1–9, 2016.
- THE TOMATO GENOME CONSORTIUM. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**, v. 485, n. 7400, p. 635–641, 2012.
- VAN BERLOO, R. et al. Diversity and linkage disequilibrium analysis within a selected set of cultivated tomatoes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 1, p. 89–101, 2008.
- VANRADEN, P. M. Efficient methods to compute genomic predictions. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 11, p. 4414–4423, 2008.
- WANG, H. et al. Molecular mapping of hypersensitive resistance from tomato “Hawaii 7981” to *Xanthomonas perforans* race T3. **Phytopathology**, v. 101, n. 10, p. 1217–1223, 2011.
- 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.
- WANG, Q. et al. A SUPER powerful method for genome wide association study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.
- YANG, W. et al. Resistance in *Lycopersicon esculentum* intraspecific crosses to race T1 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* causing bacterial spot of tomato. **Phytopathology**, v. 95, n. 5, p. 519–527, 2005.
- YU, J. et al. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. **Nature Genetics**, v. 38, n. 2, p. 203–208, 2006.
- YU, J.; BUCKLER, E. S. Genetic association mapping and genome organization of maize. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 155–160, 2006.
- YU, Z. H. et al. Genomic localization of tomato genes that control a hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. **Genetics**, v. 141, n. 2, p. 675–682, 1995.
- ZHANG, J. et al. Genome-wide association mapping for tomato volatiles positively contributing to tomato flavor. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 1042, p. 1–13, 2015.

ZHANG, Z. et al. Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies.

**Nature Genetics**, v. 42, n. 4, p. 355–360, 2010.

ZHAO, J. et al. Meta-analysis of genome-wide association studies provides insights into genetic

control of tomato flavor. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2019.

ZHU, C. et al. Status and Prospects of Association Mapping in Plants. **The Plant Genome**, v. 1,

n. 1, p. 5–20, 2008.

## ANEXO

**ANEXO A.** Acessos de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) do Banco Ativo de Germoplasma do Laboratório de Melhoramento de Hortaliças (Departamento de Genética da ESALQ/USP) utilizados neste estudo.

<b>Código do genótipo</b>	<b>Acesso USP</b>	<b>Acesso</b>	<b>Cultivar</b>
G1	USP001		Olena Ukrainien
G2	USP002		Pusa Ruby
G3	USP003		Early cherry
G4	USP004		Sebastopol
G5	USP005		Cereja FC ("Perinha")
G6	USP006		Santa Cruz Kada Gigante
G7	USP007R		Corrogo (1)
G8	USP007M		Corrogo (2)
G9	USP008		San Marzano
G10	USP009		Yoshimatsu-L3
G11	USP010		Azure
G12	USP011		Tecoh Tepee
G13	USP012		Santa Clara
G14	USP013		High Country
G15	USP014		Immune
G16	USP015		Indigo Rose
G17	USP016		Banana Legs
G18	USP017		Calabash Rouge
G19	USP018		Coeur de Boeuf Jaune
G20	USP019		Tasty Evergreen
G21	USP020		Tropic Two Orders
G22	USP021		Géante D´Orenburg
G23	USP022		Solymari
G24	USP023		Tomate Laranja Salada (Topseed)
G25	USP024		White Wonder
G26	USP025		Pêche Rouge
G27	USP026A		Prize of the Trial (1)
G28	USP026V		Prize of the Trial (2)
G29	USP027		Tomate Cereja Laranja (Topseed)
G30	USP028		Olirose de St Domingue
G31	USP029		Persimmon
G32	USP030		IPA-6
G33	USP031		Santa Adélia
G34	USP032		Amalia
G35	USP033		INCA-945
G36	USP034		Mara
G39	USP038	LA4393	
G40	USP039	LA2414	Cal Ace
G41	USP040	LA4348	
G42	USP041	LA2661	Nagcarlang
G43	USP042	LA2706	Moneymaker
G44	USP043	LA4104	
G45	USP044	LA1787	

<b>Código do genótipo</b>	<b>Acesso USP</b>	<b>Acesso</b>	<b>Cultivar</b>
G46	USP045	LA4285	
G47	USP046	LA2086	
G48	USP047	LA1664	
G49	USP048	LA4451	Black Cherry
G50	USP049	LA4449	Black Plum
G51	USP050	LA2413	
G52	USP051	LA3667	
G53	USP052	LA2644	
G54	USP053	LA3736	
G56	USP055	LA2830	
G57	USP056	LA3847	NC HS-1
G58	USP057	LA3043	
G59	USP058	LA3471	
G60	USP059	LA0806	
G61	USP060	LA4425	
G62	USP061	LA2399	
G63	USP062	LA3273	
G65	USP064	LA2445	
G66	USP065	LA2531A	
G67	USP066	LA4432	
G68	USP067	LA2939	
G69	USP068		Balkonstar
G70	USP069		Saint Pierre (1)
G71	USP070		Motelle (PCTM)
G72	USP072	LA4026	
G73	USP073	LA3151	
G74	USP074	LA3475	M82
G75	USP082	CNPH0527	
G76	USP083	CNPH0511	
G77	USP084	CNPH0263	
G78	USP085	CNPH0616	
G79	USP086	CNPH0357	
G80	USP087	CNPH0083	
G81	USP088	CNPH0082	
G82	USP089	CNPH0633	
G83	USP090	CNPH0899	
G84	USP091	CNPH0422	
G85	USP092	CNPH0883	
G87	USP094	CNPH0529	
G88	USP095	CNPH0650	
G90	USP097	CNPH0500	
G91	USP098	CNPH0443	
G92	USP099	CNPH0525	
G93	USP100	CNPH1137	
G94	USP101	CNPH1218	
G95	USP102	CNPH1200	
G96	USP103	CNPH0512	
G97	USP104	CNPH0528	

<b>Código do genótipo</b>	<b>Acesso USP</b>	<b>Acesso</b>	<b>Cultivar</b>
<b>G98</b>	USP105	CNPH0080	
<b>G99</b>	USP106	CNPH0523	
<b>G100</b>	USP107	CNPH1100	
<b>G101</b>	USP108	CNPH0846	
<b>G102</b>	USP109	CNPH0357	
<b>G103</b>	USP110A	CNPH1138R	
<b>G104</b>	USP110B	CNPH1138C	
<b>G105</b>	USP111	CNPH0920	
<b>G106</b>	USP112	CNPH0442	
<b>G107</b>	USP113	CNPH0923	
<b>G108</b>	USP114	CNPH0390	
<b>G109</b>	USP115	CNPH0081	
<b>G110</b>	USP116	CNPH0635	
<b>G111</b>	USP117	CNPH0079	
<b>G113</b>	USP119	CNPH0634	
<b>G114</b>	USP120		Mangymakuh
<b>G115</b>	USP121		Idyll
<b>G117</b>	USP123		Hellfrucht
<b>G118</b>	USP124		Tomate Gaúcho laranja (Top Seed)
<b>G119</b>	USP125		Santa Cruz Kada (Paulista) - ISLA
<b>G120</b>	USP126	LA0330	
<b>G121</b>	USP127		Lingüiça Polonesa
<b>G122</b>	USP128		Tomato tree
<b>G124</b>	USP130		Des Andes
<b>G125</b>	USP131		Prune Noire
<b>G126</b>	USP132		Beauté Blanche
<b>G127</b>	USP133		Striped Cavern
<b>G128</b>	USP134		Poire Rouge
<b>G129</b>	USP135		Tigerella
<b>G130</b>	USP136		De Barao Gold
<b>G131</b>	USP137		Noire de Crimée
<b>G132</b>	USP138		Orange Queen
<b>G133</b>	USP139		Podland Pink
<b>G134</b>	USP140		Black Prince
<b>G135</b>	USP141		Green Sausage
<b>G136</b>	USP142		Eva's Purple Ball
<b>G137</b>	USP143		Coeur de Boeuf Orange
<b>G138</b>	USP144		Burbank
<b>G139</b>	USP145		Ester Hess Yellow
<b>G140</b>	USP146		Peasant
<b>G142</b>	USP148	LA0791	Long Jhon
<b>G143</b>	USP149	FAP0002	
<b>G144</b>	USP150	FAP0001	
<b>G145</b>	USP153	FAP0005	
<b>G146</b>	USP154		Tomate Italiano para molhos (Topseed)
<b>G147</b>	USP155		Tomate Pêra Amarelo (Topseed)
<b>G148</b>	USP156	PNZ006	TSW-10 CNPH
<b>G149</b>	USP157	PNZ009	AG 45 (Ohio 8245)

<b>Código do genótipo</b>	<b>Acesso USP</b>	<b>Acesso</b>	<b>Cultivar</b>
G151	USP158B	PNZ102	Rotam-4 (1)
G152	USP159A	PNZ100	Stevens
G153	USP160	PNZ103	Rodade (1)
G154	USP161	PNZ223	Vietnamita-BWR
G155	USP162		PCV-01
G156	USP163		Hawaii 7996
G161	GT0012		CAL J, LOTE: 478 1041
G163	GT0027		SEED 062 CAMARILLO
G164	GT0028		SEED 062 PETOEARLY
G166	GT0033		FPA-4
G170	GT0056		NEMADORO
G177	GT0084		EARLY CASCADE 312
G179	GT0087		Saint Pierre (2)
G180	GT0092		VF 90
G186	GT0102		CARAÍBA
G188	GT0104		SEED VF 198
G190	GT0106		SEED NAPOLI VF
G194	GT0117		PETO 13
G195	GT0127		FARLYSTONE, LOTE: 5921006
G197	GT0130		PETOEARLY, LOTE: 6721067
G198	GT0131		RIO GRANDE, LOTE: 7457042
G199	GT0135		SANTA CRUZ KADA
G200	GT0137		PIRACÓ
G201	GT0138		PIRACÓ PROJETO III
G205	GT0150		SANTA CRUZ ANODA
G206	GT0162		CASTLONG, LOTE: 2237-69
G207	GT0163		CASTLEBLOCK, LOTE: 2299-245
G208	GT0164		CASTLESTAR EHV, LOTE: 2627
G209	GT0165		UC - 82-A, LOTE: 2556
G210	GT0166		CASTLEMOR IMP., LOTE: 2416-15
G211	GT0167		CALYPSO, LOTE: 2697
G214			Tomate Cereja Samambaia (Tradicional Hortaliças)
G215			Santa Clara (Hortec)
G216			San Marzano PCS 9/2001 (LG)
G217			Minitomate Acesso 21 - IAC (melhor)
G219			Cuor di bue (Hortus Sementi)
G220			Saint Pierre (3) (Hortus Sementi)
G221			Santa Cruz Kada Gigante (Topseed)
G222			San Marzano (Landen)
G223		IAC-1689	Homesweet Heirloom
G224		IAC-1693	Aussie Heirloom
G225		IAC-1691	Black Prince Heirloom
G226		IAC-1692	Costoluto genovese (multiplicação)
G227		IAC-1692	Costoluto genovese
G228		IAC-1696	Caspian Pink Heirloom
G229		IAC-1695	Purple Russian Heirloom
G230		IAC-1697	Cherokee Purple Heirloom
G231		IAC-1694	Goliath Tomato

<b>Código do genótipo</b>	<b>Acesso USP</b>	<b>Acesso</b>	<b>Cultivar</b>
G232		IAC-1693	Aussie Tomato
G233		IAC-1690	Black Krim Heirloom
G234			Tomate Santa Cruz
G235		IAC-1612	Peacevine
G236		IAC-1613	S.T. Pierre
G237		IAC-1614	Money Marker
G239		IAC-1615	Matina
G240		IAC-1617	Arkansas Trveller
G241		IAC-1619	Stupice
G242		IAC-1618	Bruno Simonetti
G243		IAC-1605	Uco Plata
G244		IAC-1606	TSW-10
G245		IAC-1607	Mars
G246		IAC-1608	ILDI Naranja
G247		IAC-1610	Black Plum Paste
G248		IAC-1611	Cradwich
G249		CGT-01	Linha de origem desconhecida
G250		CGT-03	Missouri 91
G251		CGT-04	Missouri 93
G253		CGT-06	Romitel (1)
G255		CGT-14	Rio Fuego (1)
G257		CGT-21-1	Hirolo (Vermelho)
G259		CGT-22	Rio Grande
G260		CGT-23	UC 105
G261		CGT-25	Rotec
G262		CGT-26	Rossol
G263		CGT-27	Rio Fuego (2)
G264		CGT-28	Hoffit (1)
G265		CGT-29	Mecline
G266		CGT-32	Heinz 1548
G267		CGT-33	M 204
G269		CGT-35-1	Dela Plata
G270		CGT-36	M 145 (Saladette)
G271		CGT-37	PU 7328 (bu)
G272		CGT-38	Romitel (2)
G273		CGT-43	Santa Adélia Super
G275		CGT-45	Roqueso (Ag. 591)
G276		CGT-47	Santa Clara Albino
G277		CGT-48	Olho Roxo
G279		CGT-52	Floradade (F2 Ve Sm)
G280		CGT-54	Calypso
G282		CGT-57	Angela Hiper
G283		CGT-58	Europeel
G284		CGT-62	Missouri
G285		CGT-64	Príncipe Gigante Ag. 590
G286		CGT-67	Yoshimatsu-4 (INPA)
G287		CGT-68	Hoffit (2)
G288		CGT-72	Rimone

---

<b>Código do genótipo</b>	<b>Acesso USP</b>	<b>Acesso</b>	<b>Cultivar</b>
G289		CGT-73	Licapal
G291		CGT-77	Romitel (3)
G292		CGT-84	Santo Antonio
G293		CGT-85	Motelle
G294		CGT-88	Tropicana
G295		CGT-90	Rotam-4 (2)
G296		CGT-91	Rodade (2)
G297		CGT-97	Olho Roxo Melhorado
G298		CGT-98	P213 - PA (Tropicana)
G299			Tomate Ferraz Ipa-8 (Hortivale)
G326		GT0048	PAKMOR (VF)
G336		GT0077	HEINZ 1350
G337		GT0085	SUPERMARKET 87170
G343		GT0101	MECANO
G348		GT0118	TROPIC
G359		GT0181	"VERDINHO"

---