

INTERAÇÃO DE PLANTAS COM PATÓGENO E PRAGA:
MÉTODOS DE ANÁLISES DA RESISTÊNCIA EM FEIJÃO-COMUM,
TOMATE E PIMENTÃO

ELISÂNGELA KNOBLAUCH VIEGA DE ANDRADE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2020

**INTERAÇÃO DE PLANTAS COM PATÓGENO E PRAGA:
MÉTODOS DE ANÁLISES DA RESISTÊNCIA EM FEIJÃO-COMUM,
TOMATE E PIMENTÃO**

ELISÂNGELA KNOBLAUCH VIEGA DE ANDRADE

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientadora: Prof.^a Rosana Rodrigues

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

A553

Andrade, Elisângela Knoblauch Viega de.

Interação de plantas com patógeno e praga : métodos de análises da resistência em feijão-comum, tomate e pimentão / Elisângela Knoblauch Viega de Andrade. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

141 f. : il.

Bibliografia: 96 - 128.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.
Orientadora: Rosana Rodrigues.

1. *X. Axonopodis* pv. *phaseoli*. 2. *Botrytis cinerea*. 3. Imagem Térmica. 4. Índices de Vegetação. 5. Proteínas de Defesa. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

**INTERAÇÃO DE PLANTAS COM PATÓGENO E PRAGA:
MÉTODOS DE ANÁLISES DA RESISTÊNCIA EM FEIJÃO-COMUM,
TOMATE E PIMENTÃO**

ELISÂNGELA KNOBLAUCH VIEGA DE ANDRADE

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas”

Aprovada em 18 de fevereiro de 2020.

Comissão Examinadora:



Prof.^a Valdirene Moreira Gomes (D.Sc. em Ciências) – UENF



Prof. Geraldo de Amaral Gravina (D.Sc. Fitotecnia) – UENF



Prof. Iván Francisco García Tejero (D.Sc. Ciências Biológicas) – IFAPA



Prof.^a Rosana Rodrigues (D.Sc. Produção Vegetal) – UENF
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, pelo dom da minha vida e pela força espiritual para a realização desta pesquisa.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação e concessão da bolsa de doutorado.

Às instituições que apoiaram com recurso financeiro no projeto de pesquisa: CNPq, Capes, FAPERJ e UENF.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

Ao *Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera* (IFAPA), Sevilla-Espanha, onde realizei o doutorado sanduíche, durante 6 meses. Minha eterna gratidão pela oportunidade e disponibilidade de infraestrutura física para a realização do trabalho, e por todo apoio no decorrer dos trabalhos.

À minha família, meus pais, Elisabeth e Washington e, meus irmãos Wallynson e Wanderson e minha sobrinha Yasmin por todo o amor, carinho e incentivo, para que eu chegasse até aqui. Obrigada por compreenderem minha ausência durante esses anos. Vocês sempre serão meu porto seguro!

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Rosana Rodrigues, pela oportunidade e por ter me acolhido na sua equipe de pesquisa, pela orientação e ensinamentos durante o curso.

Aos meus coorientadores no exterior Prof. Dr. Ivan Francisco García Tejero e Prof.^a Dr.^a Ana Aguado Puig, pelos ensinamentos, confiança e pela oportunidade de realizar parte desta pesquisa durante o doutorado sanduíche.

Às professoras Dr.^a Valdirene Moreira Gomes e Dr.^a Antônia Elenir Amâncio Oliveira, por disponibilizar todos os recursos necessários para realização das análises laboratoriais, pelos ensinamentos e pela expressiva contribuição neste trabalho.

À Dr.^a Gabriela Bard e o doutorando Kayan Ventury, pelos incansáveis auxílios laboratoriais, pela paciência, ensinamentos, disponibilidade e contribuição direta na realização desta pesquisa.

À Lídia e Thaynã pela colaboração durante as análises laboratoriais, pela amizade e pela contribuição nessa pesquisa.

Ao secretário do programa Daniel, pela competência, paciência, disponibilidade e constantes ajudas fornecidas, sempre bem prestativo.

À Dr.^a Cláudia Pombo, pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade e contribuição no desenvolvimento desta pesquisa.

À equipe do Laboratório 110 “Somos Resistentes”: Anderson, André, Dr.^a Cláudia Lougon, Gaspar, Jefferson, Karina, Maria do Socorro, Rosimara, Sabrina, Dr.^a Thâmara e Paola (ordem alfabética). Por todos os momentos de descontração nesses quatro anos de doutorado e, por toda a ajuda na instalação, condução e avaliação dos experimentos.

À “República Chicas”: Débora e Ionara, e as agregadas Maiara e Letícia, pelos momentos inesquecíveis compartilhados no doutorado sanduíche, pela amizade e carinho. Obrigada pelo companheirismo e lutas. Sevilla tiene un color especial...

Às companheiras de república em Campos: Juliana e Gabi, por todos os momentos de descontração e, por dividir os momentos difíceis nessa reta final, mesmo estressadas conseguiram dar força uma a outra.

Ao Fábio por ser meu companheiro, por me ajudar nos finais de semana no experimento na Pesagro, por me motivar, por me impulsionar e dar conselhos para ser uma pessoa melhor. Obrigada por tudo!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo Geral.....	5
2.2. Objetivos Específicos	5
3. CAPÍTULOS	7
3.1. TERMOGRAFIA POR INFRAVERMELHO NA DETECÇÃO PRECOCE DO MOFO CINZENTO EM FRUTOS DE TOMATEIRO E PIMENTÃO NA FASE DE PÓS-COLHEITA	7
3.1.1. INTRODUÇÃO	7
3.1.2. REVISÃO DE LITERATURA	10
3.1.2.1. A Família Solanaceae.....	10
3.1.2.1.1. Aspectos gerais da cultura do tomateiro.....	10
3.1.2.1.2. Aspectos gerais da cultura do pimentão.....	12
3.1.2.2. Mofo cinzento – <i>Botrytis cinerea</i>	14
3.1.2.3. Imagem termográfica por infravermelho	16
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1.3.1. Localização e Germoplasma	17
3.1.3.2. Obtenção e preparo do inóculo fúngico	18
3.1.3.3. Inoculação e incubação dos frutos	18

3.1.3.4. Avaliação da reação ao Mofo Cinzento	20
3.1.3.4.1. Imagem termográfica por infravermelho	20
3.1.3.5. Análise estatística.....	21
3.1.4. RESULTADOS	22
3.1.5. DISCUSSÃO	26
3.1.6. CONCLUSÕES.....	29
3.2. DETECÇÃO PRÉ-SINTOMÁTICA DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM EM <i>Phaseolus vulgaris</i> L., POR MEIO DE IMAGENS TERMOGRÁFICAS E DE ÍNDICES DE REFLECTÂNCIA FOLIAR.....	30
3.2.1. INTRODUÇÃO.....	30
3.2.2. REVISÃO DE LITERATURA	33
3.2.2.1. Aspectos gerais da cultura do feijoeiro-comum	33
3.2.2.2. Crestamento Bacteriano Comum (CBC).....	35
3.2.2.3. Índice de reflectância foliar	36
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.2.3.1. Germoplasma	39
3.2.3.2. Localização e condições experimentais	39
3.2.3.3. Preparo do inóculo bacteriano	40
3.2.3.4. Inoculação em folhas.....	40
3.2.3.5. Avaliação da reação ao CBC.....	41
3.2.3.5.1. Imagem termográfica por infravermelho	41
3.2.3.5.2. Índices de reflectância foliar	42
3.2.3.5.3. Escala de notas de severidade.....	44
3.2.3.5.4. Período de Incubação (PI).....	45
3.2.3.6. Análise estatística.....	45
3.2.3.6.1. Imagem termográfica por infravermelho	46
3.2.3.6.2. Índice de reflectância foliar	46
3.2.3.6.3. Escala de notas de severidade.....	47
3.2.4. RESULTADOS	47
3.2.4.1. Análise de variância.....	47
3.2.4.2. Avaliação da reação ao CBC.....	49
3.2.4.2.1. Imagem termográfica por infravermelho	49
3.2.4.2.2. Índice de reflectância foliar	52
3.2.4.2.2.1. Análise espectral	52

3.2.4.2.2.2. Análise de correlação	57
3.2.4.2.3. Escala de notas de severidade.....	58
3.2.4.2.3.1. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)	58
3.2.4.2.4. Período de Incubação (PI).....	59
3.2.5. DISCUSSÃO	59
3.2.6. CONCLUSÕES	64
3.3. IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA, E PAPEL DAS PROTEÍNAS DE DEFESA A PARTIR DESEMENTES DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-COMUM EM RESPOSTA À INFESTAÇÃO DE <i>Callosobruchus maculatus</i>	66
3.3.1. INTRODUÇÃO	66
3.3.2. REVISÃO DE LITERATURA	68
3.3.2.1. Mecanismo de defesa das plantas	68
3.3.2.2. Peptídeos antimicrobianos de plantas (AMPs)	69
3.3.2.3. Caruncho – <i>Callosobruchus maculatus</i>	71
3.3.3. MATERIALE MÉTODOS	73
3.3.3.1. Sementes	73
3.3.3.2. Microrganismos	74
3.3.3.3. Insetos	74
3.3.3.4. Localização dos ensaios laboratoriais	74
3.3.3.5. Extração de Proteínas	74
3.3.3.5.1. Preparo da farinha.....	74
3.3.3.5.2. Extração de proteínas.....	75
3.3.3.6. Quantificação de proteínas.....	77
3.3.3.7. Eletroforese em gel de tricina	77
3.3.3.8. <i>Western Blotting</i>	77
3.3.3.9. Ensaio de inibição das α -amilases	78
3.3.3.10. Ensaio para a atividade da tripsina residual	78
3.3.3.11. Efeito da proteína sobre o crescimento fúngico.....	79
3.3.3.12. Sementes naturais de feijão-comum infestadas com <i>C. maculatus</i> ...	79
3.3.3.13. Sementes artificiais cobertas com tegumento de sementes de feijão-comum infestadas com <i>C. maculatus</i>	80
3.3.3.14. Análise estatística.....	81
3.3.4. RESULTADOS	81

3.3.4.1. Perfis Eletroforéticos das Proteínas.....	81
3.3.4.2. <i>Western Blotting</i>	83
3.3.4.3. Atividade inibitória das enzimas α -amilases	83
3.3.4.4. Atividade inibitória da tripsina	85
3.3.4.5. Efeito da proteína sobre o crescimento fúngico.....	85
3.3.4.6. Desempenho e sobrevivência de <i>C. maculatus</i> em sementes naturais de feijão-comum	86
3.3.4.7. Desempenho e sobrevivência de <i>C. maculatus</i> em sementes artificiais cobertas com tegumento de feijão-comum.....	88
3.3.5. DISCUSSÃO	88
3.3.6. CONCLUSÕES	92
4. CONCLUSÃO GERAL	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

RESUMO

ANDRADE, Elisângela Knoblauch Viega; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro, 2020. Interação de plantas com patógeno e praga: métodos de análises da resistência em feijão-comum, tomate e pimentão. Orientadora: Rosana Rodrigues; Conselheiros: Valdirene Moreira Gomes e Geraldo de Amaral Gravina.

Novos métodos para se estudar a interação das plantas com patógenos e pragas são necessários, a fim de auxiliar melhoristas na identificação, seleção de genótipos resistentes e minimizar o uso de agrotóxicos na agricultura. A termografia infravermelha e os índices de vegetação são técnicas promissoras na detecção pré-sintomática de doenças e na fenotipagem de plantas. Concomitantemente, estudos com proteínas e peptídeos antimicrobianos (AMPs) têm demonstrado o seu papel de defesa contra uma ampla gama de insetos e microrganismos. O primeiro capítulo objetivou-se desenvolver um novo protocolo na detecção precoce do mofo cinzento em frutos pós-colheita de tomate e pimentão, com base na aplicação da termografia infravermelha. Este trabalho foi realizado no IFAPA, Sevilla-Espanha. Frutos de tomate e pimentão foram inoculados por infiltração [*Botrytis cinerea*, $1,7 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹], incubados em câmara de crescimento. Após 24h, os frutos foram fotografados com uma câmera termográfica, durante 13 dias. Os resultados mostraram uma temperatura mais baixa nos frutos de tomate e pimentão infectados, três dias antes dos sintomas visíveis aparecerem. No segundo capítulo, objetivou-se desenvolver um protocolo

na detecção pré-sintomática do crestamento bacteriano comum (CBC) em feijoeiro, com base na aplicação da termografia infravermelha e dos índices de vegetação. Oito acessos foram testados em casa de vegetação, com cinco repetições. Quinze dias após a semeadura, a folha central de cada planta foi inoculada por infiltração [*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*-Xap]. Após 24h, as plantas foram avaliadas por uma câmera termográfica, espectrômetro foliar, período de incubação-PI e escala de notas (para cálculo da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença-AACPD), durante cinco dias. Observou-se uma temperatura elevada nas folhas inoculadas. O acesso UENF 2252 foi resistente ao CBC, pela termografia, AACPD e PI. Todos os métodos de avaliação indicaram o acesso UENF 2365 como suscetível ao CBC. No terceiro capítulo, objetivou-se identificar AMPs em acessos de *Phaseolus vulgaris* e avaliar o seu papel biológico na defesa das sementes. Dezenove acessos de feijão-comum foram submetidos à extração proteica e estas foram separadas por eletroforese em gel de tricina. A atividade inibitória das α -amilases, tripsina e desenvolvimento dos fungos (*Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium solani*) foram determinados em 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para avaliara taxa de postura e o desenvolvimento do *Callosobruchus maculatus* foram realizados experimentos com sementes naturais de feijão-comum e sementes artificiais (*Vigna unguiculata* com tegumento de *P. vulgaris*). Proteínas transportadoras de lipídeos-LTPs foram identificadas em nove acessos, já as defensinas em todos os acessos. Todos os extratos inibiram a atividade das α -amilases, e 78,9% inibiram a tripsina. Nenhuma atividade antifúngica foi detectada. Sementes naturais não inibiram a oviposição, no entanto, as larvas não sobreviveram após a dieta com estas sementes. Sementes artificiais inibiram a oviposição, indicando que o tegumento da semente foi também repelente para insetos. Termografia e índices de vegetação representam ferramentas promissoras para detectar precocemente doenças em vegetais. Identificou-se a presença de AMPs como LTPs e defensinas de plantas, com capacidade de inibir as enzimas α -amilases e tripsina relacionadas à defesa contra insetos, em sementes de feijoeiro, podendo colaborar para uma melhor compreensão da interação de planta com patógeno e praga.

Palavras-chave: *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *Botrytis cinerea*, imagem térmica, índices de vegetação, proteínas de defesa, tegumento de semente.

ABSTRACT

ANDRADE, Elisângela Knoblauch Viega; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2020. Interaction of plants with pathogen and pest: methods of analysis for resistance in common bean, tomato and bell pepper. Advisor: Rosana Rodrigues. Committee members: Valdirene Moreira Gomes and Geraldo de Amaral Gravina.

New methods to study plant interaction with pathogens and pests are necessary in order to assist improvers in the identification, selection of resistant genotypes and minimize the use of pesticides in agriculture. Thermography imaging and vegetation indexes are promising techniques in early presymptomatic detection of diseases and phenotyping of plants. Concomitantly, studies with antimicrobial proteins and peptides (AMPs) have demonstrated their defense role against a wide range of insects and microorganisms. The first chapter, the objective was to develop a new protocol for the early detection of gray mold in post-harvest in tomato fruits and bell pepper, based on the application of infrared thermography. This work was carried out at IFAPA, Sevilla-Spain. Tomato and bell pepper fruits were inoculated by infiltration [*Botrytis cinerea*, 1.7×10^6 spores.mL⁻¹], incubated in a growth chamber. After 24h, the fruits were photographed with a thermographic camera, for 13 days. The results showed a lower temperature in the infected tomato and bell pepper fruits, three days before the visible symptoms appeared. In the second chapter, the objective was to develop a protocol for the presymptomatic detection of common bacterial blight (CBB) in common beans, based on the application of infrared thermography and

vegetation indexes. Eight genotypes were tested in a greenhouse, with five replications. Fifteen days after sowing, the central leaf of each plant was inoculated by infiltration [*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*-*Xap*], 10^5 cfu.mL⁻¹]. After 24h, the plants were evaluated by a thermographic camera, leaf spectrometer, incubation period-IP and scale of notes (for calculation of Area Under Disease Progression Curve-AUDPC), for five days. A higher temperature was observed in the inoculated leaves. UENF 2252 access was resistant to CBB by thermography, AUDPC and IP. All methods indicated UENF 2365 access as susceptible to CBB. In the third chapter, the objective was to identify AMPs in *Phaseolus vulgaris* accessions and evaluate their biological role in the defense of seeds. Nineteen common bean accessions were subjected to protein extraction and separated by tricine gel electrophoresis. The inhibitory activity of α -amylase, trypsin and fungal development (*Colletotrichum lindemuthianum* and *Fusarium solani*) were determined at 50 μ g.mL⁻¹. To evaluate the rate of oviposition and development of *Callosobruchus maculatus*, experiments were carried out with natural seeds common bean and artificial seeds (*Vigna unguiculata* with seed coats of *P. vulgaris*). Lipid transfer proteins-LTPs were identified in nine accessions whereas defensins were present in all accessions. All extracts inhibited the activity of α -amylases, and 78.9% inhibited trypsin. None antifungal activity was detected. Natural seeds did not inhibit oviposition however, the larvae did not survive after feeding on these seeds. Artificial seeds inhibited the oviposition, indicating that the seed coat was also repellent to insect. Thermography and vegetation indexes represent promising tools for early detection of plant diseases. The presence of AMPs such as LTPs and plant defensin was identified, with the ability to inhibit the enzyme α -amylases and trypsin related to defense against insects, in bean seeds, that can collaborate for a better understanding of the interaction plant with pathogen and pest.

Keywords: *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *Botrytis cinerea*, thermal imaging, vegetation indexes, defense proteins, seed coat.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Diversos tipos de patógenos de plantas são responsáveis por grandes perdas econômicas na agricultura em todo o mundo a cada ano (Agrios, 2005; Barón et al., 2016). A preocupação da sociedade com o impacto negativo da agricultura convencional sobre as questões ambientais, e a saúde de agricultores e consumidores, vem alterando o cenário agrícola, em buscas de medidas alternativas em relação aplicação de agroquímicos para o controle de pragas e doenças na lavoura (Pérez-Bueno et al., 2016a). Dados da FAO em 2013 apontam o Brasil como um dos principais países consumidores de agrotóxicos do mundo, com gasto em média de US\$ 10 bilhões por ano.

Solanáceas, como o tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e o pimentão (*Capsicum annuum* L.), são altamente suscetíveis ao ataque de vários tipos de patógenos, principalmente por fungos, como *Botrytis cinerea*, responsável pela doença do mofo cinzento. O fungo é cosmopolita, e o sintoma comum é um bolor cinzento, que pode infectar diversos órgãos da planta (Agrios, 2004; Bower, 2007; Mitcham, 2007), podendo provocar grandes perdas, principalmente na fase de pós-colheita (Productores de Hortalizas 2004; Lopes e Ávila, 2005).

No feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a maior perda da produtividade ocorre devido à ocorrência de pragas e doenças, que afetam sua produção (Carneiro et al., 2015). Uma das principais doenças nessa cultura é o Crestamento Bacteriano Comum (CBC), causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Thung e Sartorato, 2002; Bianchini et al., 2005). A

doença se manifesta em toda a parte aérea da planta. Os sintomas característicos nas folhas são pequenas áreas encharcadas e, à medida que se desenvolvem, os tecidos foliares se tornam secos e quebradiços, circundados por estreito halo amarelo (Sartorato e Rava, 1994).

Práticas de controle para essas doenças nas variedades tradicionais são basicamente com a aplicação de agrotóxicos, entretanto, o uso indiscriminado e a má aplicação destes na agricultura geram dano econômico e impacto ecológico (Ribas e Matsumura, 2009). Conforme o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, 6% das amostras de feijão, 12% de tomate e 90% dos pimentões analisados estavam insatisfatórios, tanto pela presença de resíduos de agrotóxicos acima do limite máximo permitido, quanto pela presença de resíduos de produtos não autorizados para a cultura (ANVISA, 2013).

Novas tecnologias agrícolas com base em métodos não destrutivos e não invasivos são essenciais para detectar precocemente doenças em plantas, a fim de reduzir a fonte de inóculo e facilitar as práticas de proteção em vegetais, minimizando o uso de defensivos agrícolas (Khirade e Patil, 2015; Barón et al., 2016). Dentre esses métodos, a termografia por infravermelho e os índices de reflectância foliar fornecem informações importantes para a rápida tomada de decisões no controle, pois é possível a ação de patógenos ser detectada (Singh et al., 2016; Mahlein et al., 2016).

A termografia infravermelha consiste em capturar imagens com uma câmera térmica, que mede a temperatura do vegetal e tem a possibilidade de ser utilizada como um método de fenotipagem e diagnose precoce de doenças, causadas por organismos diversos (Mahlein et al., 2016; Mahlein et al., 2019). A temperatura do vegetal está correlacionada com a perda de vapor de água por transpiração (Jones et al., 2002; Costa et al., 2013b), devido a algum tipo de estresse, como a atuação de agentes patogênicos, podendo a técnica da termografia ser usada no diagnóstico precoce de doenças de plantas (Oerke et al., 2006; Barón et al., 2016). A mensuração da doença é feita pelo diferencial de temperatura, entre o tecido vegetal doente com o saudável, assim, a doença pode ser detectada antes do aparecimento dos primeiros sintomas visíveis.

Medidas de reflectância foliar têm sido utilizadas em diferentes situações de estresse em culturas agrícolas, através de alterações biofísicas e bioquímicas da planta, como redução da biomassa, teor de clorofila, antocianina e carotenoide,

bem como transformações na morfologia interna das folhas (Gitelson et al., 2001; Barton, 2012; Mahajan et al., 2014). A avaliação da doença é feita através da reflectância da radiação solar em certos comprimentos de onda e, estimada por sensores espectrais (Dalla Pria e Silva, 2010). Isso é possível porque as plantas doentes apresentam diferenças nos espectros de reflectância quando comparada com as plantas saudáveis (Marin et al., 2019a), uma vez que os agentes patogênicos alteram o estado fisiológico da planta.

Na literatura, trabalhos têm abordado o emprego de imagens termográficas e dos índices de vegetação no diagnóstico precoce de doenças em plantas. Na termografia, a maioria deles é focada em infecções fúngicas (Lindenthal et al., 2005; Oerke et al., 2006; Oerke et al., 2011; Wang et al., 2012; Belin et al., 2013; Raza et al., 2015a; Raza et al., 2015b; Jafari et al., 2016; Jafari et al., 2017; Mahlein et al., 2019; Wen et al., 2019), alguns poucos relatos em bactérias (Chiwaki et al., 2005; Pérez-Bueno et al., 2015; Pérez-Bueno et al., 2016a; Pérez-Bueno et al., 2016b) e vírus (Chaerle et al., 1999; Chaerle et al., 2004; Chaerle et al., 2006). No entanto, pesquisas com índices de vegetação são menos populares, alguns trabalhos foram relatados com fungos (Silva et al., 2009; Hikishima et al., 2010; Boechat et al., 2014; Lin et al., 2018; Arantes et al., 2019; Mahlein et al., 2019; Marin et al., 2019b), bactérias (Marin et al., 2019a; Pedrali et al., 2019) e vírus (Steddom et al., 2003; Janeczko et al., 2018). Entretanto, ainda não foi descrito a aplicação dessas técnicas nos patossistemas *P. vulgaris* – *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, tomateiro – *B. cinerea* e pimentão – *B. cinerea*.

Estudos com proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana (AMPs) têm demonstrado o seu papel de defesa contra uma ampla gama de insetos e microrganismos patogênicos (Games et al., 2008; Egorov e Odintsova, 2012; Mello et al., 2014; Campos et al., 2018). Estes AMPs têm despertado o interesse da engenharia genética para o desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças causadas por agentes patogênicos, de forma a reduzir, significativamente, o uso excessivo de produtos agrotóxicos nas culturas agrícolas (Reddy et al., 2004; Holaskova et al., 2015).

As sementes de leguminosas são uma importante fonte de nutrientes para o homem e para os animais. No entanto, parte da produção de sementes é perdida devido a ataques de insetos, principalmente, pelo gorgulho *Callosobruchus maculatus*. Este inseto é de considerável importância como uma

praga cosmopolita, pois ataca diversas espécies de leguminosas importantes como *Glycine max*, *Lens culinaris*, *Canavalia ensiformis*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata* (Staneva, 1982; Kingsolver, 2004). Um método eficiente de controlar a infestação de semente é o uso de cultivares resistentes a insetos (Cruz et al., 2016). Diversas pesquisas descreveram que a toxicidade do tegumento de sementes de leguminosas afetou o desenvolvimento de larvas e insetos de *C. maculatus* (Moraes et al., 2000; Silva et al., 2004; Cruz et al., 2016; De Sá et al., 2018), e também devido presença de fitoquímicos tóxicos e/ou repelentes (De Sá et al., 2014).

Novas abordagens de detecção com mais precisão e rapidez são necessárias na diagnose de doenças em plantas. A utilização de métodos de análises como imagens termográficas e de índices de vegetação fornecem um diagnóstico mais preciso, objetivo e, mais rápido do que as avaliações visuais. Concomitantemente, pesquisas vêm demonstrando a função de proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana, em diferentes espécies de plantas e sementes, contra uma vasta gama de microrganismos patogênicos e insetos. Estas novas ferramentas de análises geram informações importantes para um maior entendimento da interação de plantas com patógeno e praga para o desenvolvimento de cultivares resistentes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer protocolos otimizados de estudos da interação de plantas com patógeno e praga por meio de métodos de análises da resistência a doenças em feijão-comum, tomate e pimentão.

2.2. Objetivos Específicos

- I. Analisar a reação de frutos de tomate e pimentão na fase de pós-colheita, quanto ao mofo cinzento, por meio de imagens termográficas, para a detecção pré-sintomática da doença em frutos;
- II. Analisar a reação de acessos de feijão-comum quanto à resistência ao crestamento bacteriano comum, por meio de imagens termográficas, índices de reflectância foliar e escalas denotas de severidade da doença;
- III. Indicar germoplasma resistente ao crestamento bacteriano comum, para uso em programas de melhoramento de feijão-comum visando o desenvolvimento de cultivares resistentes;

- IV. Identificar a presença de peptídeos antimicrobianos e investigar a atividade inibitória dos extratos proteicos de diferentes acessos de feijão-comum sobre as α -amilases salivar humana e larval do inseto *Callosobruchus maculatus*, a enzima da tripsina, bem como o crescimento dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium solani*;
- V. Investigar o efeito de sementes naturais de feijão-comum e sementes artificiais cobertas com tegumento de sementes de feijão-comum sobre a oviposição e desenvolvimento de insetos *C. maculatus*;
- VI. Identificar a resistência múltipla em feijão-comum ao cretamento bacteriano comum e ao inseto *C. maculatus*.

3. CAPÍTULOS

3.1. TERMOGRAFIA POR INFRAVERMELHO NA DETECÇÃO PRECOCE DO MOFO CINZENTO EM FRUTOS DE TOMATEIRO E PIMENTÃO NA FASE DE PÓS-COLHEITA

3.1.1. INTRODUÇÃO

A detecção precisa e precoce de patógenos no monitoramento de doenças em plantas é a chave para reduzir a propagação de microrganismos e facilitar as práticas de controle. Além disso, é importante identificar e selecionar genótipos resistentes para mitigar as perdas no campo e reduzir a aplicação de agroquímicos (Khirade e Patil, 2015; Barón et al., 2016).

No diagnóstico de doenças, os métodos mais utilizados são as escalas de notas, escalas diagramáticas e contagem de número e diâmetro de lesões (Vale et al., 2004a). Monitorar e diagnosticar doenças de plantas visualmente é uma tarefa muito intensa, exige uma grande quantidade de trabalho, além de pessoas qualificadas para o diagnóstico de doenças vegetais, o que demanda um tempo maior para o processamento de dados (Khirade e Patil, 2015). Além disso, a doença só pode ser identificada após o surgimento dos primeiros sintomas, juntamente com sinais visíveis do patógeno.

A agricultura moderna necessita de novas ferramentas para otimizar o diagnóstico de doenças em plantas, visto que a detecção pré-sintomática de anomalias em plantas é ainda uma área em desenvolvimento (Sankaran et al., 2010; Raza et al., 2014; Raza et al., 2015).

A adoção de métodos não invasivos é um pré-requisito importante para o controle preciso de pragas e doenças em sistemas de produção agrícola (Sandmann et al., 2018). Dentre estas ferramentas atualmente disponíveis, tem-se a termografia por infravermelho, uma técnica promissora para o estudo da interação planta-patógeno. Essa técnica é uma alternativa não-destrutiva que fornece informações cruciais para a rápida tomada de decisão na detecção precoce de estresses abióticos e bióticos em plantas (Singh et al., 2016).

A termografia permite o monitoramento por meio de imagens capturadas por uma câmera térmica por infravermelho, e pode ser usada para diagnosticar precocemente diversos tipos de doenças em plantas (Lindenthal et al., 2005; Oerke et al., 2006; Raza et al., 2015; Mahlein et al., 2019; Wen et al., 2019). As imagens térmicas avaliam a temperatura da planta e têm a capacidade de visualizar mudanças na transpiração foliar durante o ataque de patógenos, pois está relacionada com seu estado hídrico que pode alterar a temperatura na superfície do órgão (Jones et al., 2002; Oerke et al., 2006; Barón et al., 2016). O perfil térmico e/ou espaço de tempo entre o início e a aparência visível de doença podem variar dependendo do sistema patológico. Esta informação é um passo importante para a detecção precoce de uma possível patologia, independentemente do tipo de doença ou de cultura agrícola (Raza et al., 2015).

Em diversas culturas de plantas, os fungos podem causar danos econômicos mais do que qualquer outro grupo de microrganismo, com perdas estimadas em mais de 200 milhões de dólares por ano (Birren et al., 2002). Dentre os patógenos fúngicos que mais causam problemas fitossanitários no tomateiro e no pimentão estão aqueles causadores de doenças de podridão, dentre os quais, se destaca o mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* Pers. Fr. (teleomorphic *Botryotinia fuckeliana* [de Bary] Whetzel).

A doença do mofo cinzento é caracterizada por um bolor cinzento, uma das doenças fúngicas mais comuns e amplamente distribuídas no mundo (Agrios, 2004; Bower, 2007; Mitcham, 2007), que pode infectar flores, frutos, folhas e caules (Elad et al., 2004). O fungo é um fitopatógeno necrotrófico não específico,

capaz de colonizar mais de 235 espécies de plantas cultivadas, e causar grandes perdas e danos econômicos em culturas e em frutos pós-colheita (Williamson et al., 2007; Tofoli et al., 2011). A infecção de plantas por *B. cinerea* pode levar à desfolha severa, morte de flores (Shtienberg et al., 1998), redução no valor de mercado, lesões de caule e, conseqüentemente, morte das plantas (Dik et al., 1999). Para que a infecção ocorra, o patógeno necessita de temperatura entre 18 e 23 °C, sendo que temperaturas acima de 24 °C inibem a germinação dos conídios (Vale et al., 2004b).

Em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), o sintoma típico de infecção por *B. cinerea* é o surgimento de uma podridão mole dos frutos, acompanhada por colapso e imersão de água nos tecidos do parênquima, seguido por um rápido aparecimento de bolor cinzento de conídios (Williamson et al., 2007). Nos frutos maduros de tomates, além da podridão mole, observa-se nos frutos infectados o desenvolvimento de uma coloração que varia de bege ao cinza, que se dissemina a partir do ápice do fruto ou do pedicelo, que fica coberta por um bolor cinzento. Nos frutos verdes de tomate, a doença surge em forma de anéis esbranquiçados com um ponto necrótico no centro, um sintoma incomum que é associado à defesa do hospedeiro, embora seja bem-sucedida do ponto de vista de defesa, torna os frutos não comercializáveis (Williamson et al., 2007; Tofoli et al., 2011; Romanazzi e Feliziani, 2014).

Em pimentão (*Capsicum annuum* L.), as lesões iniciais são pontuais e caracterizadas por aspecto aquoso. À medida que a doença progride, essas lesões evoluem para manchas de coloração verde-amarelado ou cinzento-amarelada, úmidas, irregulares, macias com textura esponjosa em estádios adiantados do mofo cinzento (Tofoli et al., 2011).

A detecção precoce de doenças em frutos pós-colheita merece atenção, não somente pelas perdas econômicas que os agentes infecciosos provocam, mas também para se otimizar práticas de manejo voltadas a redução do uso de agroquímicos, que visem aumentar a vida de prateleira dos produtos. Este trabalho reporta o estabelecimento de um protocolo de detecção de resposta da interação planta-patógeno por meio do uso de imagem termográfica que traz maior robustez nas análises de reação a doenças em frutos na fase de pós-colheita, utilizando como modelos os patossistemas *Solanum lycopersicum* L. – *B. cinerea* e *Capsicum annuum* L. – *B. cinerea*.

3.1.2. REVISÃO DE LITERATURA

3.1.2.1. A Família Solanaceae

A família Solanaceae A. L. Jussieu (1789), pertence ao grupo das dicotiledôneas considerada uma das mais representativas entre as angiospermas, reunindo cerca de 2500 espécies agrupadas em aproximadamente 100 gêneros (Olmstead e Bohs, 2007). Esta família é conhecida principalmente pela sua grande importância econômica, e entre os gêneros agrupados em Solanaceae, cinco deles reúnem cerca de 50% de todos os representantes da família, sendo o gênero *Solanum* L., o mais diverso (1500 espécies). Possui ampla distribuição geográfica em todo o mundo (Knapp, 2002).

O principal centro de diversidade taxonômica e possível centro de origem da família Solanaceae é o continente americano (América Central e do Sul), cerca de 50 gêneros e mais de 400 espécies já foram evidenciadas (D'Arcy, 1991; Olmstead, 2013). Inclui espécies com grande valor econômico, como tomate (*Solanum lycopersicum*), batata (*Solanum tuberosum*), beringela (*Solanum melongena*), pimentão (*Capsicum annum* L.) e pimentas em geral (*Capsicum* spp.), entre outras espécies de grande importância para alimentação humana (Hawkes, 1999). Ainda nesta família são encontradas espécies como o tabaco (*Nicotiana tabacum*), plantas ornamentais, como o manacá-de-cheiro (*Brunfelsia uniflora* D. Don), algumas espécies de petúnia, como *Petunia hybrida* E.Vilm. e as damas-da-noite (*Cestrum* spp.) (Souza e Lorenzi, 2012), além de plantas invasoras de culturas (Martins e Figueiredo, 1998).

3.1.2.1.1. Aspectos gerais da cultura do tomateiro

A cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), olerícola pertencente à família Solanaceae, é de grande importância econômica e social. Há algum tempo essa espécie foi reclassificada e reagrupada no gênero *Solanum*, anteriormente *Lycopersicum esculentum* Mill (Peralta et al., 2006). Este gênero é o maior e mais complexo, com um total de 1500 espécies descritas (Agra, 1999). Está presente diariamente na dieta de grande parte da população mundial, seja pelo consumo *in natura* ou para produtos industrializados (Naika et al., 2006).

O tomateiro é uma espécie autógama, diplóide, com $2n= 2x= 24$ cromossomos, e adapta-se bem ao cultivo em clima tropical e subtropical, durante todas as estações do ano, em diversas regiões do mundo (Peralta et al., 2006). É uma solanácea herbácea perene, mas se comporta como planta anual (Naika et al., 2006; Filgueira, 2008).

A arquitetura do tomateiro está intensamente correlacionada com seu hábito de crescimento, a qual pode ser do tipo determinado ou indeterminado. O hábito indeterminado tem a finalidade para a produção de frutos para consumo *in natura*, ocorre na maior parte das cultivares, que são tutoradas e podadas e podem ultrapassar dois metros de altura. O determinado destina-se para a indústria de alimentos processados, característico das cultivares adaptadas, especialmente para a cultura rasteira, e suas hastes podem atingir em torno de um metro de altura (Filgueira, 2008). As flores são pequenas e de coloração amarelada, com formato de cachos ou racemo. Possui sistema sexual hermafrodita, o que aumenta a taxa de autopolinização. A inflorescência tipo cimeira é de forma simples, bifurcada ou ramificada (Silva e Giordano, 2000). Os frutos são do tipo baga, com diferentes tamanhos e formatos, com película, polpa, placenta e sementes (Melo, 1989).

O tomateiro possui centro de origem na região andina, que abrange parte do Chile, Colômbia, Equador, Bolívia e Peru. Embora as formas ancestrais do tomateiro sejam de origem dessa região, sua ampla domesticação ocorreu no México, considerado o centro de origem secundária (Colariccio, 2000; Alvarenga, 2013). A introdução da cultura na Europa se deu no início do século XVI, pelos espanhóis, e sua aceitação como uma cultura agricultada e alimentícia foi relativamente lenta. A partir do século XVII, os europeus expediram a cultura do tomate para a China e para países do sul e sudeste asiático e, no século XVIII, para os Estados Unidos e Japão. No século XIX, a produção e o consumo do tomate se intensificaram, e rapidamente se estendeu nos Estados Unidos, onde, seus produtos derivados já eram consumidos regularmente de diversas formas, tais como sopas, molhos, bebidas e catchup (Harvey et al., 2002).

No Brasil, a introdução da cultura do tomate foi através de imigrantes europeus, principalmente italianos, espanhóis e portugueses, no final do século XIX (Alvarenga, 2013). Hoje, a cultura está espalhada por todo o mundo. É uma hortaliça de grande importância econômica, sendo hoje o segundo produto

olerícola mais cultivado no mundo, superada apenas pela batata. Em 2016, a produção de tomate no Brasil esteve em torno de 3,7 milhões de toneladas, com a área plantada de 58,5 mil hectares, tanto para tomate de mesa como para indústria de processamento. Os estados mais produtores são Goiás (978.258 mil toneladas), São Paulo (753.283 mil toneladas) e Minas Gerais (702.510 mil toneladas) (IBGE, 2017).

Os Estados Unidos é o maior produtor mundial de tomate, seguida pela China e Itália. O Brasil ocupa a sétima colocação no ranking da produção mundial de frutos (Carvalho et al., 2016). Em relação ao tomate para a indústria, os países que mais produzem são Estados Unidos, China, Itália, Espanha e Turquia. O Brasil está no oitavo lugar na lista do Conselho Mundial de Tomate para Processamento – World Processing Tomato Council (WPTC, 2017) com 1,25 milhões de toneladas de frutos (Carvalho et al., 2016).

A cultura do tomateiro, embora seja uma atividade agrícola de grande importância socioeconômica, é bastante sensível a problemas fitossanitários, uma vez que está sujeita a uma ampla gama de pragas e doenças, exigindo intenso manejo desde o plantio até a pós-colheita (Lopes e Ávila, 2005). A tomaticultura é um dos setores agrícolas que mais consome agrotóxicos, com um custo médio anual de R\$ 3.961,67/ha (Agrianual, 2015).

Doenças de origem fúngicas são as principais causas de perdas na pós-colheita da cultura do tomate. Vários autores relataram doenças causadas por fungos na fase de pós-colheita, dentre as mais severas, destacam-se: pinta preta – *Alternaria* spp. (Cota et al., 2007; Fagundes et al., 2015; Palaretti, 2018) e, mofo cinzento – *Botrytis cinerea* (Díaz et al., 2002; Liu et al., 2007; Charles et al., 2008; Charles et al., 2009; Wang et al., 2010; El Oirdi et al., 2011; Ahmed et al., 2016; Palaretti, 2018).

3.1.2.1.2. Aspectos gerais da cultura do pimentão

O pimentão (*Capsicum annuum* L.), pertence à família Solanaceae, incluindo todas as plantas do gênero *Capsicum*, entre elas as pimentas (Pozzobon et al., 2006; Moscone et al., 2007). É um dos gêneros mais importantes de Solanaceae, devido ao aspecto social e econômico, pois estão

fortemente associados à agricultura familiar, gerando emprego e renda, o que contribui para manter os trabalhadores nas áreas rurais, pois necessita de elevada demanda de mão de obra (Sudré et al., 2010).

O gênero *Capsicum* agrupa mais de 30 espécies, mas apenas cinco dessas espécies são domesticadas: *Capsicum annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* e *C. pubescens* (Pozzobon et al., 2006; Moscone et al., 2007; Dias et al., 2013), sendo *C. annuum* de grande importância econômica, sobretudo pelo seu valor agrônomo como especiaria. Esta cultura ocupa papel significativo na olericultura mundial, popularmente conhecida e amplamente cultivada em todo o mundo (Mahmoud e El-Eslamboly, 2015). Os frutos do pimentão são ricos em vitamina C e utilizados como matéria-prima na indústria alimentar (Casali e Stringheta, 1984; Reifschneider, 2000).

As plantas de pimentão são autógamas, diploides, com $2n= 2x= 24$ cromossomos, porém os citótipos mais comuns em espécies silvestres são $2n= 26$ cromossomos (Moscone et al., 2007). Possuem haste semi-lenhosa, podendo atingir até um metro de altura. Os frutos são do tipo baga, com estrutura oca e diferentes formatos, geralmente cônico ou cúbico, de tamanhos variados e de coloração passando por verde, vermelho, amarelo, dentre outras cores, quando maduros. A cultura é cultivada como planta herbácea anual, embora seja uma espécie perene (Viñals, 1996; Reifschneider, 2000; Filgueira, 2008).

O centro de origem do gênero *Capsicum* é o sul do México e a América Central, incluindo as Antilhas, segundo estudos de Nikolai Vavilov (Lam-Sánchez, 1992). O Brasil é um importante centro secundário de diversidade desse gênero, resguardando espécies domesticadas, semidomesticadas e silvestres (Reifschneider, 2000; Barboza e Bianchetti, 2005). Com base em evidências arqueológicas, análises genéticas e classificações modernas de plantas, pesquisadores indicam que a espécie de *C. annuum* foi inicialmente domesticada no México ou no norte da América Central (Pickersgill, 1986; Eshbaugh, 1993).

No *ranking* mundial dos cinco países que mais produzem *Capsicum in natura*, a China está em primeiro lugar (17,8 milhões de toneladas/ano), seguida pelo México (3,3 milhões de toneladas/ano), Turquia (2,6 milhões de toneladas/ano) e Espanha (12,8 milhões de toneladas/ano), com um total de mais

de 36 milhões de toneladas de pimentas e pimentões produzidos mundialmente (FAOSTAT, 2017).

No Brasil é a terceira espécie da família das Solanaceae mais cultivada, estando atrás apenas da batata e do tomate (Sacchi et al., 2003). De acordo com a Embrapa Hortaliças (2015), a área ocupada com pimentão, equivale a 13 mil hectares/ano com produção de 350 mil toneladas/ano de frutos.

Uma das grandes dificuldades para a produção de pimentão é o surgimento de doenças causadas por diferentes agentes patogênicos, principalmente por fungos, que comprometem não apenas rendimentos, mas também a qualidade dos frutos (Productores de Hortalizas 2004; Rêgo et al., 2011). Vários estudos relataram doenças fúngicas na fase de pós-colheita, que afetam a cultura do *Capsicum* spp. Dentre as mais comuns, temos: antracnose – *Colletotrichum gloeosporioides* (Kim et al., 2001; Park et al., 2012; Ko et al., 2016; Bento et al., 2017) e o mofo cinzento – *Botrytis cinerea* (García et al., 2015; Polat et al., 2018).

3.1.2.2. Mofo cinzento – *Botrytis cinerea*

A espécie *Botrytis cinerea* Pers. Fr. (teleomórfico *Botryotinia fuckeliana* [de Bary] Whetzel), causa a doença do mofo cinzento, caracterizada por um bolor cinzento, uma das doenças de origem fúngica mais comum e de distribuição mundial (Agrios, 2004; Bower, 2007; Mitcham, 2007). O fungo pertence ao gênero *Botrytis*, filo Ascomycota e família Sclerotiniaceae. Devido a sua ampla adaptabilidade, pode ser encontrado em diversas regiões geográficas de acordo com a natureza de seu hospedeiro (Grabke, 2014; Jin et al., 2017).

É caracterizado como um fungo polífago, necrotrófico não específico, por isso sua virulência varia em diferentes hospedeiros de plantas (Derckel et al., 1999; Mirzaei et al., 2009). Foi relatado que *B. cinerea* infecta mais de 235 espécies de culturas em todo o mundo, entre frutas e hortaliças, como tomate, morango, uva, pepino, pimentão, batata, tabaco entre outras, capaz de causar grandes danos e perdas econômicas tanto no campo como na fase pós-colheita (Williamson et al., 2007; Tofoli et al., 2011; Zhang e Van Kan, 2013). Essa ampla gama de hospedeiros se deve a capacidade do fungo de colonizar diferentes órgãos e tecidos vegetais como folhas, flores, frutos, caules, e em alguns casos a

parte superior da raiz, a base do caule e órgãos de armazenamento, como a cenoura (Droby e Lichter, 2007; Elad et al., 2004).

B. cinerea pode sobreviver no solo de forma saprofítica associado à matéria orgânica ou por meio de estruturas de repouso (escleródios ou micélio dormentes). O fungo produz conídios que são dispersos pelo ar e/ou pela água e, pela intensa esporulação, que são uma constante ameaça para as culturas suscetíveis ao patógeno. A germinação dos conídios é favorecida por temperaturas entre 18 a 23 °C e alta umidade relativa em torno de 90 a 100% (Vale et al., 2004b). Esse fungo penetra com facilidade e rapidez nos tecidos dos hospedeiros pela ação direta do apressório, por intermédio da secreção de enzimas degradadoras da parede celular, ou por ferimentos (Elad et al., 2015).

O sintoma característico de *B. cinerea* é o surgimento de uma podridão mole do fruto, seguidos por colapso e imersão de água nos tecidos do parênquima e cobertos por um bolor cinzento de conídios (Williamson et al., 2007). Os sintomas em frutos de tomates maduros disseminam a partir do ápice do fruto ou do pedúnculo, deixando os frutos com aspecto de podridão mole com uma coloração bege à cinzenta, cobertos por um bolor cinzento. Em frutos de tomates imaturos os sintomas típicos da doença aparecem em forma de anéis esbranquiçados com um ponto necrótico no centro (mancha fantasma). Este sintoma raro em tomate verde que é associado a uma defesa do hospedeiro bem-sucedido, mas o sintoma torna os frutos não comercializáveis (Williamson et al., 2007; Tofoli et al., 2011; Romanazzi e Feliziani, 2014). Enquanto que, em frutos de pimentão, as lesões inicialmente se caracterizam pelo aspecto aquoso, depois as lesões evoluem para manchas de coloração verde-amareladas ou cinzento-amareladas, com o avanço da doença. As lesões se tornam úmidas, irregulares, macias com textura esponjosa em estádios adiantados do mofo cinzento (Tofoli et al., 2011).

B. cinerea é de difícil controle devido a uma variedade de modos de ataque do patógeno, diversas culturas hospedeiras como fontes de inóculo, além de poder sobreviver como micélio e/ou conídios ou por períodos prolongados como esclerotos detritos de colheita. O mofo cinzento pode ser controlado por diversas práticas culturais, uma vez que a alta umidade favorece a infecção de *B. cinerea* e sua disseminação nas plantas, a prática comum para o manejo desse patógeno é limitar o uso da água de irrigação sobre órgãos vegetais suscetíveis

(Elad, 2016). Todavia medidas de controle basicamente são com fungicidas para as variedades tradicionalmente cultivadas, que são suscetíveis ao patógeno (Morandi, 2005; Kurozawa, et al., 2005; Fillinger e Walker, 2016).

No entanto, o uso excessivo de fungicidas na agricultura levou a preocupações públicas devido a efeitos negativos ao meio ambiente, e dos riscos gerados à saúde humana, com a intoxicação de indivíduos na lavoura, e pelos efeitos residuais do produto colhido, em virtude do uso indiscriminado dessa medida (Ribas e Matsumura, 2009). Por estas razões, há uma busca constante por cultivares para o controle dessa doença, todavia não há cultivares com resistência genética ao mofo cinzento em nenhum patossistema.

3.1.2.3. Imagem termográfica por infravermelho

A termografia por infravermelho é uma técnica avançada de inspeção e testes não destrutivos que permite detectar a radiação infravermelha emitida pelos corpos convertendo-a em imagens na zona do visível (RGB – Red, Green, Blue) contendo informação sobre a temperatura na superfície dos corpos (termogramas) (Costa et. al., 2013b). A principal vantagem da imagem térmica é a natureza não-invasiva e sem contato da técnica quando se trata de determinar a temperatura do objeto durante um curto período de tempo (Vadivambal e Jayas, 2011). A radiação infravermelha emitida na faixa do infravermelho térmico de 8 a 12 mm pode ser detectada por câmeras termográficas por infravermelho, e é ilustrada em imagens em cores falsas, onde cada pixel de imagem contém o valor de temperatura do objeto medido (Mahlein, 2016).

A termografia por infravermelho pode ser aplicada em diferentes segmentos, tais como: atividades militares, aeroportos, construção civil, sistemas eletrônicos e mecânicos, processos industriais, na medicina humana e animal e, na agricultura (Kaplan, 2007; Gowen et al., 2010; Costa et al., 2013b). Na agricultura, essa técnica é bastante relatada para monitorar estresse hídrico das culturas agrícolas, para aumentar a eficiência no uso da água (Costa et al., 2013a; Lima et al., 2016; García-Tejero et al., 2016; García-Tejero et al., 2017). Essa técnica também vem sendo empregada para monitorar doenças em plantas, pois ela examina a temperatura do vegetal que está relacionada com seu estado hídrico e com as mudanças na transpiração, devido a alterações fisiológicas da

planta causadas por agentes patogênicos (Jones et al., 2002; Oerke et al., 2006; Barón et al., 2016).

A imagem termográfica permite que as heterogeneidades de transpiração espacial e temporal causadas por infecções de plantas sejam visualizadas e monitoradas tanto pré-sintomaticamente quanto ao longo do desenvolvimento da doença (Mahlein et al., 2012), sendo possível detectar uma ampla gama de doenças em plantas, antes dos sintomas visíveis aparecerem (Nilsson, 1991). A detecção pré-sintomática da diagnose em plantas pode ser usada como uma ferramenta de intervenção imediata (por exemplo, através da aplicação do controle químico ou de outras medidas de controle), sendo de suma importância para controlar a disseminação e propagação de agentes patogênicos, que podem resultar em grandes perdas econômicas na agricultura (Oerke et al., 2010).

Pesquisas anteriores relataram o uso da termografia por infravermelho com sucesso para monitorizar e detectar precocemente doenças fúngicas, tais como: beterraba – *Cercospora beticola* (Chaerle et al., 2004), pepino – *Pseudoperonospora cubensis* (Lindenthal et al., 2005; Oerke et al., 2006; Wang et al., 2012; Wen et al., 2019), maçã – *Venturia inaequalis* (Oerke et al., 2011; Belin et al., 2013), tomate – *Oidium neolycopersici* (Raza et al., 2015a; Raza et al., 2015b), rosa – *Podosphaera pannosa* e *Botrytis cinerea* (Jafari et al., 2017) e trigo – *Fusarium spp.* (Mahlein et al., 2019).

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1. Localização e Germoplasma

Os ensaios foram realizados no *Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera* (IFAPA), no Centro de Las Torres, Sevilla, Espanha, no período de novembro de 2018 a abril de 2019.

Frutos em pós-colheita de tomate cultivar Boludo, e de pimentão Dulce Italiano variedade Nabone F₁, ambos suscetíveis ao mofo cinzento provocado por *B. cinerea* foram utilizados em ensaios.

3.1.3.2. Obtenção e preparo do inóculo fúngico

O isolado de *B. cinerea* da coleção do IFAPA foi utilizado para a produção do inóculo (Figura 1A). Para recuperar a virulência do isolado foi necessário uma etapa de inoculação, depositando discos de 5 mm de diâmetro de meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) contendo *B. cinerea* em frutos de tomateiro cultivar Boludo. Os frutos de tomate foram inicialmente desinfectados por imersão em solução de hipoclorito de sódio (2% NaClO), durante 3 min, seguido por imersão em água destilada autoclavada (Figura 1B), e colocados para secagem em fluxo laminar por 1h (Figura 1C). Após a secagem, dois frutos de tomate foram acondicionados em recipientes selados com filme plástico, em incubadora BOD a 20 ± 2 °C, umidade de 80% e fotoperíodo 12/12h para recuperação da virulência do patógeno (Figura 1D).

Após 10 dias, o isolado de *B. cinerea* foi repicado (Figura 1E) e cultivado em meio de BDA, acrescido de antibióticos (sulfato de estreptomicina, cloridrato de tetraciclina, cloranfenicol), colocados em placas de Petri, e incubados por 14 dias em BOD, nas mesmas condições observadas para a recuperação da virulência do patógeno (Figura 1F).

Após este período, as suspensões de esporos foram preparadas adicionando água destilada estéril às placas de Petri. Os esporos foram cuidadosamente liberados no meio de cultura com o uso de um bisturi. Posteriormente, foi realizada a filtragem dessa suspensão em camada dupla de gaze e o ajuste da concentração da suspensão de conídios (1.7×10^6 conídios.mL⁻¹) (Díaz et al., 2002) (Figura 1G). A contagem de conídios nas suspensões foi realizada por meio de uma câmara de Neubauer e um microscópio óptico.

3.1.3.3. Inoculação e incubação dos frutos

Frutos sadios de tomate e pimentão foram desinfectados e secados superficialmente, nas mesmas condições descritas acima. Após a secagem, os frutos foram dispostos em bandejas plásticas de polietileno, com o fundo coberto com papel filtro esterilizado e umedecido com água destilada estéril. Posteriormente, em cada fruto de tomate e pimentão, foram infiltrados 0,50 mL de

suspensão de conídios ($1,7 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹) de *B. cinerea*, com o auxílio de uma seringa hipodérmica (1mL) (Figura 1H).

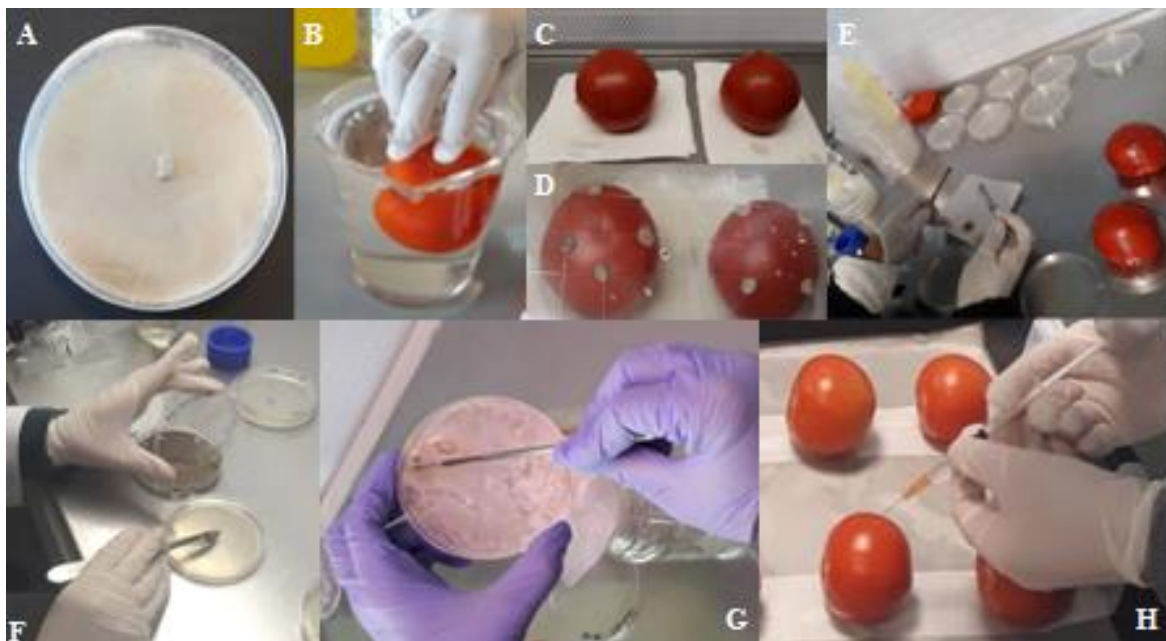


Figura 1. Etapas de obtenção, preparo do inóculo fúngico, inoculação e incubação dos frutos; (A) Cultura de *Botrytis cinerea* cultivado em meio de cultura BDA, em BOD (22 ± 2 °C, 12h de luz); (B) Desinfecção dos frutos com NaClO (2%), durante 3 min, seguido por imersão em água destilada autoclavada; (C) Secagem dos frutos em fluxo laminar, durante 1h; (D) Recuperação da virulência de *B. cinerea* em condições controladas, usando frutos de tomateiro cultivar Boludo; (E) Repicagem de *B. cinerea* cultivado durante 10 dias em frutos de tomateiro, para serem cultivado em meio de cultura BDA; (F) Repicagem de *B. cinerea* cultivado em meio de cultura BDA, após 14 dias; (G) Raspagem do meio de cultura para preparo da suspensão de conídios de *B. cinerea* ($1,7 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹); (H) Inoculação artificial com o fungo *B. cinerea* (0,5 mL).

As inoculações foram realizadas no mesmo dia do preparo da suspensão de esporos. Como controle, frutos não inoculados da mesma idade foram infiltrados com 0,50 mL de água destilada estéril. As bandejas contendo os frutos inoculados ou não inoculados com *B. cinerea* foram acondicionadas em um saco plástico estéril e, posteriormente mantidas em câmara climatizada (22 ± 2 °C, 12h de luz), e umidade de 80%, a fim de fornecer condições ótimas de infecção.

3.1.3.4. Avaliação da reação ao Mofo Cinzento

3.1.3.4.1. Imagem termográfica por infravermelho

As imagens térmicas foram obtidas utilizando uma câmera por infravermelho (Flir SC660, Flir Systems, USA), com uma sensibilidade espectral variando de 7 a 13 μm , com uma resolução de 640x480 pixels, e emissividade fixado em 0,99 (Figura 2).

As imagens foram registradas 24h após a inoculação com o fungo, a uma distância de aproximadamente 50 cm dos frutos, perpendicular à superfície dos frutos. O horário avaliado foi entre 12:00h as 14:00h, correspondendo ao período mais quente do dia, durante 13 dias.



Figura 2. Câmera termográfica por infravermelho (Flir SC660, Flir Systems, USA).

Para fins comparativos do espectro visível, imagens digitais das mesmas amostras de frutos utilizados nas imagens térmicas foram registradas por meio de uma câmera digital. Ao capturar as imagens do espectro visível, a câmera foi posicionada nas mesmas condições da câmera por infravermelho para o monitoramento preciso do desenvolvimento da doença e os efeitos térmicos relacionados.

As imagens termográficas foram analisadas por meio do *software* FLIR Tools. A paleta de cores utilizada para medição da temperatura foi a *Rainbow* (arco-íris) que varia do branco ao violeta.

O diferencial de temperatura média (ΔT) foi calculado nos espectros das regiões entre as temperaturas médias dos frutos inoculados menos a temperatura média dos frutos não inoculados (controle), a fim de visualizar o efeito da infecção, de acordo com a temperatura foliar, ao longo do tempo (Gomez, 2014; Pérez-Bueno et al., 2015), pela expressão:

$$\Delta T = | T_{inoculado} - T_{controle} |$$

Em que:

ΔT = Diferencial de temperatura média;

$T_{inoculado}$ = Temperatura média do fruto inoculado com o *B. cinerea*;

$T_{controle}$ = Temperatura média do fruto controle (não inoculado).

A temperatura máxima e mínima dos frutos inoculados também foi registrada, por meio do diferencial de temperatura máxima (DTM) entre a temperatura mais alta da área dos frutos inoculados menos a temperatura mais baixa, dentro da mesma área do fruto. Assim comparou-se a área doente com a área saudável dos frutos inoculados (Lindenthal et al., 2005; Oerke et al., 2006), pela expressão:

$$DTM = | T_{mx} - T_{mi} |$$

Em que:

DTM = Diferencial de temperatura máxima;

T_{mx} = Temperatura máxima do fruto inoculado com *B. cinerea*;

T_{mi} = Temperatura mínima do fruto inoculado com *B. cinerea*.

3.1.3.5. Análise estatística

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em blocos, considerando três repetições por fruto e tratamento, sendo quatro frutos de tomate e três frutos de pimentão por replicação. Para cada dia de monitoramento,

foi realizada uma análise descritiva das leituras térmicas; aplicando um teste de Levene, a homogeneidade da variância. Após isso, foi realizada uma ANOVA unidirecional seguida de um teste t-Student para localizar as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos.

Todas as análises foram realizadas usando o *software* SPSS15.0 (*Statistical Package for the Social Sciences Inc.*, Chicago, IL, USA). O experimento foi realizado em duplicado.

3.1.4. RESULTADOS

Alterações nos frutos inoculados de tomate e pimentão na fase pós-colheita, como uma resposta ao desenvolvimento do mofo cinzento, conforme detectadas com as imagens térmicas foram observadas desde o primeiro dia após a inoculação (DAI) com *B. cinerea*. Enquanto que, os sintomas visuais apareceram somente no terceiro dia após a inoculação (Figuras 3, 4).

Comparando as imagens digitais, as mudanças na cor das imagens térmicas por infravermelho eram mais notáveis em comparação com as observações visuais. A coloração do sintoma da doença nas imagens térmicas foi inicialmente verde para os frutos de tomate e, tornam-se gradualmente um azul mais escuro com o desenvolvimento dos sintomas ao longo do tempo (Figura 3). Para os frutos de pimentão, o sintoma apresentava uma coloração alaranjada ao longo de todo o experimento (Figura 4). No controle, a cor dos frutos de tomate e pimentão observados pela imagem térmica não diferiu visualmente ao longo do experimento.

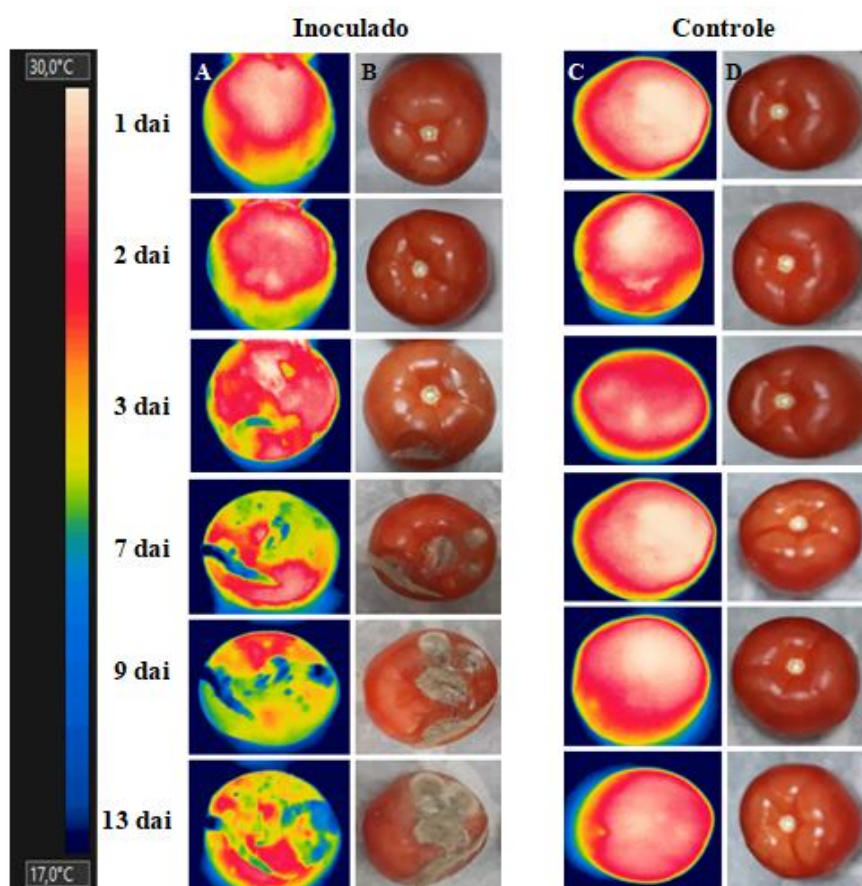


Figura 3. Desenvolvimento de lesões causadas por *B. cinerea* em frutos de tomateiro (A) imagem térmica e (B) imagem digital de frutos inoculados com o fungo; (C) imagem térmica e (D) imagem digital de frutos controle; 1, 2, 3, 7, 9 e 13 dias após a inoculação (DAI).

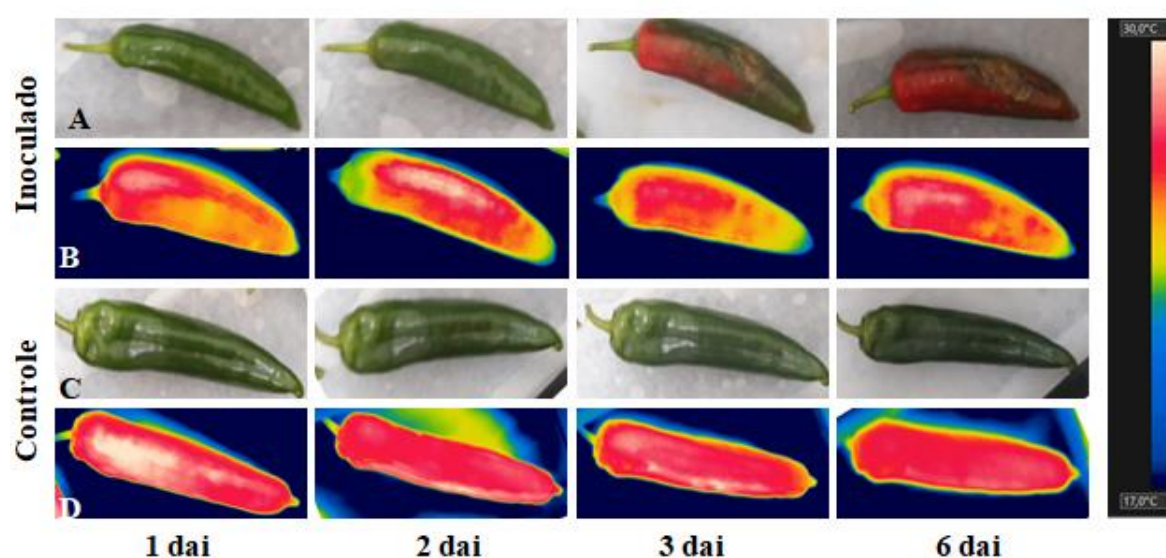


Figura 4. Desenvolvimento de lesões causadas por *B. cinerea* em frutos de pimentão. (A) imagem digital e (B) imagem térmica de frutos inoculados com o fungo; (C) imagem digital e (D) imagem térmica de frutos controle; 1, 2, 3 e 6 dias após a inoculação (DAI).

Verificou-se ao longo do experimento, que ambos os frutos de tomate e pimentão inoculados com *B. cinerea* continham significativamente uma temperatura mais baixa em comparação aos frutos controle (Figuras 5A, B). Frutos de tomate e pimentão infectados mostraram um ΔT em torno 1,83 °C (2 DAI) e 2,19 °C (1 DAI) mais baixo, respectivamente, quando comparados aos frutos controle, antes do aparecimento de sintomas visíveis, que surgiram três dias após a inoculação (DAI). O maior valor de ΔT ocorreu no último dia após a inoculação (13 DAI), tanto para frutos de tomate (3,55 °C), quanto para frutos de pimentão (2,45 °C) (Figuras 5A, B). Durante o experimento foi possível observar aumento e diminuição na temperatura, respectivamente, nos frutos controle e inoculados que foram explicados tendo como padrão a temperatura ambiental.

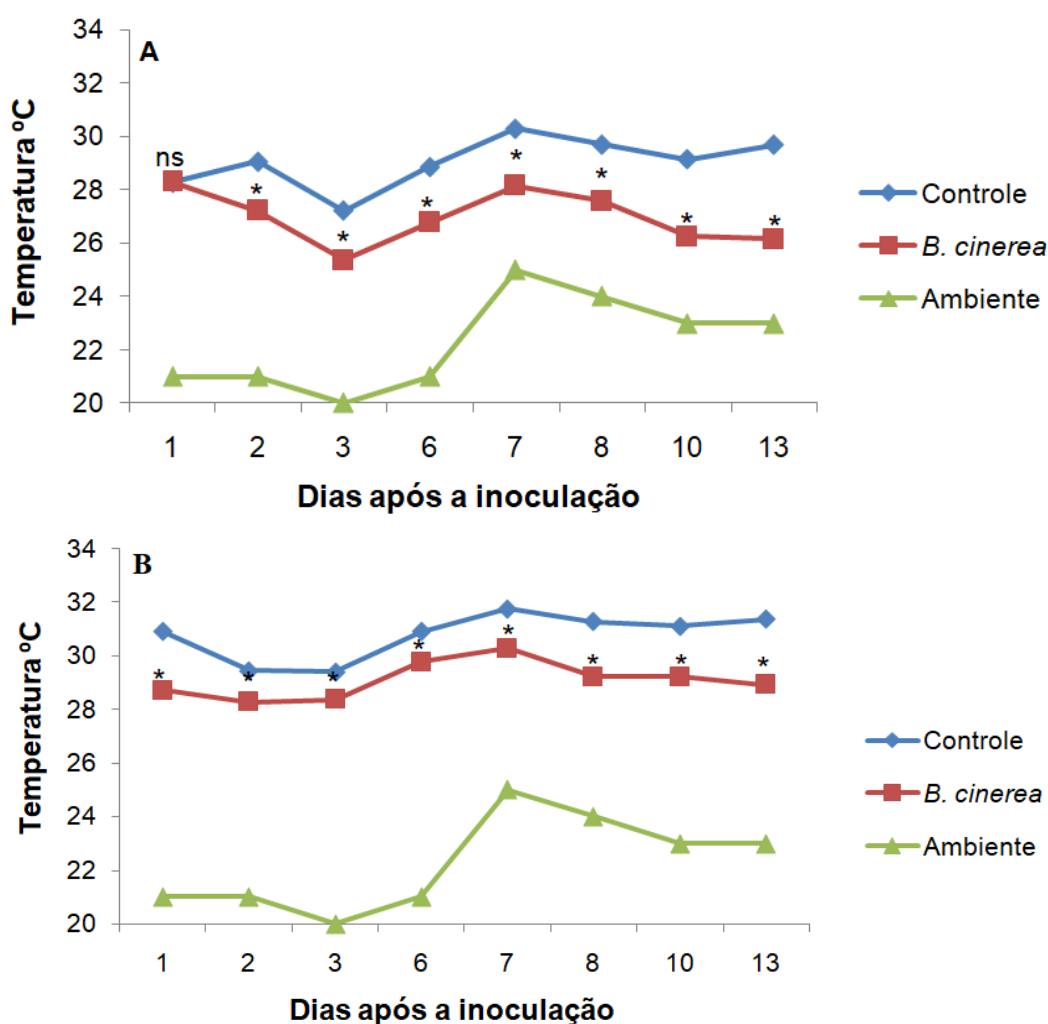


Figura 5. Evolução diária da temperatura média em frutos de tomate (A) e pimentão (B) na fase pós-colheita, entre o tratamento controle e o inoculado com *Botrytis cinerea*, ao longo de 13 dias após a inoculação. Cada ponto representa o valor médio de duas experiências. *Indica diferença significativa (teste *t*, $p \leq 0,05$); ns= não significativo ($p \geq 0,05$).

Nos frutos de tomate e pimentão inoculados com *B. cinerea* verificou-se que as temperaturas das áreas sintomáticas eram também mais baixas em comparação com aquelas das áreas saudáveis. O diferencial de temperatura máxima (DTM) foi observado desde o primeiro dia após a inoculação, em torno de 3,24 °C para os frutos de tomate, e 1,73 °C para os frutos de pimentão, antes do aparecimento dos sintomas visíveis (Figura 6A, B).

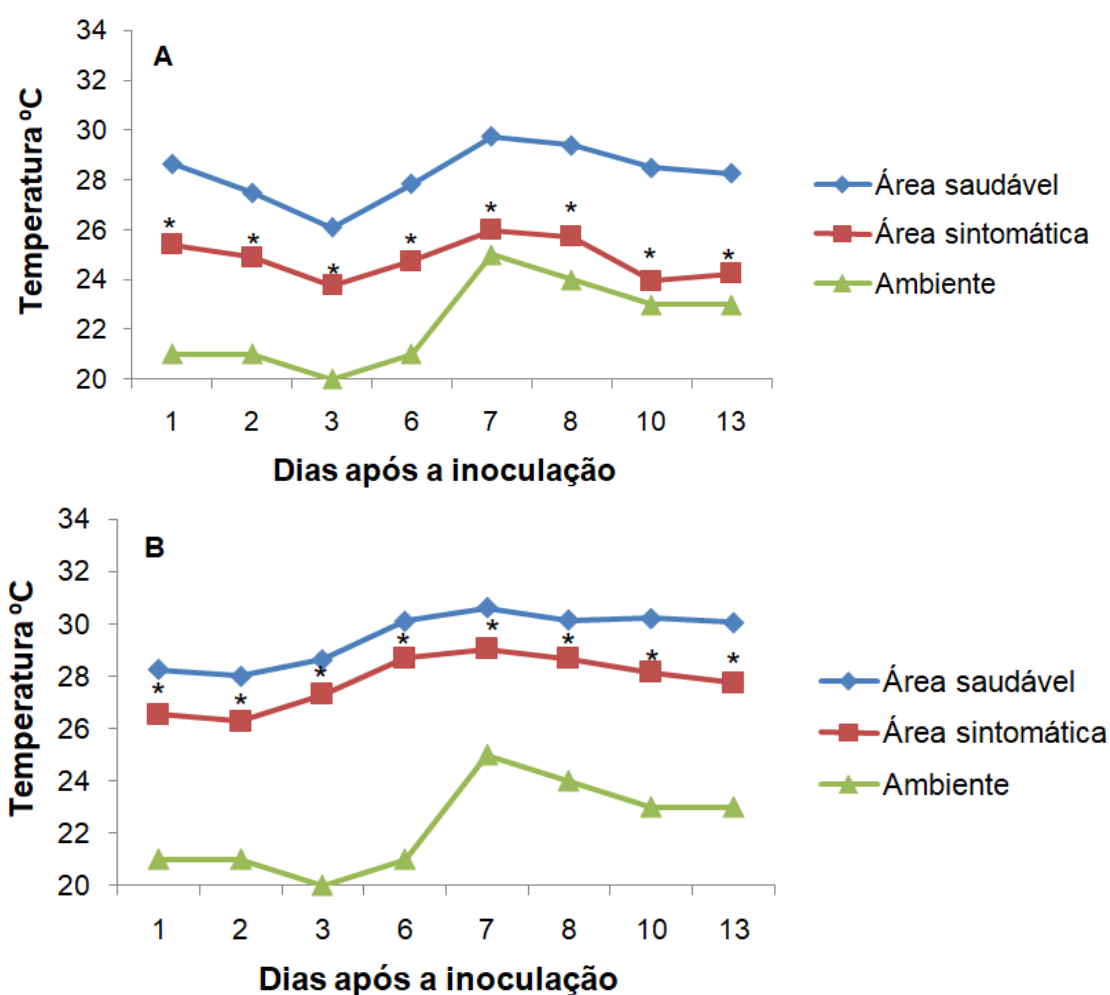


Figura 6. Evolução diária entre a temperatura das áreas saudáveis em comparação a área sintomática para os frutos de tomate (A) e pimentão (B), ao longo de 13 dias após a inoculação. Áreas sintomáticas desenvolveram após a inoculação com *Botrytis cinerea*. Cada ponto representa o valor médio de duas experiências. *Indicam diferença significativa (teste *t*, $p < 0,05$).

Curiosamente, o ponto de temperatura mínima, para ambos os frutos ocorreu no terceiro dia após a inoculação (3 DAI), quando os sintomas se tornaram visíveis. Registrou-se um DTM de 2,31 °C para frutos de tomate e 1,32

°C para frutos de pimentão, e subsequentemente, a temperatura aumentou quando a infecção progrediu até o oitavo dia, e depois a temperatura diminuiu.

O maior DTM, entre as áreas sintomáticas e as áreas saudáveis, foi observado no décimo dia de avaliação para os frutos de tomate (4,57 °C) (Figura 6A), e no último dia de avaliação (13 DAI) para os frutos de pimentão (2,3 °C) (Figura 6B).

3.1.5. DISCUSSÃO

Métodos não invasivos de análise em plantas têm atraído um interesse expressivo de pesquisas, principalmente na área diagnose de doenças em plantas (Mahlein et al., 2018). A detecção precoce e o monitoramento de doenças em plantas usando sensores como a termografia por infravermelho pode aumentar o nosso conhecimento para melhorar o manejo de doenças (Mahlein et al., 2019). No início da última década, o uso desses métodos foi considerado de grande potencial para desempenhar um papel importante na fenotipagem, na detecção e no monitoramento de doenças de plantas nos próximos anos (Lucas, 2010). No entanto, ainda são escassas pesquisas com o uso da termografia por infravermelho para detectar doenças em frutos, considerando os aspectos promissores dessa abordagem, em especial quando se trata de frutos em fase de pós-colheita.

Neste trabalho foi apresentada uma nova abordagem para detecção não invasiva e precoce do mofo cinzento em frutos de tomateiro e pimentão em fase pós-colheita. Verificou-se que a imagem térmica por infravermelho foi capaz de identificar mofo cinzento em frutos de tomate e pimentão antes do surgimento dos sintomas visíveis. Os sinais iniciais de infecção nas imagens térmicas foram observados no terceiro dia após a inoculação com *B. cinerea* (Figuras 3, 4) e uma temperatura mais baixa nos frutos infectados foram observadas desde o primeiro dia após a inoculação (Figuras 5, 6). *B. cinerea* causou uma diminuição significativa da temperatura no ponto de inoculação dos frutos, comparando o ΔT [tomate= 1,83 °C (2 DAI) e o pimentão= 2,19 °C (1 DAI)] (Figura 5A, B) e o DTM

[tomate = 3,24 °C (1 DAI) e pimentão = 1,73 °C (1 DAI)] (Figura 6A, B) antes que os sintomas aparecessem visualmente.

Sintomas de *B. cinerea* são normalmente associados à podridão mole, pois o fruto apresenta-se mole, aquoso, com extravasamento do conteúdo celular, fazendo com que a temperatura diminua como resultado da presença de água no tecido vegetal (Tofoli et al., 2011). Este aumento no teor de água provoca uma diminuição da temperatura dos frutos infectados em comparação com o controle. É importante observar que nem todas as doenças resultam em uma eventual diminuição da temperatura da planta. Isso dependerá de vários fatores, incluindo o tipo de sintomas relacionados ao patógeno, a proporção da área afetada em relação à área total do órgão ou parte da planta, da fase da doença e da taxa de crescimento do patógeno no hospedeiro, que por sua vez, é influenciado pela temperatura ambiental.

Estudos anteriores com doenças foliares por meio de imagens termográficas por infravermelho demonstraram uma redução pré-sintomática da temperatura nas folhas inoculadas com fungos em diferentes patossistemas. Na interação *Cucumis sativus* (pepino) – *Pseudoperonospora cubensis*, o agente causal do míldio das cucurbitáceas, observou-se uma redução na temperatura foliar de 0,8 °C, em comparação ao controle (Lindenthal et al., 2005). Em macieiras, folhas inoculadas com *Venturia inaequalis*, a termografia foi capaz de detectar uma diminuição da temperatura foliar, antes do aparecimento de sintomas visíveis, e o DTM observado está fortemente correlacionado ao tamanho dos locais de infecção (Oerke et al., 2011). No patossistema beterraba – *Cercospora beticola* foi observada uma temperatura mais baixa nas folhas infectadas, numa fase pré-sintomática com o fungo, antes que os sintomas se tornassem visíveis (Chaerle et al., 2004). Folhas de rosáceas (cultivar Angelina) inoculadas com *Podosphaera pannosa* exibiram uma redução na temperatura foliar de até 2,3 °C, nas fases iniciais de infecção do patógeno (Jafari et al., 2016). Sinais iniciais de infecções provocadas por *B. cinerea*, em flores de rosáceas (cultivar Angelina) foram registrados rapidamente por meio da termografia, com a detecção de uma temperatura mais baixa em pétalas das flores infectadas em comparação com as pétalas saudáveis circundantes, apenas 12h após a inoculação (Jafari et al., 2017).

Por outro lado, a detecção precoce em outros patossistemas com o uso da termografia foi associada com temperaturas mais elevadas antes dos sintomas se tornarem visíveis. Wang et al. (2012) observaram que no quinto dia de avaliação após a inoculação em folha de pepino com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* havia um aumento de 3,4 °C na temperatura foliar em relação ao controle (folha não inoculada). Gomez (2014) relatou uma temperatura mais elevada em folhas de roseira infectadas com o fungo *Peronospora sparsa*. O vírus do mosaico do tabaco (TMV) causou um aumento da temperatura foliar de tabaco (Chaerle et al., 1999; Chaerle et al., 2004). A fusariose da espiga do trigo, causada por *Fusarium spp.* foi relacionada à temperatura foliar mais elevada, em comparação com o tratamento controle (Mahlein, et al., 2019).

A detecção precoce de doenças em vegetais é uma área em expansão, sobretudo para a horticultura associada à agricultura de precisão e fenotipagem em larga escala. A aplicação da termografia infravermelha para detectar precocemente doenças em diferentes partes da planta, em especial quando se consideram os diversos estádios de desenvolvimento de frutos e flores, deve ser estimulada, a fim de aumentar seu papel em setores que lidam com o manejo e prevenção de perdas ocasionadas por doenças patogênicas. A detecção precoce de doenças em plantas por termografia obterá aplicações específicas de pesticidas e fungicidas como estratégias de proteção de culturas de precisão, o que poderá implicar em redução no uso de defensivos com consequente redução do custo de produção e de impactos ecológicos nos sistemas de produção agrícola (Gebbers e Adamchuk, 2010). Especificamente, no campo da pós-colheita, a termografia por infravermelho pode ser uma ferramenta muito eficiente para ajudar a mitigar as perdas em todo o mundo, sobretudo na área horticultura. Do ponto de vista prático, a rapidez e a eficiência na detecção pré-sintomática, associado ao baixo custo por amostra analisada e o caráter não destrutivo da análise, reforçam o potencial da técnica como uma abordagem viável para produtores e gerentes de produção, em especial para frutos de hortaliças que são altamente perecíveis. A identificação precoce de lotes de frutos contaminados pode auxiliar na adoção de medidas profiláticas na redução de perdas pós-colheita. Além disso, devem ser estabelecidos, otimizados e validados protocolos para o uso da termografia infravermelha para os diferentes patossistemas, trazendo maior uniformidade no uso da técnica para diversos fins. De acordo com

os resultados obtidos nesta pesquisa, sugerimos que frutos de tomate e pimentão com diferenças significativas de temperatura (ΔT ou DTM) de 1,7 °C indica que algo pode estar ocorrendo, algum tipo de estresse causado por microrganismos. Isso pode facilitar a identificação e eliminação de frutas infectadas, antes do início dos sintomas, reduzindo as perdas econômicas tanto no campo quanto nas prateleiras.

O uso rotineiro da termografia na detecção de doenças em plantas também poderá ser muito útil para diferentes áreas da pesquisa em ciências agrárias, tanto na fitopatologia e fisiologia pós-colheita de frutos, como também no melhoramento de plantas visando à resistência a doenças. A fenotipagem precoce de centenas de plantas ou frutos em programas de seleção pode tornar a identificação de genótipos resistentes por melhoristas de plantas mais rápida, eficiente e precisa, contribuindo assim para um melhor entendimento da interação planta-patógeno.

3.1.6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

– A termografia por infravermelho é uma ferramenta eficiente e confiável para ser usada na detecção e monitoramento precoces da infecção por *B. cinerea* em frutos de tomate e pimentão pós-colheita;

– O uso dessa tecnologia facilitará a identificação e eliminação dos frutos infectados antes do início dos sintomas, reduzindo as perdas econômicas devido à destruição pós-colheita;

– A otimização desse sensor óptico econômico na detecção de doenças de plantas em condições de campo deve ser encorajadora.

3.2. DETECÇÃO PRÉ-SINTOMÁTICA DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM EM *Phaseolus vulgaris* L., POR MEIO DE IMAGENS TERMOGRÁFICAS E DE ÍNDICES DE REFLECTÂNCIA FOLIAR

3.2.1. INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais importantes da alimentação humana, por fornecer uma excelente fonte proteica, além de possuir bom conteúdo de carboidratos e ser rico em ferro (Carneiro et al., 2015). Esta leguminosa está presente diariamente na mesa dos brasileiros, sendo de grande importância socioeconômica, com consumo *per capita* em torno de 15,0 kg/hab/ano (CONAB, 2016).

Inúmeras doenças tanto da parte aérea quanto de solo, de origem fúngica, bacteriana e viral afetam o feijoeiro e compõem uma das principais limitações na redução significativa da sua produtividade, depreciando a qualidade do produto ou mesmo inviabilizando determinadas áreas para o cultivo (Paula Júnior e Zambolim, 2006). Dentre as principais doenças da cultura em termos de importância econômica, destaca-se o crestamento bacteriano comum (CBC), causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Thung e Sartorato, 2002; Bianchini et al., 2005).

A doença do crestamento bacteriano comum causa sintomas em todos os órgãos aéreos do feijoeiro-comum, principalmente em regiões úmidas e com temperaturas acima de 28 °C, sobretudo no cultivo das águas. Nas folhas

formam-se pequenas manchas aquosas e translúcidas, que se manifestam de forma irregular, tornam-se marrons e aumentam de tamanhos. Os tecidos infectados ficam com aspecto de queimadura ou crestamento, com um estreito bordo amarelo. Em ataques severos pode ocorrer o desfolhamento total da planta (Sartorato e Rava, 1994).

A maioria das cultivares de feijão-comum utilizados no Brasil é suscetível ao CBC. Para o controle, recomenda-se utilizar somente sementes saudáveis e de boa qualidade sanitária, realizar rotação de cultura com espécies não hospedeiras, eliminar plantas daninhas e insetos disseminadores da bactéria, aplicar agrotóxicos em doses recomendadas e utilizar cultivares resistentes (Carneiro et al., 2015). Destas, a medida de controle, a mais viável é o plantio de cultivares resistentes, pois não causa nenhum tipo de impacto negativo ao meio ambiente e é perfeitamente compatível com outras medidas alternativas de controle, além de reduzir os custos de produção (Costa e Rava, 2003; Trindade et al., 2015).

Na condução de um programa de melhoramento de plantas visando à resistência a doenças, é necessário identificar o método mais adequado de *screening* das plantas e, ou linhagens sob seleção. Os métodos mais usuais na diagnose de doenças em plantas são as escalas diagramáticas, escalas de notas, contagem de número e diâmetro de lesões (Vale et al., 2004a). No entanto, é muito laborioso diagnosticar e monitorar manualmente doenças em plantas causadas por patógenos diversos, pois necessita de grande quantidade de pessoas e mão de obra qualificada. Isto ocasiona maior tempo para a análise e processamento de dados (Khirade e Patil, 2015). Outra dificuldade é o diagnóstico tardio da doença que só pode ser identificado após o surgimento dos primeiros sintomas e/ou sinais visíveis do patógeno.

Várias técnicas têm sido relatadas na agricultura moderna para facilitar a detecção pré-sintomática de doenças de plantas, de forma rápida e não destrutiva (Belin et al., 2013; Singh et al., 2016; Mahlein et al., 2016). Tais como, a imagem térmica e os índices de reflectância foliar, que representam técnicas promissoras para a detecção precisa e precoce de estresses em plantas, tanto biótica como abiótica (Singh et al., 2016; Mahlein et al., 2016).

A termografia por infravermelho mede a temperatura da planta, por meio de imagens capturadas por uma câmera térmica. Essa temperatura está

correlacionada com o balanço hídrico e com alterações na transpiração da planta (Jones et al., 2002; Costa et al., 2013b), que podem ser prejudicadas pela ação de patógenos (Oerke et al., 2006; Barón et al., 2016). Trabalhos anteriores investigaram o uso da termografia no diagnóstico de doenças bacterianas em alguns patossistemas como: *Solanum lycopersicum* (tomate) – *Ralstonia solanacearum* (Chiwaki et al., 2005); *P. vulgaris* (feijão-comum) – *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Pérez-Bueno et al., 2015); *Nicotiana benthamiana* (tabaco) – *Dickeya dadantii* (Pérez-Bueno et al., 2016a); *Cucumis melo* (melão) e *Cucurbita pepo* (abobrinha) – *Dickeya dadantii* (Pérez-Bueno et al., 2016b).

Índices de reflectância foliar podem ser empregados para avaliar e monitorar várias culturas agrícolas na interação planta-patógeno (Hikishima et al., 2010; Boechat et al., 2014; Janeczko et al., 2018; Arantes et al., 2019; Marin et al., 2019a; Marin et al., 2019b). Estes índices são capazes de estimar e detectar mudanças fisiológicas da planta causada por uma ampla gama de agentes patogênicos, através de alterações biofísicas e bioquímicas, como diminuições de biomassa, degradação da clorofila e mudanças nas estruturas internas das folhas entre outros (Barton, 2012; Mahajan et al., 2014). A doença é avaliada por meio de sensores espectrais que calculam diferenças da reflectância da radiação solar em dois ou mais comprimentos de onda (Dalla Pria e Silva, 2010; Wójtowicz et al., 2016), uma vez que os patógenos mudam o estado fisiológico da planta, como perda de umidade e teor de clorofila (Boechat et al., 2014).

O uso de métodos rápidos e precisos na diagnose precoce do CBC em feijoeiro pode facilitar práticas de controle e de manejo da doença, auxiliar melhoristas na identificação e seleção de cultivares geneticamente resistentes, bem como reduzir o uso de agrotóxicos no ecossistema. Este trabalho relata o desenvolvimento de um protocolo de detecção pré-sintomática por meio do uso de imagens termográficas e de índices de reflectância foliar, quanto à reação ao crestamento bacteriano comum, utilizando como modelo o patossistema *P. vulgaris* L. – *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

3.2.2. REVISÃO DE LITERATURA

3.2.2.1. Aspectos gerais da cultura do feijoeiro-comum

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), pertence à classe Dicotiledônea, família Leguminosae (Fabaceae), subfamília Papilionoidae (Faboideae) e gênero *Phaseolus* (Santos e Gavilanes, 2008). O gênero *Phaseolus* engloba, aproximadamente, 55 espécies das quais, apenas cinco, são cultivadas: o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*); o feijão de lima (*P. lunatus*); o feijão ayocote (*P. coccineus*); o feijão tepari (*P. acutifolius*); e o *P. polyanthus* (Embrapa, 2008). O feijão-comum é a espécie mais cultivada e consumida mundialmente, ocupando mais de 85% da área de produção semeada com todas as espécies de *Phaseolus* em diversos países (Singh, 2001).

Evidências arqueológicas indicam que o feijoeiro teve origem no continente americano, sendo uma das primeiras plantas cultivadas nas Américas, onde populações silvestres de *P. vulgaris* são consideradas como ancestrais das atuais plantas cultivadas e se desenvolveram desde o Norte do México (Chihuahua) até o Norte da Argentina (San Luis), em altitudes de 500 e 2.000 m (Gepts e Debouck, 1991; Vieira et al., 2005). O feijão-comum foi domesticado no México há mais de 7 (sete) mil anos (Vieira, 1967) e, têm sua importância tão antiga que relatos históricos de cerca de 1.000 a.C. fazem referências aos feijões na Idade do Bronze, na Suíça, entre os Hebraicos, e ruínas da antiga Tróia mostraram evidências de que o feijão era o prato favorito dos robustos guerreiros troianos (Yokoyama, 2002). Na literatura são citados três centros de domesticação do feijão-comum: Mesoamericano (México e América Central), região Andina (sul do Peru, Bolívia e norte da Argentina) e Colômbia, sendo América Central o principal centro de diversidade genética (Gepts e Debouck, 1991).

O feijão-comum é uma espécie autógama, porém pode apresentar taxa de fecundação cruzada de aproximadamente de 3%, dependendo de fatores como umidade relativa do ar, temperatura, distância de semeadura entre as cultivares, coincidência e duração do período de florescimento, atividade de insetos polinizadores e tamanho de flor, podendo atingir valores mais elevados (Marques

Júnior e Ramalho, 1995). As espécies de *Phaseolus* são diploides, com $2n= 2x= 22$ cromossomos (Singh et al., 1991).

O hábito de crescimento é definido pelo desenvolvimento do caule e hábito de florescimento da planta, entre outras características, podendo apresentar-se de duas formas, determinado ou indeterminado. As plantas de hábito de crescimento determinado caracterizam-se por ter o caule e os ramos laterais com inflorescência no ápice, apresentam número limitado de nós e o florescimento inicia-se do ápice para a base da planta. O hábito indeterminado é caracterizado por possuir os meristemas apicais do caule e dos ramos laterais vegetativos durante o florescimento, numa sucessão de nós e entrenós; as inflorescências são axilares, isto é, desenvolvem-se nas axilas das folhas, e a floração inicia-se da base para o ápice da planta (Silva, 2011a).

O feijão-comum é a leguminosa de grande importância socioeconômica, devido a sua relevância nutricional e cultural na culinária de diversos países e etnias. O ciclo dessa cultura é relativamente curto, variando de 70 a 110 dias (Barbosa e Gonzaga, 2012). O Brasil destaca-se como o maior consumidor mundial dessa cultura, sendo seu cultivo realizado em todo o país. Na safra 2016/17, obteve-se um crescimento de 13% na área plantada, passando de aproximadamente 980 mil hectares para mais de 1.100 mil hectares. A produtividade média obtida foi em torno de 1.200 kg/ha, na média nacional (CONAB, 2016). Para a dieta humana, proporciona uma importante fonte de proteína, aproximadamente 22%, vitaminas (ácido fólico) e minerais (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn) (Beebe, 2012). O feijoeiro representa cerca de 50% dos grãos leguminosos consumidos mundialmente. De acordo com o MAPA (2013) a cada dez brasileiros, sete consomem feijão diariamente, sendo o consumo médio *per capita* dos brasileiros em torno de 15,0 kg/hab/ano (CONAB, 2016). É cultivada por pequenos e grandes produtores em todas as regiões brasileiras, tendo a agricultura familiar como responsável por 61% do feijão-comum produzido no país (IBGE, 2006). No entanto, o feijão-comum é suscetível a um grande número de pragas e doenças que reduzem seriamente a produção e qualidade das sementes (Boersma et al., 2015; Carneiro et al., 2015).

Na literatura são relatadas mais de 300 doenças, de maior ou menor importância, incidindo sobre o feijoeiro. Dentre as mais comuns, no Brasil, estão: antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), mancha-angular (*Pseudocercospora*

griseola= *Phaeoisariopsis griseola*) (Pereira, 2007), ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), oídio (*Erysiphe polygoni*) e murcha-de-fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*), de origem etiológica fúngica; crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) de origem etiológica bacteriana e mosaico-dourado (geminivirus) e mosaico-comum (potyvirus), de origem etiológica viral (Paula Júnior e Zambolim, 2006; Viecelli et al., 2010). Dentre estas, o crestamento bacteriano comum está entre as principais doenças bacterianas da cultura do feijoeiro (Thung e Sartorato, 2002).

3.2.2.2. Crestamento Bacteriano Comum (CBC)

O crestamento bacteriano comum (CBC) é considerado como uma das principais doenças de etiologia bacteriana na cultura do feijoeiro no Brasil (Díaz et al., 2001; Miklas et al., 2003), causada pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*). Esse patógeno ocasiona grandes perdas na produção, principalmente, na safra das “águas”, quando as condições ambientais são favoráveis à disseminação do patógeno e ao desenvolvimento da doença (Carneiro et al., 2015).

A bactéria é descrita como baciliforme, Gram-negativa, móvel por um flagelo, estritamente de respiração aeróbica. Pertence ao gênero *Xanthomonas*, do qual faz parte um vasto número de fitopatógenos cosmopolitas, isto é, que atacam uma ampla gama de variedades de plantas, incluindo várias espécies agrícolas de interesse econômico como o feijão (*X. axonopodis* pv. *phaseoli* – *Xap*), os frutos cítricos (*X. axonopodis* pv. *citri* – *Xac*), o arroz (*X. oryzae* pv. *oryzae*), e os cereais e gramíneas (*X. translucens*). Infecções provocadas por espécies de *Xanthomonas* ocorrem em pelo menos 68 famílias de plantas monocotiledôneas e em mais de 240 gêneros (Hayward, 1993).

A disseminação da bactéria na lavoura ocorre por meio de sementes infectadas com a *Xap*. Estas sementes normalmente têm aparência enrugada e podem apresentar descoloração na região do hilo. Plantas originadas de sementes infectadas crescem relativamente pouco. A bactéria também pode ser disseminada por insetos, por implementos agrícolas, pelo vento e pela água da chuva e de irrigação. Altas temperaturas acima de 28 °C e elevada umidade relativa do ar favorecem a ocorrência da doença, por isso há maior prevalência da

doença nos países tropicais onde o feijoeiro-comum é produzido (Shi et al., 2011; Carneiro et al., 2015).

Os sintomas do CBC ocorrem em todos os órgãos aéreos do feijoeiro-comum, afetando folhas, caules, vagens e sementes. A *Xap* penetra nas folhas via estômatos ou feridas, e, posteriormente, invade os espaços intercelulares, causando uma dissolução gradual da lamela média. Nas folhas observam-se pequenas manchas encharcadas (anasarca) e translúcidas; as lesões tornam-se pardas e ocupam grandes áreas da folha, e à medida que se desenvolvem, os tecidos infectados tornam-se secos e quebradiços. As lesões podem estar esparsas no limbo, ou na parte marginal da folha e, normalmente, são circundadas por halo amarelo, sintoma mais frequente. Em caules e vagens, as lesões podem ser deprimidas e encharcadas, às vezes avermelhadas. As sementes podem apodrecer e enrugam, ou ainda apresentar descoloração na região do hilo, se a infecção ocorrer quando as vagens são novas. Quando o clima é favorável a *Xap*, desfolha, estrangulamento e queda de caules e hastes podem ocorrer (Sartorato e Rava, 1994; Thung e Sartorato, 2002; Bianchini et al., 2005; Carneiro et al., 2015).

Diversas estratégias têm sido propostas para o controle do CBC em feijoeiro-comum, tais como o uso de sementes livres do patógeno e certificadas, rotação de culturas com espécies não hospedeiras, destruição de restos culturais, eliminação de hospedeiros alternativos, aplicação de agroquímicos em doses recomendadas e a utilização de cultivares resistentes (Carneiro et al., 2015). A mais atrativa estratégia de manejo de doenças é a utilização de cultivares geneticamente resistentes, principalmente, para o cultivo em áreas com alto potencial de infestação do patógeno, podendo ainda ser utilizada com as demais medidas de controle. Além disso, é de fácil adoção pelos produtores agrícolas em razão de seu baixo custo, minimizando o uso indiscriminado de defensivos agrícolas e os impactos causados ao meio ambiente (Costa e Rava, 2003; Trindade et al., 2015).

3.2.2.3. Índice de reflectância foliar

Na agricultura, na última década, estão sendo realizadas pesquisas que utilizam técnicas de sensoriamento, que podem reduzir o impacto ambiental e os

custos com produtos fitossanitários, uma vez que contribui para uma rápida diagnose e detecção pré-sintomática de doenças, a fim de evitar o surgimento dos primeiros sinais de distúrbios (Sankaran et al., 2010; Mahlein et al., 2012; Barbedo, 2013; Chemura et al., 2016), sendo uma maneira alternativa aos métodos tradicionais de análise de doença.

Índices reflectância foliar ou também índices de vegetação têm sido utilizados para compreender diversos parâmetros fisiológicos da planta. Esses índices podem servir de base em muitas aplicações de sensoriamento remoto para o manejo de várias culturas economicamente importantes, visto que estão correlacionados com diversas propriedades biofísicas importantes (Ahamed et al., 2011). Dentre estas propriedades, tais como cobertura vegetal, biomassa, índice de área foliar, distúrbios nutricionais, estimativa da produtividade, condições físico-químicas do solo (Ponzoni e Shimabukuro, 2009), teor de antocianina e carotenoide (Gitelson et al., 2001; Gitelson et al., 2002), clorofila (Smith et al., 1995), pigmentos fotossintéticos (Gamon et al., 1992) senescência (Merzlyak et al., 1999), conteúdo de água (Peñuelas et al., 1997).

Segundo Mahlein et al. (2010), índices de vegetação podem ainda ser empregados para diferenciar entre plantas sadias e doentes; para a quantificação de doenças. A aplicação de índices de reflectância foliar para detecção de doenças em plantas é possível porque as plantas infectadas mostram diferentes espectros de reflectância quando comparada com plantas saudáveis (Marin et al., 2019a) ou avaliando o progresso da doença ao longo do tempo. Essa reflectância na folha alterada nas faixas dos espectros infravermelhos visíveis é por causa de uma série de reações fisiológicas provocada na planta, como perda de água e degradação da clorofila (Zhang et al., 2003; Boechat et al., 2014).

Existem diversos índices de reflectância foliar que visam explorar as atividades espectrais das plantas na faixa do visível e do infravermelho próximo (Ponzoni e Shimabukuro, 2007). Entre eles, destacam-se: a) Índice de reflectância de antocianina (*Anthocyanin Index Reflectance 1* – ARI 1) e b) Índice de reflectância de antocianina (*Anthocyanin Reflectance Index 2* – ARI 2), estes índices estão associados à concentração de antocianina na planta (Gitelson et al., 2001); c) Índice de reflectância de carotenoide (*Carotenoid Reflectance Index 1* – CRI 1) está relacionado com concentração de carotenoide na planta (Gitelson et al., 2002); d) Índice de verde (*Green Index* – G) está associado à intensidade de

coloração verde presente nas folhas (Smith et al., 1995); e) Índice de vegetação por diferença normalizada (*Normalized Difference Vegetation Index* – NDVI) é amplamente utilizado na estimativa de biomassa (Rouse et al., 1974); f) Índice de reflectância fotoquímica (*Photochemical Reflectance Index* – PRI) está correlacionado com mudanças na intensidade de reflectância em torno de 531 nm e informa sobre as alterações do pigmento no ciclo xantófilo (Gamon et al., 1992), que geralmente acompanham o estresse (Gamon et al., 1997); g) Índice de senescência de plantas (*Plant Senescence Reflectance Index* – PSRI) determina o estágio de senescência das folhas e amadurecimento dos frutos com alto grau de precisão, pois é sensível à retenção de clorofila/carotenoide presente na folha e nos frutos (Merzlyak et al., 1999); h) Índice de pigmento insensível à estrutura (*Structure-Insensitive Pigment Index* – SIPI) é associado à proporção de carotenoides totais para Clorofila a (Peñuelas et al., 1995); i) Índice da banda de água (*Water Band Index* – WBI) foi definido na faixa de reflectância de 950 nm. O WBI foi usado para rastrear mudanças no conteúdo relativo de água, potencial hídrico foliar e condutância estomática (Peñuelas et al., 1993). Quanto à detecção de estresse, o WBI é um bom indicador do estado da água em plantas expostas ao estresse por salinidade (Peñuelas et al., 1997).

A maioria desses índices vem sendo empregado para estresse abiótico em vegetais (Mahajan et al., 2014; Oliveira et al., 2017). No entanto, a utilização destes índices para diagnosticar doenças de plantas em estágio inicial de infecção, ainda é raro na literatura. Recentemente alguns trabalhos relataram estudos em diferentes patossistemas, tais como: *Glycine max* – *Phakopsora pachyrhizi* (Silva et al., 2009; Hikishima et al., 2010; Arantes et al., 2019); *P. vulgaris* – *Sclerotinia sclerotiorum* (Boechat et al., 2014); *Triticum* spp. – Oídio (Lin et al., 2018); *Capsicum* spp. – *Tobamovirus* (Janeczko et al., 2018); *Coffea arabica* – *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Marin et al., 2019a) e, *Cercospora coffeicola* (Marin et al., 2019b); *Eucalyptus* spp. – *Erwinia psidii* (Pedrali et al., 2019); Trigo – *Fusarium* spp. (Mahlein et al., 2019).

3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1. Germoplasma

Foram utilizados oito acessos de feijão-comum, sendo sete previamente investigados quanto à sua divergência genética por Cavalcanti (2018). Estes acessos pertencem ao Banco de Germoplasma (BAG) da UENF, que é composto por exemplares coletados de diversos municípios e comunidades do estado do Rio de Janeiro. A cultivar BAC-6 foi utilizada como padrão de moderada resistência ao CBC (Rodrigues et al., 1999; Ferreira et al., 2003; Trindade et al., 2015) (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação, descrição e origem dos acessos de *P. vulgaris*, coletados no estado do Rio de Janeiro. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Nº	Identificação	Descrição do Acesso	Origem
1	UENF 2250	Feijão cor sim - cor não	Itaocara
2	UENF 2252	Feijão Preto	Macaé
3	UENF 2263	Feijão Vermelho	Casimiro de Abreu
4	UENF 2267	Feijão Mulatinho Pardo	Silva Jardim
5	UENF 2276	Feijão Castanho escuro	Campos
6	UENF 2328	Feijão Rosinha	Porciúncula
7	UENF 2365	Feijão Bege-rosado	Varre-Sai
8	BAC-6	Feijão Carioca	IAPAR

*Informações extraídas de Rodrigues et al. (1999) e Cavalcanti (2018).

3.2.3.2. Localização e condições experimentais

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP), na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), localizada em Campos dos Goytacazes-RJ (latitude 21°19' e longitude de 41°19', a 13 m de altitude), no período de maio a julho de 2018.

O clima da região é tropical úmido (Aw), com verão chuvoso e inverno seco, com temperatura média anual é de 22,4 °C e precipitação média anual de 1.125 mm, de acordo com a classificação de Köppen (Alvares et al., 2013).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com oito tratamentos (acessos) e cinco repetições, sendo cada parcela constituída por uma planta, disposta em fileiras duplas, totalizando 40 plantas.

As plantas foram cultivadas em vasos de polietileno com capacidade de 5 L, envelopados com papel alumínio para isolamento térmico (Figura 1A). Foram semeadas três sementes por vaso e, após a germinação, foi realizado o desbaste, deixando-se apenas uma planta. A adubação do solo foi feita de acordo com o Manual de Adubação para o estado do Rio de Janeiro e a análise de solo. O sistema de irrigação utilizado foi por gotejamento. Os demais tratos culturais foram realizados segundo as recomendações para a cultura do feijoeiro (Carneiro et al., 2015).

3.2.3.3. Preparo do inóculo bacteriano

Foi utilizado o patógeno de origem etiológica bacteriana *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (isolado 139-y) (Figura 1C), pertencente à coleção do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), da UENF.

A estirpe bacteriana foi cultivada em placas de Petri, contendo meio de cultura sólido DYGS (*Dextrose Yeast Glucose Sucrose*) (2g de glicose; 1,5g de peptona; 2g de extrato de levedura; 0,5g de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,5g ácido glutâmico; e 18g ágar, pH 7,0) (Rodrigues Neto et al., 1986; Souza et al., 2008; Trindade et al., 2015), incubada a uma temperatura de 28 ± 2 °C. Após 36h, a concentração de células foi ajustada para 10^5 ufc.mL⁻¹, em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 640 nm (Arnaud-Santana et al., 1994) e 0,460 de absorvância (Ferreira, 2002). As inoculações foram feitas no mesmo dia do preparo da suspensão bacteriana, ao final da tarde (Rodrigues et al., 1999; Trindade et al., 2015).

3.2.3.4. Inoculação em folhas

As inoculações foram realizadas quando as plantas atingiram o primeiro trifólio completamente expandido (estádio V₃/V₄), aproximadamente 15 dias após a emergência. Foi selecionado o folíolo central de cada planta, os quais foram previamente identificados com fios de lã para diferenciar das folhas não

inoculadas (Figura 1B). Cada folíolo foi inoculado com aproximadamente 1 mL da suspensão bacteriana [10^5 ufc.mL⁻¹], pelo método de infiltração, com uma seringa hipodérmica (1 mL) (Pérez-Bueno et al., 2015) (Figura 1C).



Figura 1. Etapas para a inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em folhas de *P. vulgaris* L. (A) Experimento conduzido em casa de vegetação na UAP/UENF; (B) Folha central de *P. vulgaris* identificada com fios de lã; (C) Inoculação com a *Xap*, estirpe 139-y [10^5 ufc.mL⁻¹], por infiltração em folhas de *P. vulgaris*. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

3.2.3.5. Avaliação da reação ao CBC

3.2.3.5.1. Imagem termográfica por infravermelho

Imagens termográficas foram obtidas utilizando uma câmera por infravermelho (T450sc, FLIR Systems, Inc., EUA) (Figura 2). Esta câmera possui um sistema FLIR - *Foward Looking Infra Red* (visão dianteira por infravermelho),

com uma sensibilidade espectral variando de 7,5 mm a 13 mm, resolução de 320 x 240 pixels, e emissividade fixada em 0,95 (FLIR Systems, 2020).

A faixa de temperatura padrão da câmera varia entre -40 °C a 1500 °C, com alta precisão ± 1 °C ou $\pm 1\%$. As ferramentas de análise incluem medidores de ponto, detecção isotérmica de marcadores automáticos de quente ou frio. A principal vantagem desta câmera termográfica é ampliar os campos de visão o que permite a visualização tanto em imagem por infravermelho (IR) como da imagem digital (RGB), obtendo uma melhor visualização de todos os detalhes do alvo e, melhorando os relatórios de termografia (FLIR Systems, 2020).

As imagens térmicas foram registradas 24h após a inoculação com a *Xap*, diariamente, durante cinco dias, em folhas de feijoeiro inoculadas com a *Xap* e não inoculadas (controle). As plantas foram avaliadas em casa de vegetação, no horário de 12h as 14h30, a uma distância em torno de 30 cm das folhas (Oerke et al., 2006; Gomez, 2014). Ao capturar as imagens, a câmera foi posicionada sobre um tripé, para fornecer uma maior estabilidade.



Figura 2. Câmera termográfica por infravermelho (T450sc, FLIR Systems, Inc., EUA). UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

3.2.3.5.2. Índices de reflectância foliar

Nove índices de reflectância foliar foram medidos utilizando o mini espectrômetro foliar portátil CI-710 (CID Bio-Science, Inc., Camas, Washington, USA) (Figura 3, Tabela 2). Estes índices foram escolhidos com base em parâmetros fisiológicos, calculados automaticamente, por meio de fórmulas pré-estabelecidas comuns à espectrometria.



Figura 3. Mini espectrômetro foliar portátil CI-710 (CID Bio-Science, Inc., Camas, Washington, USA). UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

O mini espectrômetro foliar foi conectado a um computador portátil *touch screen*. Este espectrômetro realiza mensurações de absorvância, transmitância e reflectância da luz de substâncias biológicas, na região visível ao infravermelho próximo nos comprimentos de onda entre 400 e 950 nm, de acordo com o *software* interno do sistema. A faixa espectral fornecida é por meio de uma luz de LED azul e lâmpada incandescente (CID Bio-Science, 2020). Este equipamento foi configurado de acordo o recomendado no manual, no modo de reflectância, adotando o tempo de integração do sinal ajustado para 300 ms, fator de *Integration Time* em seu valor mais elevado, relação sinal: ruído *Scans Average 2* e valor 10 para *Boxcar Width* (Oliveira et al., 2017; Janeczko et al., 2018). Antes de se proceder a leitura espectral, foi realizada a leitura do branco padrão, utilizado para calibrar o aparelho.

O equipamento pode ser utilizado para diversas finalidades como quantificações de concentrações, análise de cor, estudo de reações fotoquímicas como fotossíntese, e para quantificar as propriedades físicas ou ópticas como espessura de filme, índice de refração e coeficiente de extinção. Aplicável em monitoramento de metabolismo envolvendo fotossíntese, estado de nutrientes absorvidos pelas plantas, mudanças no conteúdo químico em órgãos de plantas, detecção de plantas doentes (CID Bio-Science, 2020).

As plantas foram avaliadas em casa de vegetação, 24h após a inoculação, no horário de 10:00h as 11:30h, com cinco repetições por tratamento (uma repetição = uma folha de uma planta), durante cinco dias. As leituras foram

feitas no lado superior da lâmina foliar, no mesmo ponto onde foi feito a inoculação com a *Xap* (Figura 3).

Tabela 2. Índices de reflectância foliar. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Nº	Índice	Equação	Relacionado	Referências
1	ARI 1	$(1/R_{550}) - (1/R_{700})$	Antocianina	(Gitelson et al., 2001)
2	ARI 2	$R_{800}^* (1/R_{550}) - (1/R_{700})$	Antocianina	(Gitelson et al., 2001)
3	CRI 1	$(1/R_{510}) - (1/R_{550})$	Carotenoide	(Gitelson et al., 2002)
4	G	(R_{554} / R_{677})	Clorofila	(Smith et al., 1995)
5	NDVI	$(R_{800} - R_{680}) / (R_{800} + R_{680})$	Biomassa, área foliar	(Rouse et al., 1974)
6	PRI	$(R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$	Pigmentos Fotossintéticos	(Gamon et al., 1992)
7	PSRI	$(R_{680} - R_{500}) / R_{750}$	Senescência	(Merzlyak et al., 1999)
8	SIPI	$(R_{800} - R_{445}) / (R_{800} + R_{680})$	Carotenoides/ Clorofila a	(Peñuelas et al., 1995)
9	WBI	(R_{900} / R_{970})	Conteúdo de água	(Peñuelas et al., 1997)

1-ARI 1= Índice de reflectância de antocianina 1; 2-ARI 2= Índice de reflectância de antocianina 2; 3-CRI 1= Índice de reflectância de carotenoide; 4-G= Índice de verde; 5-NDVI= Índice de vegetação por diferença normalizada; 6-PRI= Índice de reflectância fotoquímica; 7-PSRI= Índice de senescência de plantas; 8-SIPI= Índice de pigmento insensível à estrutura; 9-WBI= Índice da banda de água. *R= corresponde a reflectância em comprimentos de ondas específicos.

3.2.3.5.3. Escala de notas de severidade

Para determinar a severidade do CBC foi utilizada uma escala de notas variando de um a cinco (1 a 5), em plantas individuais, de cada acesso. A avaliação foi realizada diariamente, durante cinco dias após 24h da inoculação com a *Xap*, de acordo com Pastor-Corrales et al. (1981) e Rodrigues et al. (1999), com modificações (Tabela 3; Figura 4).

Tabela 3. Escore, incidência da doença e nível de resistência com base nos sintomas do crestamento bacteriano comum, ocasionado pela *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, em acessos de *P. vulgaris*. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Escore	Incidência da doença	Nível de resistência
1	Sem sintomas	Altamente Resistente
2	Presença de lesão clorótica	Resistente
3	Presença de lesão clorótica com pontuações necróticas	Moderado
4	Lesão necrótica com presença de halo clorótico	Suscetível
5	Coalescimento das áreas necrótica com presença de halo clorótico	Altamente Suscetível



Figura 4. Escala de notas de severidade para a avaliação do crestamento bacteriano comum, causada pela bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, em *P. vulgaris*. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

3.2.3.5.4. Período de Incubação (PI)

A quantificação do PI correspondeu ao período em dias entre a inoculação da *Xap*, até o surgimento dos primeiros sintomas do CBC na folha. A avaliação foi realizada em plantas individuais, de cada acesso *P. vulgaris*, diariamente durante cinco dias, após 24h da inoculação com a bactéria.

3.2.3.6. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas usando o software SPSS15.0 (*Statistical Package for the Social Sciences Inc.*, Chicago, IL, USA). Diferenças significativas entre as temperaturas dos tratamentos (inoculado e controle) e dos

índices de vegetação (1 DAI e 5 DAI) foram analisadas independentemente (teste t , $p \leq 0,05$) para comparação.

Valores médios dos acessos de feijão-comum ($p \leq 0,05$), para cada parâmetro avaliado (ΔT = diferencial de temperatura média, índices de reflectância foliar, AACPD e PI), foram submetidos à ANOVA e, realizado um teste de Duncan para comparação entre as médias de tratamento ($p \leq 0,05$).

3.2.3.6.1. Imagem termográfica por infravermelho

As imagens termográficas foram analisadas através do *software* FLIR Tools. A paleta de cores utilizada para medição da temperatura foi a *Iron*.

Calculou-se o diferencial de temperatura média (ΔT), nos espectros das regiões entre as temperaturas médias das folhas inoculadas com as temperaturas médias das folhas não inoculadas (controle), a fim de visualizar o efeito da infecção, de acordo com a temperatura foliar, ao longo do tempo (Gomez, 2014; Pérez-Bueno et al., 2015), pela expressão:

$$\Delta T = | T_{inoculado} - T_{controle} |$$

Em que:

ΔT = Diferencial de temperatura média;

$T_{inoculado}$ = Temperatura média da folha inoculada com a *Xap*;

$T_{controle}$ = Temperatura média da folha controle (não inoculadas).

3.2.3.6.2. Índice de reflectância foliar

A leitura espectral foliar foi realizada por meio do *SpectraSnap!* (*Software* versão 1.1.3.150, CID Bio-Science), que acompanha o aparelho CI-710.

Gráficos de dispersão com valores da reposta espectral média de cada um dos índices de vegetação, para cada acesso, comparando o primeiro dia (1 DAI) com o último dia (5 DAI), após a inoculação com a *Xap*, foram gerados, com a finalidade de estudar o comportamento espectral no progresso da doença do CBC, utilizando o Excel. Posteriormente, realizou-se uma análise usando

correlação de Pearson para compreender o grau de associação entre as variáveis, por meio do *software* JMP Trial 15.0.

3.2.3.6.3. Escala de notas de severidade

Os resultados da avaliação pela escala de notas foram utilizados para o cálculo da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), segundo Shaner e Finley (1977), pela expressão:

$$AACPD = \sum_1^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Em que:

n = número total de observações;

y_i = proporção da doença na i -ésima observação;

t_i = tempo (dias) na i -ésima observação.

3.2.4. RESULTADOS

3.2.4.1. Análise de variância

Houve efeito significativo ($p \leq 0,05$), para a fonte de variação genótipos em todos os parâmetros de resistência avaliados (ΔT , índices de reflectância foliar, AACPD e PI) denotando a variabilidade existente entre os acessos do banco de germoplasma (Tabela 4, 5 e 6).

Tabela 4. Estimativas dos quadrados médios obtidos pela análise de variância para o diferencial de temperatura média (ΔT), em oito acessos de *P. vulgaris*, um, três e cinco dias após a inoculação (DAI) com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

FV	GL	ΔT °C		
		1 DAI	3 DAI	5 DAI
Genótipo	7	0,945*	2,389*	1,019*
Resíduo	32	0,235	0,569	0,346
Média		1,87	2,19	2,32
CV (%)		33,25	48,83	32,88

*Indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste F.

Tabela 5. Estimativas dos quadrados médios obtidos pela análise de variância para os nove índices de reflectância foliar, em oito acessos de *P. vulgaris*, um e cinco dias após a inoculação (DAI), com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

1 DAI										
FV	GL	ARI1	ARI 2	CRI 1	G	NDVI	PRI	PSRI	SIPI	WBI
Genótipo	7	0,105*	0,277 ^{ns}	0,002 ^{ns}	0,00043*	0,0007 ^{ns}	0,007 ^{ns}	0,521 ^{ns}	0,00014 ^{ns}	0,0006 ^{ns}
Resíduo	32	0,127	0,481	0,005	0,00032	0,0002	0,010	0,379	0,00013	0,0014
Média		0,00057	0,028	0,0207	2,10	0,615	0,0273	-0,0098	0,670	0,846
CV (%)		11,04	42,56	4,07	5,82	8,28	6,06	27,53	6,20	47,68
5 DAI										
FV	GL	ARI 1	ARI 2	CRI 1	G	NDVI	PRI	PSRI	SIPI	WBI
Genótipo	7	0,188*	0,175*	0,006 ^{ns}	0,003*	0,0010*	0,088*	0,295*	0,0003 ^{ns}	0,0003 ^{ns}
Resíduo	32	0,071	0,063	0,011	0,001	0,0008	0,048	0,162	0,0004	0,0008
Média		0,0033	0,187	0,0192	1,872	0,574	0,0096	0,0097	0,654	0,868
CV (%)		11,74	35,59	5,89	13,62	12,59	28,77	22,46	10,31	43,46

*Indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) e ns= não significativo ($p \geq 0,05$) pelo teste F.

Tabela 6. Estimativas dos quadrados médios obtidos pela análise de variância para área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e período de incubação (PI) em oito acessos de *P. vulgaris*, inoculados com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

FV	GL	AACPD	PI
Genótipo	7	51,024*	2,118*
Resíduo	32	5,437	0,758
Média		15,47	3,15
CV (%)		24,88	28,82

*Indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste F.

Os coeficientes de variação (CV) variaram de 4,07 a 47,68 para todos os caracteres de resistência avaliados (Tabela 4, 5 e 6). O coeficiente de variação é um parâmetro útil para especificar com certa eficiência a exatidão dos resultados experimentais permitindo comparações entre variáveis de naturezas distintas e fornecendo uma ideia de precisão.

3.2.4.2. Avaliação da reação ao CBC

3.2.4.2.1. Imagem termográfica por infravermelho

As imagens termográficas detectaram diferenças de temperatura significativas da interação entre *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e os acessos de feijoeiro-comum, desde o primeiro dia após a inoculação (1 DAI), antes de qualquer sintoma visível aparecer, como uma resposta ao desenvolvimento da doença do CBC (Figura 7). Observou-se uma coloração amarelo-alaranjada no local inoculado com a *Xap*, na parte inferior da folha, ao logo dos cinco dias de avaliação (Figura 7). Verificou-se que nas folhas inoculadas com a bactéria *Xap* a temperatura foliar foi significativamente maior em comparação com as folhas não-inoculadas (controle) (Tabela 7).

No primeiro dia de avaliação após a inoculação, observou-se que os genótipos BAC-6, UENF 2276 e UENF 2250 apresentaram os menores ΔT 1,03 °C, 1,50 °C e 1,55 °C, respectivamente. Enquanto o acesso UENF 2365 obteve o maior diferencial de temperatura média com 2,52 °C, não diferindo dos acessos UENF 2267 (2,27 °C), UENF 2252 (2,22 °C) e UENF 2263 (2,17 °C) (Tabela 7).

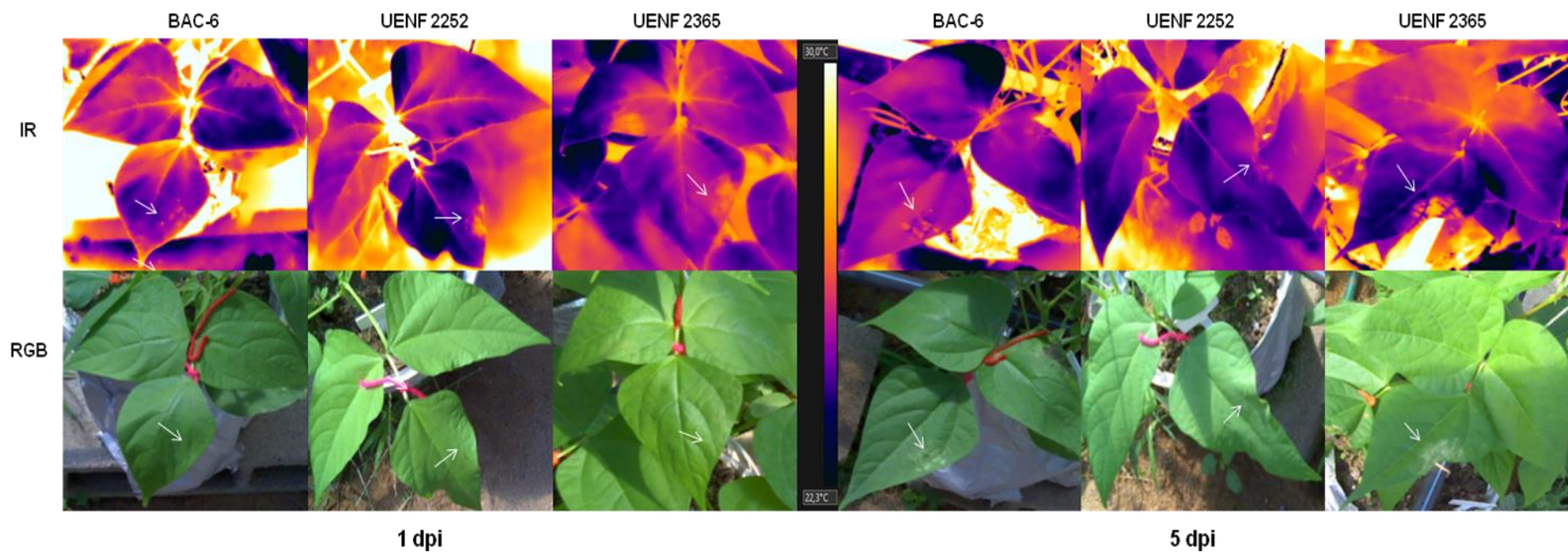


Figura 7. Desenvolvimento de lesões causadas por *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, em folhas de três acessos de *P. vulgaris*, visualizadas por imagens termográficas por infravermelho (IRT) e imagens digitais (RGB), um e cinco dias após a inoculação (DAI), na parte adaxial da folha (seta). UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Sintomas visuais apareceram aos três dias após a inoculação, em todos os acessos inoculados, exceto para o acesso UENF 2252, o qual obteve o menor valor de ΔT (1,47 °C). O acesso UENF 2365 obteve o maior ΔT (4,27 °C) mais elevado do que o controle, diferindo dos demais acessos (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação entre os valores médios das temperaturas dos oito acessos de *P. vulgaris* inoculados com a *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e controle, e o diferencial de temperatura média (ΔT), um, três e cinco dias após a inoculação (DAI). UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

DAI	Acessos	T °C Inoculado	T °C Controle	ΔT °C
1	UENF 2250	26,25*	24,70	1,55 ab
	UENF 2252	27,47*	25,25	2,22 bc
	UENF 2263	26,93*	24,76	2,17 bc
	UENF 2267	27,00*	24,73	2,27 bc
	UENF 2276	26,46*	24,96	1,50 ab
	UENF 2328	26,80*	25,13	1,67 ab
	UENF 2365	27,80*	25,28	2,52 c
	BAC-6	25,97*	24,94	1,03 a
T ambiente: 34,6 °C				
3	UENF 2250	26,57*	24,70	1,87 a
	UENF 2252	26,17*	24,70	1,47 a
	UENF 2263	26,57*	24,57	2,00 a
	UENF 2267	25,23*	23,13	2,10 a
	UENF 2276	26,63*	24,56	2,07 a
	UENF 2328	26,52*	24,48	1,72 a
	UENF 2365	29,50*	25,23	4,27 b
	BAC-6	25,77*	24,07	1,70 a
T ambiente: 34,6 °C				
5	UENF 2250	27,75*	25,93	1,82 abc
	UENF 2252	27,37*	25,75	1,62 a
	UENF 2263	28,77*	25,90	2,87 cd
	UENF 2267	28,87*	26,07	2,80 bcd
	UENF 2276	27,56*	24,96	2,60 bcd
	UENF 2328	28,30*	26,57	1,73 ab
	UENF 2365	27,65*	24,55	3,10 d
	BAC-6	26,57*	24,57	2,00 abc
T ambiente: 33,2 °C				

*Indica diferença significativa (teste *t*, $p \leq 0,05$) entre o tratamento inoculado e controle. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, dentro do mesmo dia de avaliação, não diferem entre si, pelo teste Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

No último dia de avaliação (5 DAI), o acesso UENF 2252 obteve o menor valor do diferencial de temperatura (1,62 °C), sem apresentar sintomas visíveis. Este ficou classificado junto ao padrão de resistência BAC-6 (2,00 °C), que

diferiram significativamente dos acessos UENF 2365, UENF 2263, UENF 2267 e UENF 2276, que apresentaram os maiores valores do ΔT (3,10 °C), (2,87 °C), (2,80 °C) e (2,60 °C), respectivamente, sendo considerados suscetíveis ao CBC (Tabela 7). O acesso UENF 2328 obteve um ΔT constante ao longo das avaliações, com valores de 1,67 °C (1 DAI), 1,72 °C (3 DAI) e 1,73 °C (5 DAI) (Tabela 7).

O segundo e o quarto dia de avaliação após a inoculação não apresentaram diferenças significativas em relação ao ΔT (dados não mostrados) pela termografia, devido à grande influência das condições climáticas observadas no dia dessas avaliações, pois a radiação solar foi baixa por causa da nebulosidade.

3.2.4.2.2. Índice de reflectância foliar

3.2.4.2.2.1. Análise espectral

Índices de reflectância foliar foram aplicados com o intuito de verificar o desenvolvimento do CBB em acessos de feijão-comum. Comparou-se o primeiro (1 DAI) e o último dia (5 DAI), após a inoculação com a *Xap*, para verificar o comportamento espectral no progresso da doença do CBC (Figura 8). Os índices de reflectância foliar que evidenciaram regiões afetadas pela doença, com maior dispersão dos dados dos acessos, ao nível de significância ($p \leq 0,05$) foram: ARI 1, ARI 2, G, NDVI, PRI e PSRI. No entanto, nos demais índices (CRI 1, SIPI e WBI) não foram detectados diferença significativa ($p \leq 0,05$), entre os dias avaliados (Figura 8) e nem entre os acessos de feijão-comum (Tabela 8).

Para os índices de reflectância ARI 1, ARI 2 e PSRI houve um aumento significativo dos seus valores, com o progresso da doença. Enquanto que, nos índices G, NDVI, PRI ocorreu um decréscimo nos valores médios, ao final do experimento (5 DAI) (Figura 8, Tabela 5).

Quando se comparou apenas as primeiras 24h após a inoculação (1 DAI), para cada índice de vegetação, apenas os acessos UENF 2276 e UENF 2365 para ARI 1 e, os acessos UENF 2250 e UENF 2267 para o índice G proporcionaram diferença significância ($p \leq 0,05$). Os demais índices não apontaram diferença no primeiro dia (Tabela 8).

Os índices de reflectância ARI 1 e ARI 2 apresentaram um aumento nos valores médios, ao final do experimento (5 DAI), para todos os acessos de *P. vulgaris*, devido ao ataque do patógeno. No entanto, os genótipos UENF 2263 e BAC-6 não diferiram significativamente, quando se comparou o primeiro dia avaliado com o último dia de avaliação (Figura 8, Tabela 5). Para o índice ARI 1 apenas o acesso UENF 2365 (0,0056) diferiu significativamente do genótipo BAC-6 (0,0022) no quinto dia avaliado (Tabela 8). Quanto ao índice ARI 2, os acessos UENF 2365 (0,315) e UENF 2250 (0,273) diferiram significativamente do genótipo padrão BAC-6 (0,124), uma vez que proporcionaram os maiores valores médios. Observou-se que o acesso UENF 2263 obteve o menor valor médio, tanto para ARI 1 (0,0018) como para ARI 2 (0,1008), entre todos os acessos, inclusive ao padrão de resistência, apesar de não haver diferença estatística entre o BAC-6 (Tabela 8).

Para o CRI 1 não houve diferença significativa entre os dias (1 DAI x 5 DAI) e nem entre os acessos de *P. vulgaris* (Figura 8, Tabela 5). Os valores médios variaram de 0,020 a 0,022, após 24h da inoculação (1 DAI), e no último dia entre 0,017 a 0,022 (5 DAI) (Tabela 8). Este índice está relacionado com a produção de carotenoide na planta. Valores desse índice podem variar de 0 a 15 (Gitelson et al., 2002).

Para o índice de verde (G) os acessos UENF 2263 (1,98), UENF 2252 (1,96) e UENF 2276 (1,88) apresentaram os maiores valores médios e não diferiram do genótipo padrão de resistência BAC-6 (1,95) (5 DAI). Estes quatro acessos diferiram significativamente do acesso UENF 2365, que obteve o menor valor médio (1,72) e, maior porcentagem de redução (19%), quando comparado ao primeiro dia (1 DAI), sendo considerado o mais suscetível (Tabela 8). A maioria dos acessos de *P. vulgaris* reduziu significativamente os valores médios de G, exceto UENF 2263 e o genótipo BAC-6 que não tiveram diferença estatística ao longo do experimento (Figura 8).

Menores valores médios de NDVI foram observados ao final da avaliação (5 DAI) para todos os acessos, devido ao avanço da doença do CBC (Figura 8, Tabela 5). Entretanto, apenas os acessos UENF 2263 e UENF 2276 não apresentaram diferença significativa quando comparado ao primeiro dia de avaliação (1 DAI) (Figura 8).

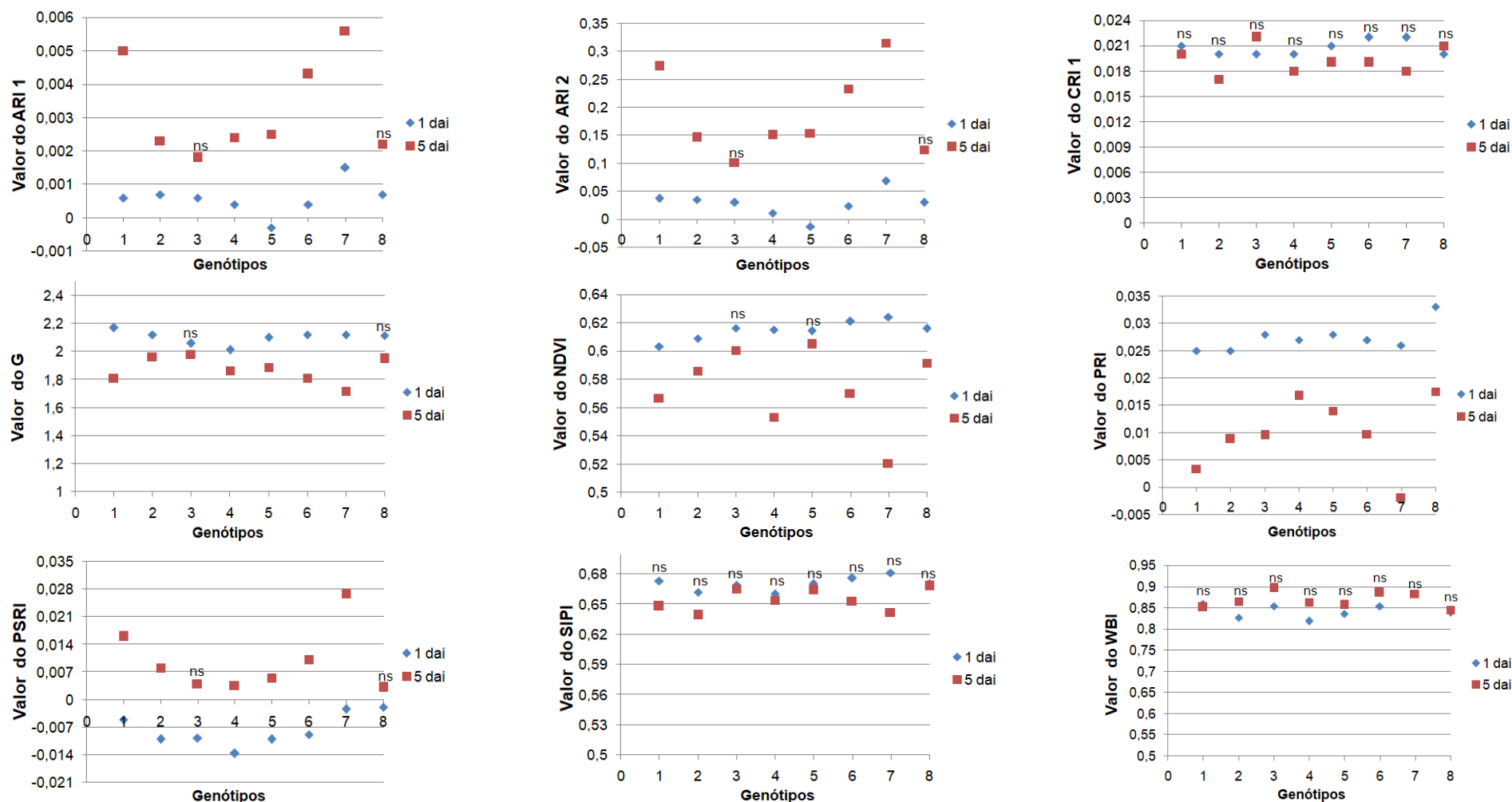


Figura 8. Relação entre os nove índices de reflectância foliar, quanto à reação a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, em oito acessos de *P. vulgaris* (1=UENF 2250, 2= UENF 2252, 3= UENF 2263, 4= UENF 2267, 5= UENF 2276, 6= UENF 2328, 7= UENF 2365 e 8= BAC-6), comparadas entre o primeiro (1 DAI) e o último dia após a inoculação (5 DAI), pelo teste *t* ($p \leq 0,05$); ns= não significativo ($p \geq 0,05$). UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Não foi observada diferença significativa entre os acessos de *P. vulgaris*, ao longo do experimento (Tabela 8). Valores médios de NDVI variaram de 0,603 a 0,624 após 24h da inoculação (1 DAI), e no último dia entre 0,520 a 0,605 (5 DAI) (Tabela 8). Valores desse índice podem variar de -1 a 1, mas geralmente variam de 0,2 a 0,8 (Rouse et al., 1974).

O índice PRI obteve menores valores médios significativos para todos os acessos, ao final do experimento (5 DAI), quando comparado as primeiras 24h de avaliação (1 DAI), devido à gravidade da doença bacteriana (Figura 8, Tabela 5). O padrão BAC-6 obteve o maior valor médio (0,0175), apesar de não diferir dos demais acessos, exceto do acesso UENF 2365, que detectou o menor valor médio (-0,0019), sendo considerado suscetível ao CBC (5 DAI) (Tabela 8). Valores de PRI podem variar de -1 a 1, mas é mais comum variar de -0,2 a 0,2 (Gamon et al., 1992).

Valores médios negativos de PSRI foram observados no primeiro dia após a inoculação (1 DAI) e, ao longo do experimento. No entanto, com o progresso da doença do CBC, os valores tornaram-se todos positivos (5 DAI) (Figura 8, Tabela 5). O genótipo padrão BAC-6 obteve o menor valor médio (0,0031) (5 DAI), apesar de não diferir dos demais, exceto do acesso UENF 2365, que detectou o maior valor (0,0269) (Tabela 8). Valores desse índice podem variar de -1 a 1, mas é mais comum variar de -0,1 a 0,2 (Merzlyak et al., 1999).

Para os índices SIPI e WBI, não houve diferenças significativas entre os dias avaliados e nem entre os acessos (Figura 8, Tabela 8). Para SIPI, os valores médios variaram de 0,660 a 0,681, após 24h da inoculação (1 DAI), e no último dia de avaliação variaram de 0,639 a 0,668 (5 DAI) (Tabela 8). Este índice está associado à proporção de carotenoides totais para Clorofila a. Valores desse índice podem variar de 0 a 2, mas normalmente variam de 0,8 a 1,8 (Peñuelas et al., 1995). Quanto ao WBI, no primeiro dia de avaliação, os valores variaram de 0,818 a 0,882 (1 DAI), e no último dia após a inoculação, os valores médios variaram de 0,844 a 0,896 (5 DAI) (Tabela 8). Valores próximos de 1 indicam maior conteúdo de água na folha. Esse índice pode variar de 0,8 a 1,2 (Peñuelas et al., 1997).

Tabela 8. Valores médios dos índices de reflectância foliar, avaliados em oito acessos de *P. vulgaris*, inoculados com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Nº	Acessos	Índice de Reflectância									
		DAI	ARI 1	ARI 2	CRI 1	G	NDVI	PRI	PSRI	SIPI	WBI
1	UENF 2250		0,0006ab	0,037a	0,021a	2,171a	0,603a	0,025a	-0,005a	0,673a	0,859a
2	UENF 2252		0,0007ab	0,035a	0,020a	2,120ab	0,609a	0,025a	-0,010a	0,662a	0,827a
3	UENF 2263		0,0006ab	0,030a	0,020a	2,060ab	0,616a	0,028a	-0,0097a	0,669a	0,854a
4	UENF 2267	1º	0,0004ab	0,011a	0,020a	2,013b	0,615a	0,027a	-0,0136a	0,660a	0,818a
5	UENF 2276		-0,0003a	-0,013a	0,021a	2,101ab	0,614a	0,028a	-0,0100a	0,671a	0,835a
6	UENF 2328		0,0004ab	0,024a	0,022a	2,121ab	0,621a	0,027a	-0,0088a	0,676a	0,854a
7	UENF 2365		0,0015b	0,068a	0,022a	2,121ab	0,624a	0,026a	-0,0024a	0,681a	0,882a
8	BAC-6		0,0007ab	0,030a	0,020a	2,114ab	0,616a	0,033a	-0,0192a	0,671a	0,839a
1	UENF 2250		0,0050bc	0,273bc	0,020a	1,809ab	0,567a	0,003ab	0,0160ab	0,648a	0,851a
2	UENF 2252		0,0023ab	0,146ab	0,017a	1,963a	0,586a	0,009ab	0,0080ab	0,639a	0,865a
3	UENF 2263		0,0018a	0,1008a	0,022a	1,982a	0,600a	0,009ab	0,0040a	0,665a	0,896a
4	UENF 2267	5º	0,0024ab	0,150ab	0,018a	1,865ab	0,553a	0,017a	0,0036a	0,654a	0,862a
5	UENF 2276		0,0025ab	0,154ab	0,019a	1,886a	0,605a	0,014a	0,0055a	0,664a	0,856a
6	UENF 2328		0,0043abc	0,233abc	0,019a	1,810ab	0,570a	0,010a	0,0102ab	0,653a	0,885a
7	UENF 2365		0,0056c	0,315c	0,018a	1,718b	0,520a	-0,0019b	0,0269b	0,642a	0,883a
8	BAC-6		0,0022ab	0,124a	0,021a	1,949a	0,591a	0,0175a	0,0031a	0,668a	0,844a

ARI 1= Índice de reflectância de antocianina 1; ARI 2= Índice de reflectância de antocianina 2; CRI 1= Índice de reflectância de carotenoide; G= Índice de verde; NDVI= Índice de vegetação por diferença normalizada; PRI= Índice de reflectância fotoquímica; PSRI= Índice de senescência de plantas; SIPI= Índice de pigmento insensível à estrutura; WBI= Índice da banda de água.*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, dentro do mesmo dia de avaliação, não diferem entre si, pelo teste Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

3.2.4.2.2.2. Análise de correlação

O cálculo dos coeficientes da análise da correlação de Pearson permitiu verificar que seis índices de vegetação estão fortemente correlacionados (Figura 9). Para os índices ARI 1, ARI 2 e PSRI houve uma alta correlação positiva com valores variando entre 0,92 a 0,99 (5 DAI). No entanto, esses índices tiveram forte correlação negativa com G, NDVI, PRI, com valores variando entre -0,76 a -0,94 (5 DAI). O índice de reflectância WBI não apresentou nenhuma correlação significativa (5 DAI) (Figura 9).

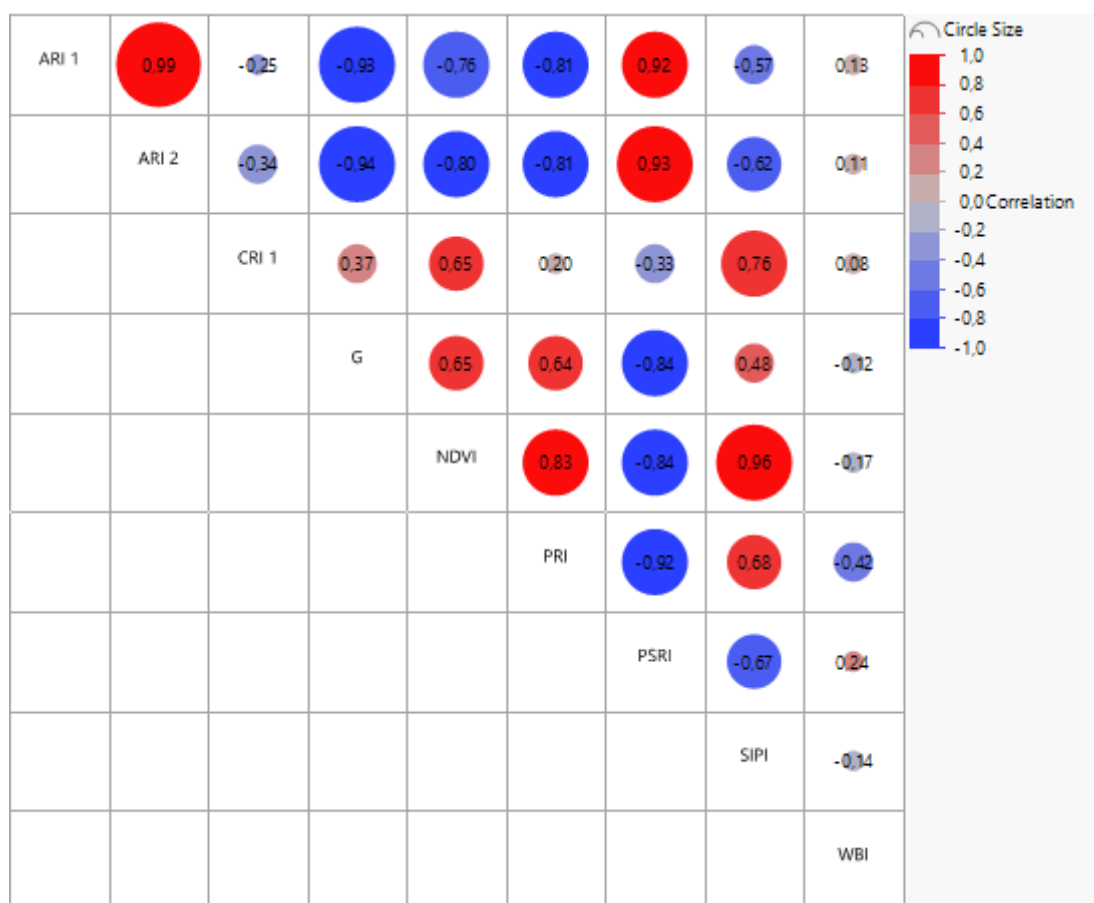


Figura 9. Coeficientes de correlação simples de Pearson em nove índices de reflectância foliar: ARI 1= Índice de reflectância de antocianina 1; ARI 2= Índice de reflectância de antocianina 2; CRI 1= Índice de reflectância de carotenoide; G= Índice de verde; NDVI= Índice de vegetação por diferença normalizada; PRI= Índice de reflectância fotoquímica; PSRI= Índice de senescência de plantas; SIPI= Índice de pigmento insensível à estrutura; WBI= Índice da banda de água, no último dia de avaliação (5 DAI). UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

3.2.4.2.3. Escala de notas de severidade

3.2.4.2.3.1. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)

Na análise quantitativa da resistência Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) (Figura 10), o acesso UENF 2252 foi considerado resistente (nota 2) ao CBC, pois obteve a menor média (9,0), em relação ao padrão de resistência BAC-6 (média 12,33) (classificado com resistência moderada ao CBC) (Rodrigues et al., 1999), no último dia de avaliação. Os acessos UENF 2365 (19,5), UENF 2263 (17,63), UENF 2267 (17) e UENF 2328 (16,4) foram os mais suscetíveis, não sendo observada diferença significativa entre eles.

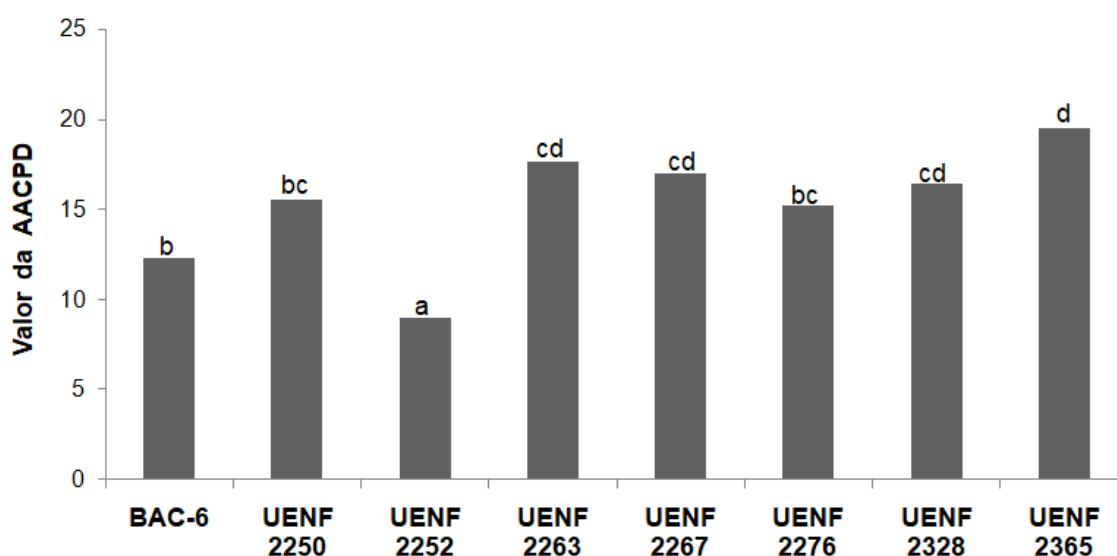


Figura 10. Médias para Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), quanto à reação a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, em oito acessos de *P. vulgaris*, avaliadas durante cinco dias. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

O objetivo de se calcular a AACPD, é avaliar a resistência de acessos quanto aos patógenos. Dessa forma, deseja-se que os acessos registrem baixos valores para esse parâmetro, pois sugere que a severidade da doença foi menor, ou seja, os acessos são resistentes.

3.2.4.2.4. Período de Incubação (PI)

Para o período de incubação (PI) (Figura 11), não houve diferença significativa entre o acesso UENF 2252 e o padrão de resistência BAC-6, que apresentaram os maiores valores médios de PI (4 DAI). Os menores valores médios de PI foram observados nos acessos UENF 2365 (2 DAI), UENF 2267 (2 DAI) e UENF 2263 (3 DAI) (Figura 11).

Ao contrário da AACPD, nesse parâmetro é desejável que os acessos possuam maiores valores. O PI significa o período compreendido em dias, entre o estabelecimento da infecção, até o aparecimento dos primeiros sintomas da doença (Chiwaki et al., 2005).

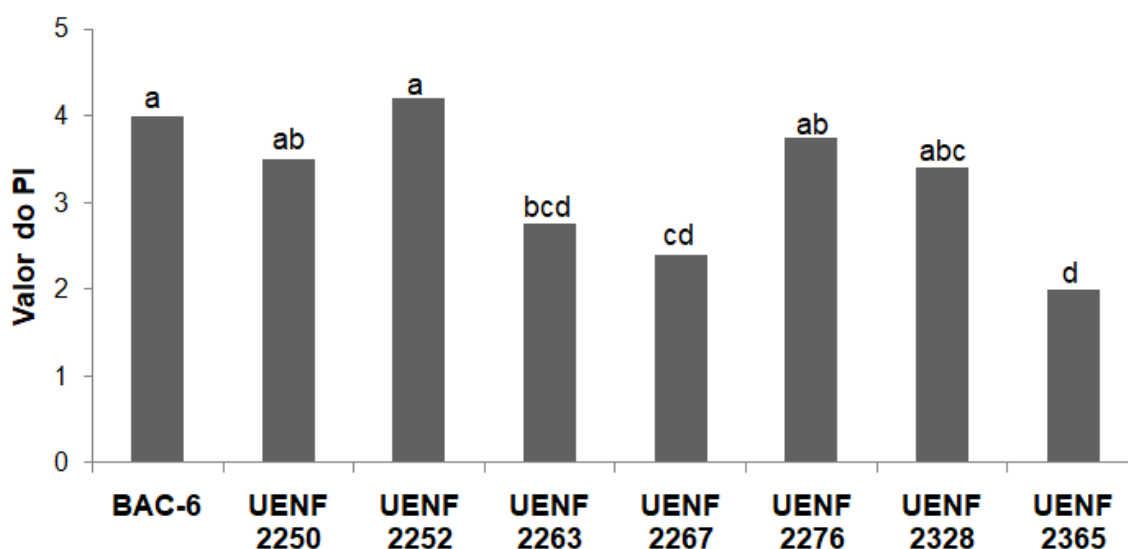


Figura 11. Médias do período de incubação (PI), quanto à reação a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, em oito acessos de *P. vulgaris*, avaliadas durante cinco dias. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

3.2.5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, novas ferramentas tecnológicas com diferentes estratégias para melhorar a avaliação de doenças estão sendo exigidas. Neste contexto, há um crescente interesse no uso de técnicas não destrutivas e mais

precisas, como a termografia por infravermelho e o uso de índices de reflectância foliar, para melhorar o diagnóstico de doenças causadas por agentes patogênicos diversos.

A detecção pré-sintomática por meio da imagem térmica por infravermelho pode monitorar doenças em plantas e aumentar o nosso conhecimento para uma melhor gestão de doenças (Mahlein et al., 2019). Neste trabalho, verificou-se que a termografia por infravermelho foi capaz de identificar o desenvolvimento do CBC em folhas de feijoeiro-comum, desde o primeiro dia após a inoculação, antes que os sintomas visuais pudessem aparecer, quando comparados com o tratamento controle (Figura 7, Tabela 7). Três dias após a inoculação foram observados os primeiros sintomas da doença. Foi detectada uma maior temperatura nas folhas infectadas quando comparada com as folhas controle, durante o experimento.

Os sintomas do desenvolvimento da *Xap* são observados principalmente nas folhas, inicialmente as lesões ficam cloróticas e evoluem para necrose. Posteriormente, as lesões se tornam secas e quebradiças, circundadas por um estreito bordo amarelo, normalmente, associadas com aspecto de queimadura ou crestamento (Sartorato e Rava, 1994), com isso a temperatura tende a aumentar devido à presença de lesões secas e quebradiças no tecido infectado.

Os resultados obtidos com a imagem termográfica apontam os acessos UENF 2365, UENF 2263, UENF 2267 e UENF 2276, como os mais suscetíveis a doença do CBC, pois alcançaram os maiores valores do ΔT , no último dia de avaliação (5 DAI). O acesso UENF 2252 foi considerado resistente ao CBC, pois obteve o menor valor de ΔT , inclusive ao genótipo padrão de resistência BAC-6, sem apresentar sintomas visíveis da doença (Figura 7, Tabela 7). Curiosamente, o acesso UENF 2252 no primeiro dia de avaliação obteve um dos maiores valores de ΔT (2,22 °C), tendo diferença estatística apenas entre o genótipo BAC-6. Uma hipótese para esse fenômeno é que pode conter algum mecanismo de defesa no acesso UENF 2252 que impediu o desenvolvimento da doença do CBC, nas primeiras 24h, e fez com que aumentasse o valor de ΔT e nos demais dias avaliados diminuísse gradualmente.

Estudos anteriores utilizando a termografia por infravermelho na detecção precoce de doenças bacterianas foliares, também verificaram temperaturas mais elevadas na folha inoculada, antes dos sintomas visíveis aparecerem. Chiwaki et

al. (2005) observaram que folhas de tomateiro infectadas com *Ralstonia solanacearum* continham uma temperatura de 0,8 °C mais elevada do que folhas não infectadas, 12 dias antes do aparecimento dos sintomas visíveis. Pérez-Bueno et al. (2015) investigaram dois patovares de *Pseudomonas syringae* (*tomato* e *phaseolicola*) em feijoeiro e observaram um aumento no ΔT de cerca de 0,3 °C em apenas 3h, e até 0,6 °C em 24h após a inoculação, em comparação as folhas controle. Pérez-Bueno et al. (2016a) avaliaram plantas de tabaco inoculadas com *Dickeya dadanti* observaram uma temperatura mais alta do que as plantas não infectadas. Folhas de melão e abobrinha, infectadas com *D. dadantii* apresentaram um ΔT de até 2 °C mais elevada, em comparação com os tratamentos controles, em estádios iniciais da infecção (3 DAI) (Pérez-Bueno et al., 2016b).

Índices de vegetação têm sido cada vez mais explorados para serem utilizados na agricultura de precisão para o diagnóstico e monitoramento de doenças de diversas culturas agrícolas (Hikishima et al., 2010; Janeczko et al., 2018; Arantes et al., 2019; Marin et al., 2019a; Marin et al., 2019b), cujas técnicas baseiam-se nas propriedades espectrais que detectam mudanças na vegetação causada por agentes patogênicos de diversos tipos. Identificar a planta infectada é de extrema importância para tomar medidas adequadas no manejo fitossanitário na lavoura (Moriya, 2015).

Neste estudo, índices de vegetação espectrais relacionados com parâmetros fisiológicos foram calculados e correlacionados com a gravidade da doença do CBC. Do total de nove índices utilizados, seis (ARI 1, ARI 2, G, NDVI, PRI e PSRI) foram os que melhor se relacionaram com a reação da doença do CBC (Figuras 8, 9). Os demais índices não apresentaram nenhuma contribuição para a detecção das regiões infectadas com o CBC (Figura 9).

Os índices ARI 1 e ARI 2 estão correlacionados com a concentração de antocianina presente nas plantas (Gitelson et al., 2001). Antocianinas são pigmentos responsáveis por uma gama de cores que variam do vermelho vivo ao violeta e azul, e são encontradas em frutas, flores e folhas (Bobbio et al., 1995). Estes pigmentos possuem propriedades de defesa quando em contato com agentes patogênicos aumentam a sua produção (Lev-Yaudan e Gould, 2009). De forma geral, o feijoeiro-comum em contato com a *Xap* ativou o mecanismo de defesa e elevou a produção de antocianina, com o progresso da doença (Figura

8). Os resultados mostraram que os acessos UENF 2250 e UENF 2365 foram mais suscetíveis ao ataque da *Xap*, com maiores valores médios de ARI 2 e, apenas o acesso UENF 2365 para ARI 1, em relação ao genótipo padrão de resistência ao cretamento bacteriano comum BAC-6 (Figura 8, Tabela 8). Viswanathan et al. (2000) constataram que quanto mais próximo da região de infecção do patógeno, aumenta a concentração de antocianina, o que indica que a planta ao sofrer um ataque passa a produzir maior quantidade de antocianina nos locais afetados. Moriya et al. (2017) utilizando índices de vegetação para avaliar vírus em cana-de-açúcar observaram um aumento de antocianina, por meio do índice ARI 2.

Os índices de vegetação G, NDVI e PRI estão associados à concentração de clorofila. Baixos valores desses índices indicam menores intensidades de coloração verde na folha (Gamon et al., 1992; Smith et al., 1995; Gamon et al., 1997; Gamon et al., 1999), o que é esperado em plantas suscetíveis e infectadas, ou que estão tendo algum tipo de estresse fisiológico. Com o progresso da doença do CBC foi observado que os níveis de clorofila, por meio destes três índices, se tornaram mais baixo para todos os acessos de *P. vulgaris*, ao final do experimento (Figura 8).

Para os índices G e NDVI não houve diferença significativa, ao comparar 1 DAI com o 5 DAI para os acessos UENF 2263 e UENF 2276 (Figura 8). Os acessos UENF 2263, UENF 2252 e UENF 2276 apresentaram os maiores valores médios de G, não havendo diferença estatística do genótipo padrão de resistência BAC-6, enquanto o acesso UENF 2328 foi considerado o mais suscetível, por apresentar baixo valor médio de G e diferir do BAC-6 (Tabela 8). Para o índice NDVI, não houve diferença significativa entre os acessos avaliados, tanto no primeiro dia avaliado quanto ao último dia após a inoculação (Tabela 8). Steddom et al. (2003) encontraram valores de NDVI significativamente menores nas folhas de beterraba infectadas, quando comparadas às folhas saudáveis, indicando redução dos níveis de clorofila. Marin et al. (2019b) relataram correlação significativa entre o NDVI e a incidência de cercosporiose nas folhas de café, podendo ser explicada em razão do menor vigor vegetativo das plantas com a presença dessa doença. Mahlein et al. (2019) observaram um NDVI menor nas folhas de trigo infectadas com *F. graminearum* e *F. culmorum*, a partir de 12 dias após a inoculação. Para o índice PRI, o acesso UENF 2365 foi considerado

suscetível ao CBC, pois obteve o menor valor médio e diferiu significativamente do padrão de resistência BAC-6 (Tabela 8). Janeczko et al. (2018) observaram uma queda substancial no índice PRI nas folhas de pimenta infectadas com vírus.

O índice PSRI indica o estágio fisiológico das plantas, e tem sensibilidade à fixação de clorofila/carotenoide presente nas folhas senescentes e nos frutos em maturação (Merzlyak et al., 1999). Valores positivos de PSRI indicam que as folhas são senescentes, ou seja, a proporção clorofila/carotenoide na folha não está em equilíbrio, devido ao contato com algum agente patogênico, que pode resultar em folhas amareladas e necrosadas, e conseqüentemente perda prematura de área foliar verde, redução na taxa fotossintética e na produtividade da planta. Uma planta saudável possui valores negativos de PSRI, pois a concentração dos pigmentos fotossintéticos está equilibrada. De acordo com Ren et al. (2017) o valor de PSRI aumenta durante a senescência foliar devido ao aumento na proporção de carotenoide para clorofila. Nas primeiras 24h de avaliação (1 DAI) observou-se que todos os acessos continham valores negativos, no entanto, ao final do experimento quando a doença se alastrou, os valores tornaram-se todos positivos (5 DAI) (Figura 8). O genótipo padrão de resistência BAC-6 obteve o menor valor médio positivo de PSRI e diferiu significativamente do acesso UENF 2365, que alcançou o maior valor médio positivo, sendo considerado suscetível ao CBC (Tabela 8). Pedrali et al. (2019) observaram um aumento do índice PSRI em folhas de eucalipto infectadas com a bactéria *Erwinia psidii*, e concluíram que esse índice é o mais adequado para diferenciar os níveis de severidade da doença seca-de-ponteiros.

Correlações de Pearson entre os índices de vegetação foram bastante promissoras. Houve uma correlação positiva e altamente significativa entre os índices ARI 1, ARI 2 e PSRI. Valores altamente positivos desses parâmetros significam que a planta não está saudável, ou seja, a planta está com algum tipo de estresse. Estes índices quando correlacionados aos índices G, NDVI e PRI, apresentaram uma relação inversa, isto é, uma correlação negativa e fortemente significativa, indicando a influência da *Xap* em reduzir esses parâmetros. Visto que, para esses índices são esperados valores menores com o progresso da doença (Figura 9). Lin et al. (2018) constataram que os índices PRI, PSRI e ARI aumentaram significativamente a precisão precocemente da classificação de vários níveis do oídio em trigo.

Os resultados da AACPD apontam o acesso UENF 2252 como resistente ao CBC superando o genótipo padrão de resistência BAC-6. Os acessos UENF 2365, UENF 2263, UENF 2267 e UENF 2328 foram classificados como suscetíveis, uma vez que apresentaram os maiores valores da AACPD (Figura 10). O cálculo da AACPD tem sido relatado com sucesso em diversos estudos no melhoramento de plantas, visando à resistência a doença do CBC ao feijão-comum (Díaz et al., 2001; Fininsa, 2003; Shi et al., 2012; Trindade et al., 2015).

Menores valores de PI correspondem a maiores valores de AACPD. Os acessos UENF 2365, UENF 2267 e UENF 2263 foram de acordo a esses dois parâmetros, sendo classificados como suscetíveis ao CBC (Figuras 10, 11). Embora na AACPD, o acesso UENF 2252 tenha apresentado uma resistência superior ao genótipo BAC-6, no PI não houve diferença significativa entre eles. O nível de resistência está diretamente correlacionado ao período de incubação do patógeno, sendo que, quanto maior essa resistência do hospedeiro à colonização, maior será o valor de PI. Genótipos que possuem elevado valor de PI, a probabilidade é maior de reduzir a taxa de progresso da doença, evitando a epidemia ou diminuindo o potencial de infestação, quando as condições adequadas à ocorrência da doença persistir por períodos prolongados (Lobo et al., 2005; Márquez et al., 2007).

Neste trabalho foi apresentada uma nova abordagem para detecção pré-sintomática do CBC em feijão-comum. Os resultados da presente pesquisa podem abrir novos caminhos para a diagnose em plantas por meio de imagens termográfica e índices de vegetação.

3.2.6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

– Técnicas de imagens termográficas e dos índices de reflectância foliar podem ser utilizadas na detecção pré-sintomática do crestamento bacteriano comum;

– A termografia por infravermelho detectou a doença do CBC antes que os sintomas se tornassem visíveis;

– Seis índices de reflectância foliar: ARI 1, ARI 2, G, NDVI, PRI e PSRI melhor contribuíram para detecção de regiões infectadas com o CBC em feijoeiro-comum;

– O acesso UENF 2365 foi classificado como o mais suscetível para todos os parâmetros avaliados (imagem térmica, índices de reflectância, AACPD e PI);

– O acesso UENF 2252 foi classificado como o mais resistente para os parâmetros: imagem térmica, AACPD e PI, sendo o mais indicado para uso em programas de melhoramento de feijão-comum visando o desenvolvimento de cultivares resistentes.

3.3. IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA, E PAPEL DAS PROTEÍNAS DE DEFESA A PARTIR DESEMENTES DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-COMUM EM RESPOSTA À INFESTAÇÃO DE *Callosobruchus maculatus*

3.3.1. INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa de grande importância socioeconômica e nutricional, amplamente cultivada em todo o mundo (Messina, 2014). Esta espécie de plantas tem mecanismos de defesa bioquímicos e estruturais que funcionam como barreiras contra vários agentes patógenos, tendo desenvolvido esta capacidade durante a evolução da espécie. Mecanismos estruturais de defesa limitam infecções do patógeno e envolvem adaptações relacionadas ao aumento da espessura da cera, cutícula, estômatos, lenticelas, tricomas e pelos (Glas et al., 2012; Malinovsky et al., 2014). Peptídeos antimicrobianos (AMPs) servem como um mecanismo bioquímico de defesa e são um componente chave na imunidade inata da planta (Egorov e Odintsova, 2012; Campos et al., 2018).

Os AMPs são essenciais na defesa contra patógenos, e são vastamente encontrados em todas as espécies de plantas e animais (Silva et al., 2011b; Egorov e Odintsova, 2012; Campos et al., 2018). AMPs geralmente tem um baixo peso molecular (< 10kDa), de 10 e 100 resíduos de aminoácidos, com

propriedades físico-químicas importantes, tais como anfipaticidade, hidrofobicidade e cationicidade (Ponnappan et al., 2015; Budagavi et al., 2017).

Nas plantas, os AMPs protegem contra várias condições adversas, incluindo o ataque por patógenos, e um amplo espectro de atividade contra fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus envelopados e parasitas (Nguyen et al., 2011; Scorciapino et al., 2017). AMPs foram isolados a partir de diferentes espécies de plantas e de diferentes órgãos, incluindo flores, folhas, frutos, tubérculos, raízes e especialmente sementes (Pelegriani et al., 2008; Carvalho e Gomes, 2009; Nawrot et al., 2014). Muitas proteínas de defesa têm sido identificadas em sementes de leguminosas, especialmente no gênero *Phaseolus*, incluindo defensinas (Games et al., 2008; Mello et al., 2014), proteínas de transferência de lipídeos (LTPs), inibidores de proteinase e inibidores α -amilase, entre outros (Moreno et al., 1990; Ye et al., 2001; Carlini e Grossi-de-Sá, 2002).

O tegumento da semente é a primeira barreira protetora contra a penetração de insetos, incluindo insetos da família Chrysomelidae, tais como o *Callosobruchus maculatus* (F.) (Souza et al., 2011; De Sá et al., 2014; De Sá et al., 2018). Estudos anteriores relataram que a toxicidade do tegumento de sementes, como *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris*, *Canavalia ensiformis*, *Vigna unguiculata*, *Glycine max*, *Albizia lebbek* entre outras prejudicaram o desenvolvimento de *C. maculatus* (Moraes et al., 2000; Silva et al., 2004; Souza et al., 2011; Cruz et al., 2016; Silva et al., 2016; Silva et al., 2018; De Sá et al., 2018). De Sá et al. (2014) mostraram que o número de ovos de *C. maculatus* postos sobre o tegumento de sementes de *P. vulgaris* diminuiu cerca de 48%. Uma elevada taxa de mortalidade (80%) foi observada em larvas alimentadas com farinha de tegumento de sementes de *P. vulgaris* e as larvas sobreviventes apresentaram reduções de aproximadamente 50% da massa corporal (De Sá et al., 2014). Estes resultados indicam a presença de fitoquímicos tóxicos/repelentes em tegumentos de sementes *P. vulgaris*.

Nos últimos anos, AMPs, têm estimulado o interesse em desenvolver variedades de plantas geneticamente modificadas resistentes aos agentes patogênicos, de forma a minimizar o uso excessivo de produtos agroquímicos na agricultura (Holaskova et al., 2015). O objetivo deste estudo foi identificar os

AMPs em genótipos de feijão-comum, por análises bioquímicas e enzimáticas e, avaliar o seu papel biológico na defesa das sementes.

3.3.2. REVISÃO DE LITERATURA

3.3.2.1. Mecanismo de defesa das plantas

Durante o período evolutivo as plantas desenvolveram diversos mecanismos de defesa, tanto bioquímicos quanto morfológicos, para a sua defesa (Hammond-Kosack e Jones, 2000; Castro e Fontes, 2005). Apesar de serem organismos incapazes de se locomover e, portanto vulneráveis a ação de diversos fatores que causam estresse bióticos (pragas e doenças causadas por fungos, vírus, bactérias, protozoários, leveduras) e abióticos (temperatura, fotoperíodo, umidade e pH) (Mithöfer e Boland, 2012; Dang et al., 2015), as plantas, entretanto, apresentam um certo grau de resistência e/ou proteção frente aos fatores diversos. Essa resistência foi graças a um longo processo evolutivo, em que as tornaram capazes de perceber e responder a essas diferentes alterações, a fim de garantir a sua sobrevivência (Hammond-Kosack e Jones, 2000; Castro e Fontes, 2005). De acordo com Wit (2007), a resistência de plantas frente ao ataque de agentes patogênicos, pode ser entendida como a habilidade em que elas evoluíram em prevenir, impedir ou retardar a penetração de patógenos em seus tecidos.

O mecanismo de defesa das plantas está dividido em dois grupos: defesas constitutivas (pré-formadas) e as defesas induzidas (pós-contato). As defesas constitutivas estão presentes de forma inata no hospedeiro, e agem como barreiras químicas e/ou físicas, que protegem as plantas, em um primeiro momento, sem a necessidade de um ataque ou injúria causadas por pragas e doenças (Heath, 1997; Heath, 2000; Van Loon et al., 2006; Hématy et al., 2009). Enquanto que, as defesas induzidas são aquelas que estão envolvidas diretamente na resposta a infecção por fitopatógenos ou quando a planta sofre algum dano e, também devido a fatores ambientais (Heil, 2010; Cândido et al., 2011; Mithöfer e Boland, 2012).

As repostas produzidas pelas barreiras físicas (espinhos, tricomas, pelos, ceras, tegumento resistente nas sementes, entre outros) e químicas (substâncias químicas nos mecanismos pelos quais elas se protegem, de natureza protéica ou não protéica) integram tanto na defesa constitutiva bem como na defesa induzida (Garcia-Olmedo et al., 2001; Nishimura e Dangl, 2010; Mithöfer e Boland, 2012).

As barreiras químicas nas repostas da defesa constitutiva são evidenciadas pela produção de aminoácidos não proteicos, flavonoides, alcaloides, entre outros compostos de baixo peso molecular, podendo também ser principalmente decorrentes da presença de proteínas, tóxicas e AMPs, os quais são componentes chaves na defesa das plantas (Garcia-Olmedo et al., 2001; Nishimura e Dangl, 2010). Já as barreiras químicas nas defesas induzidas ocorrem uma resposta de hipersensibilidade (HR), seguida pela morte celular programada; fabricação de espécies reativas de oxigênio (ROS); alterações no pH; fortalecimento da parede celular próximo ao sítio de infecção; lignificação do tecido e aumento na concentração ou síntese de vários AMPs e proteínas PR, que estão relacionadas à patogênese (Cohn, 2001; Heil, 2010). De modo geral, as repostas das defesas induzidas são mais significativas para as partes vegetativas das plantas, tais como raiz, caule e folha, ao passo que, as defesas constitutivas são mais expressivas para as sementes (Xavier-Filho, 1993; Cândido et al., 2011).

Diversas proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana (AMPs) em vegetais foram identificadas em sementes de leguminosas, principalmente as sementes do gênero *Phaseolus*, que englobam a família das defensinas (Games et al., 2008; Mello et al., 2014), e a família das proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs), inibidores de proteinases, inibidores de α -amilase, entre outras (Moreno et al., 1990; Ye et al., 2001; Carlini e Grossi-de-Sá, 2002).

3.3.2.2. Peptídeos antimicrobianos de plantas (AMPs)

Nas últimas décadas, uma grande variedade de peptídeos que possuem atividade antimicrobiana e/ou inseticidas, têm sido isolados de plantas. Estudos têm demonstrado que estes peptídeos além de serem ativos contra uma ampla variedade de patógenos (bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, vírus envelopados e parasitas), são também ativos contra insetos e,

portanto, uma estratégia comum aplicada pelas plantas como uma resposta de defesa (Ribeiro et al., 2007; Leonard et al., 2011; Nguyen et al., 2011; Nawrot et al., 2014; Dang et al., 2015; Scorciapino et al., 2017).

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são encontrados de forma constitutiva em diferentes órgãos das plantas como flores, folhas, frutos, tubérculos, raízes, e especialmente em sementes, em praticamente todas as espécies de vegetais (Broekaert et al., 1997; Pelegrini et al., 2008; Benko-Iseppon et al., 2010; Nawrot et al., 2014). Os AMPs possuem características similares, tais como: baixa massa molecular que pode variar de 3 a 10 kDa, carga líquida positiva em pH fisiológico, propriedades anfipáticas, ricos em resíduos de cisteínas que se conectam em pontes dissulfeto (2, 3 ou 4), formando pontes dissulfeto, conferindo alta estabilidade a esses peptídeos (Broekaert et al., 1997; Astafieva et al., 2013). Os AMPs podem ser classificados em diferentes famílias com base na similaridade das suas estruturas primárias, como número de resíduos, pontes dissulfetos e atividade inibitória (Tabela 1) (Ribeiro et al., 2007; Benko-Iseppon et al., 2010; Gomes et al., 2011). Dentre os AMPs mais estudados destacam-se as defensinas de plantas e as LTPs.

Tabela 1. Famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas.

Nº	Família	Nº de Resíduos	Pontes Dissulfeto	Isolada inicialmente	Atividade inibitória
1	LTPs	90-95 (I) ou 70-75 (II)	3-4		Bactérias G ⁺ , fungos, α-amilase de inseto e mamíferos
2	Defensinas de plantas	45-54	4	<i>Hordeum vulgare</i>	Bactérias G ⁺ , fungos, α-amilase de inseto
3	Snakinas	61-70	6	<i>Solanum tuberosum</i>	Bactérias G ⁺ e G ⁻ e fungos
4	Tioninas	45-47	3-4	<i>Triticum aestivum</i>	Bactérias G ⁺ e G ⁻ e fungos
5	Heveínas-like	43	4	látex de seringueiras	Fungos
6	Knotinas-like	36-37	3	<i>Mirabilis jalapa</i>	Bactérias G ⁺ e G ⁻ e fungos
7	Seferdinas	28-38	0	<i>Capsella bursapastoris</i>	Bactérias e fungos
8	MBP-1	33	2	<i>Zea mays</i>	Bactérias G ⁺ e fungos
9	Ciclotídeos	29-31	3	Famílias das Rubiaceae e Violaceae	Bactérias G ⁺ e fungos
10	Ib- AMPs	20	2	<i>Impatiens balsamina</i>	Fungos

Adaptado por Ribeiro et al. (2007), Benko-Iseppon et al. (2010) e Gomes et al. (2011).

3.3.2.3. Caruncho – *Callosobruchus maculatus*

O caruncho *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleóptera: Bruchidae) é considerado um dos principais insetos-pragas de grãos armazenados, especialmente de feijões, por reduzir a qualidade e o valor nutricional e comercial das sementes (Sousa et al., 2005). É conhecido popularmente como gorgulho do feijão-de-corda ou feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], por ser a praga mais importante desse feijão armazenado, em regiões tropicais e subtropicais (Pereira et al., 2008).

Perdas em grãos armazenados, causadas pelo inseto *C. maculatus* podem chegar a até 100% em épocas de alta infestação, num período de seis meses (Hall et al., 1997). A infestação de sementes afeta severamente a qualidade do grão nutricional e potencial de germinação, resultando em perdas econômicas consideráveis (De Sá et al., 2014). Além disso, a perda pós-colheita de sementes devido à infestação por insetos-pragas de armazenamento é um problema importante que afeta sementes de leguminosas em todo o mundo.

O inseto *C. maculatus* pode causar diversos danos nas sementes, como perda de peso, pureza física e qualidade fisiológica. A larva penetra e se alimenta no interior dos grãos, reduzindo o peso, poder germinativo e a qualidade das sementes, bem como o valor nutricional dos grãos, associado ao grau de higiene do produto, devido à presença de excrementos, ovos e insetos tornando a semente inviável (Dongre et al., 1996; Almeida et al., 2005). No armazenamento, a infestação do caruncho pode resultar na destruição completa de um lote de sementes dentro de dois a quatro meses, se não forem tomadas medidas de controle ao bruquídeo. Sementes infestadas com insetos não são adequadas para o consumo humano, comercialização e cultivo (Williams, 1980).

C. maculatus se desenvolve em temperaturas ideais entre 20 a 30 °C, com 60% de umidade relativa, sendo o seu período médio de desenvolvimento de 23 dias (Mookherjee e Chawla, 1964). As fêmeas adultas põem em média 50 ovos na superfície de cada semente. Os ovos ficam aderidos ao tegumento e possuem coloração branca e forma subelíptica, com comprimento de cerca de 0,5 mm e largura de 0,3 mm (Southgate, 1979; Credland e Dendy, 1992).

As larvas de *C. maculatus* possuem coloração branca e forma curva, enquanto que a pupa é de coloração marrom e nos estádios finais apresentam

vestígios de asas, patas e olhos (Bastos, 1981). O desenvolvimento embrionário larval ocorre durante aproximadamente seis dias, quando as larvas atravessam o tegumento da semente e penetram no cotilédone, onde se alimentam de forma intensiva para completar o seu ciclo de desenvolvimento (Southgate, 1979; Credland, 1987).

Os insetos adultos de *C. maculatus* emergem entre 25 a 30 dias após a oviposição e, se envolvem rapidamente na reprodução e na postura de ovos, cerca de um ou dois dias, sendo a longevidade média do adulto em torno de nove a onze dias (Mookherjee e Chawla, 1964). Os adultos completamente desenvolvidos medem cerca de 2,5 a 3,0 mm de comprimento; possui cabeça de coloração preta com antenas contendo 11 segmentos ligeiramente serrilhados, tórax de cor preto com pubescência dourada, élitros de cor marrom com manchas pretas. O fêmur é aproximadamente do tamanho da tíbia, porém duas vezes mais grosso, e o fêmur da pata posterior traz um dente agudo e reto (Credland, 1987; Southgate, 1979; Williams, 1980; Bastos, 1981).

O controle desse bruquídeo é geralmente realizado por meio de aplicações de inseticidas. No entanto, as perdas tanto na pré e/ou pós-colheita ainda é de cerca de 15% da produção total, mesmo com o uso de produtos químicos (Araújo et al., 2005). Além disso, o uso indiscriminado desses produtos e, a preocupação dos consumidores quanto à qualidade dos alimentos e aos danos ao meio ambiente têm incentivado estudos relacionados a novas técnicas de controle de pragas.

Uma alternativa ao método de controle químico convencional é o desenvolvimento de cultivares resistentes, por meio da manipulação genética de genes identificados como envolvidos nas respostas de defesa de plantas (Appleby e Credland, 2004), o que vem estimulando os estudos dos mecanismos naturais de resistência como a toxicidade no tegumento de sementes que causou danos ao desenvolvimento de *C. maculatus* (Moraes et al., 2000; Silva et al., 2004; Souza et al., 2011; De Sá et al., 2014; Cruz et al., 2016; De Sá et al., 2018).

3.3.3. MATERIALE MÉTODOS

3.3.3.1. Sementes

Dezenove acessos de feijoeiro-comum, coletados *on farm* em duas regiões (Norte e Lagos) do estado do Rio de Janeiro foram utilizados neste estudo (Tabela 2). Estes acessos foram previamente investigados quanto à sua divergência genética por Cavalcanti (2018). Estas sementes pertencem ao Banco de Germoplasma (BAG) da UENF, que é composto por exemplares coletados de diversos municípios e comunidades do estado do Rio de Janeiro.

Tabela 2. Identificação, descrição e origem dos acessos de *P. vulgaris*, coletados no estado do Rio de Janeiro. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

Nº	Identificação	Descrição do Acesso	Origem
1	UENF 2239	Feijão 8 e 9	Araruama
2	UENF 2240	Feijão Vermelho	Araruama
3	UENF 2251	Carioca	Macaé
4	UENF 2252	Feijão Preto	Macaé
5	UENF 2253	Feijão Vermelho	Macaé
6	UENF 2256	Preto Combrasil	Casimiro de Abreu
7	UENF 2260	Feijão Balinha	Casimiro de Abreu
8	UENF 2263	Feijão Vermelho	Casimiro de Abreu
9	UENF 2264	Feijão Preto	Casimiro de Abreu
10	UENF 2265	Feijão Xodó	Casimiro de Abreu
11	UENF 2266	Feijão Pitanga	Casimiro de Abreu
12	UENF 2267	Feijão Mulatinho Pardo	Silva Jardim
13	UENF 2268	Feijão Preto Esplendor	Silva Jardim
14	UENF 2271	Carioca Preto	Silva Jardim
15	UENF 2274	Vermelho grande	Campos
16	UENF 2275	Cinza esverdeado	Campos
17	UENF 2276	Feijão Castanho escuro	Campos
18	UENF 2277	Feijão cor sim - cor não	Itaocara
19	UENF 2278	Feijão Vermelho	Casimiro de Abreu

*Informações extraídas de Cavalcanti (2018).

Sementes de *Vigna unguiculata* (L.) (cv. Fradinho) (suscetíveis ao gorgulho) foram obtidas comercialmente de mercados locais (Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil) e armazenadas a -20 °C.

3.3.3.2. Microrganismos

Fungos fitopatogênicos *Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium solani* foram cultivados em meio de cultura ágar Sabouraud e preservados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM), do Centro de Biociências e Biotecnologia da UENF.

3.3.3.3. Insetos

Os insetos da espécie *Callosobruchus maculatus* (gorgulho do feijão-de-corda) (Coleóptera: Bruchidae) foram obtidos de uma colônia mantida no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) da UENF. A colônia foi mantida em câmara de crescimento nas sementes de *V. unguiculata* (cv. Fradinho), à temperatura de 28 °C, 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 12/12h ciclo de luz-escuro.

3.3.3.4. Localização dos ensaios laboratoriais

Os ensaios foram conduzidos na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), no período de abril de 2017 a julho de 2018. No Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) foram realizados os ensaios com os AMPs, α -amilases, tripsina e dos fungos *C. lindemuthianum* e *F. solani*. Enquanto que, os ensaios com as sementes naturais e artificiais com o inseto *C. maculatus* foram conduzidos no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP).

3.3.3.5. Extração de Proteínas

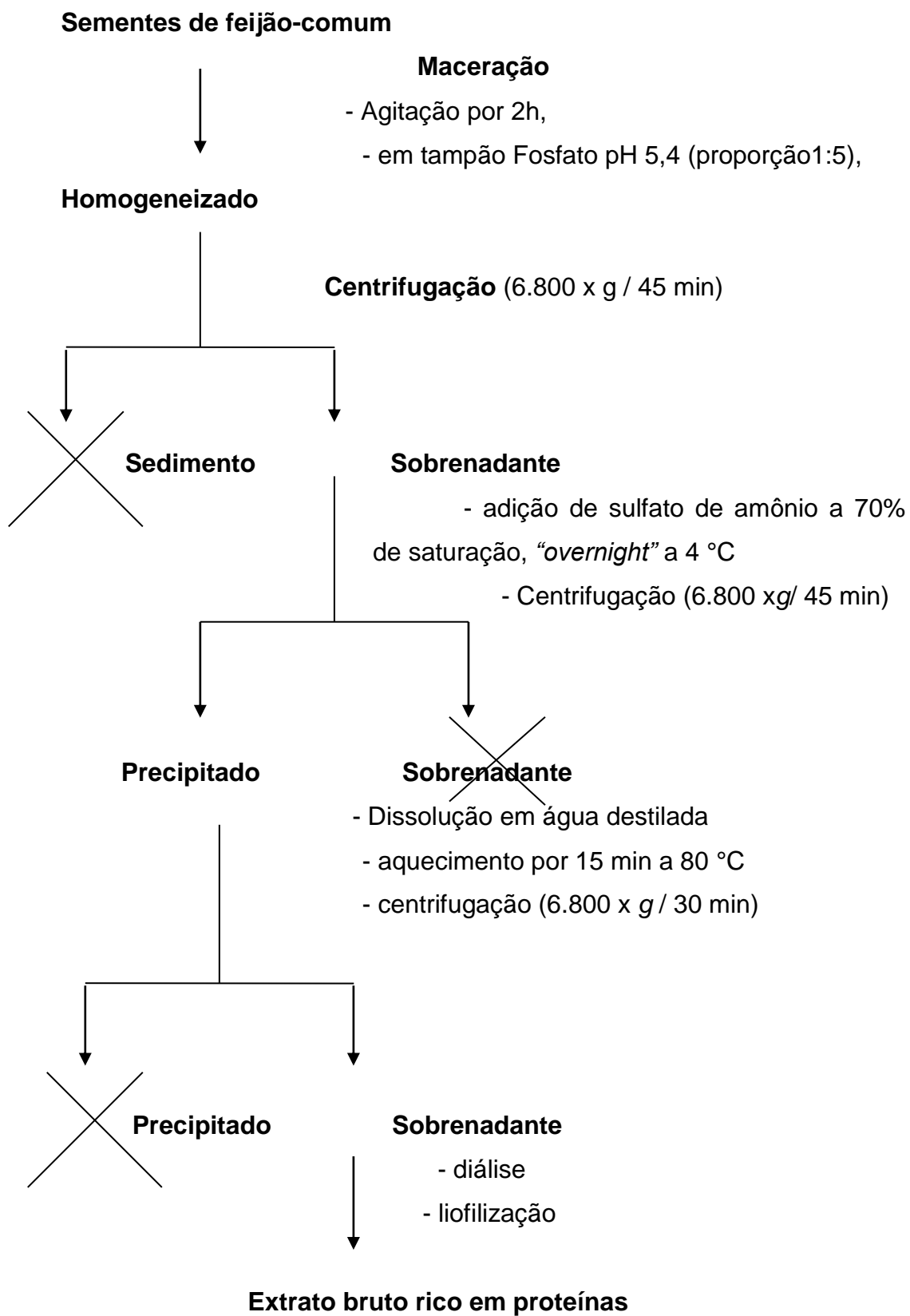
3.3.3.5.1. Preparo da farinha

As sementes dos 19 acessos de feijão-comum foram primeiramente removidas o tegumento. Após este procedimento foi realizada a maceração do cotilédone, de cada acesso individualmente, com o auxílio de gral, pistilo e

nitrogênio líquido, até a formação de uma farinha de granulação bem fina. Posteriormente, submetidas à extração protéica.

3.3.3.5.2. Extração de proteínas

As proteínas das sementes (sem tegumento) de 19 acessos de feijão-comum foram extraídas de acordo com a metodologia descrita por Terras et al. (1993) (Esquema 1), com modificações. Inicialmente, 40 g de farinha da semente foram extraídas em tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,01 M, NaH_2PO_4 0,015 M, KCl 0,1 M, EDTA 1,5%, pH 5,4) na proporção de 1:5 (farinha: tampão), por 2h sob agitação constante a 4 °C. O homogeneizado obtido foi centrifugado (6.800 x g por 45 min a 4 °C), o sedimento foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio a 70% de saturação, durante 16h a 4 °C. Após este processo de pré-purificação, o sobrenadante resultante do fracionamento a 70% de saturação foi submetido à nova centrifugação (6.800 x g por 45 min a 4 °C). O precipitado resultante foi ressuspenso em 6 mL de água destilada e aquecido a 80 °C por 15 min. Após o aquecimento, as amostras foram centrifugadas (6.800 x g por 30 min a 4 °C). O precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido foi dialisado contra água destilada (membranas com poros de 1.000 Da) a 4 °C, durante três dias (com três trocas diárias), liofilizadas, e utilizadas em etapas posteriores de caracterização bioquímica e atividades enzimáticas e inibitórias. Este processo foi realizado separadamente para cada acesso.



Esquema 1. Obtenção do extrato bruto a partir de sementes de *Phaseolus vulgaris*.

3.3.3.6. Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método do ácido bicinconínico (BCA), descrito por Smith et al. (1985), com modificações, utilizando a ovalbumina como padrão de proteína.

3.3.3.7. Eletroforese em gel de tricina

A eletroforese em gel de tricina foi executada com base no método de Schägger e Von Jagow (1987). O gel de separação utilizado foi acrilamida/bis-acrilamida (16,4%) e o gel de concentração usado foi acrilamida/bis-acrilamida (3,9%). O gel foi corado em 30 min em Coomassie Blue R (0,05%) e preparada em metanol 40% e ácido acético 70%. Subseqüentemente, a solução corante foi removida, e o gel foi transferido para solução descorante de metanol 40% e ácido acético 7%, até a visualização das bandas.

3.3.3.8. Western Blotting

Western blotting foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Towbin et al. (1979). Após a eletrotransferência das proteínas, as membranas foram incubadas em tampão bloqueador contendo o anticorpo primário [anti-LTP (1: 1000), e anti-defensina (1: 200)] e 2% de leite em pó desnatado, durante 16h a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas dez vezes, durante 5 min em solução de tampão fosfato-salino (PBS) (NaH_2PO_4 10 μM + NaCl 0,15M, pH 7,4) a temperatura ambiente. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (1: 500), conjugado com peroxidase, diluído em tampão PBS contendo 2% de leite em pó, por 1h sob agitação, em temperatura ambiente, e lavada como descrito acima. Ao término destas lavagens, foi feita a revelação com diaminobenzidina (DAB) imergindo as membranas na solução reveladora (Tris-HCl 40 μM , pH 7,5, DAB 1 mg/mL, imidazol 100 μM e peróxido de hidrogênio 0,03%) até a visualização das bandas coradas.

3.3.3.9. Ensaio de inibição das α -amilases

Larvas do inseto *C. maculatus*, com aproximadamente 16 dias de idade, foram dissecadas, e seus intestinos, juntamente com o conteúdo luminal extraídos. Os tecidos foram macerados em solução salina (0,9%) e centrifugados (12.000 x *g* por 10 min). O sobrenadante foi quantificado pelo método de Bradford (1976), e utilizado em ensaios de atividade α -amilásica. Amostras de α -amilase de saliva humana (500 μ L) foram coletadas e centrifugadas (12.000 x *g* por 10 min) a 4 °C. O sedimento contendo restos celulares e muco foi descartado, e o sobrenadante coletado, quantificado pelo método de Bradford (1976), e então armazenado a -20 °C até o uso.

O ensaio da atividade α -amilásica foi realizado para identificar inibidores da α -amilase salivar humana e da α -amilase de larvas de insetos *C. maculatus*, segundo a metodologia de Bernfeld (1955). Os extratos brutos de diferentes sementes de feijão-comum (50 μ g.mL⁻¹) ricos em peptídeos foram suspensos em água ultrapura e incubados com 10 U de cada α -amilase (α -amilase salivar humana e α -amilase larval do inseto *C. maculatus*), e cada mistura de enzima foi incubada em banho-maria a 37 °C, durante 15 min. Após este período, 25 μ L de solução de amido 1% foram adicionados e novamente as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C, durante 15 min (α -amilase salivar humana), e por 30 min (α -amilase de *C. maculatus*). Em seguida, as amostras foram removidas do banho-maria com 400 μ L de 3,5 ácido dinitrossalicílico (DNS). Cada amostra foi então fervida, durante 5 min, e após o resfriamento, 400 μ L de água foram adicionados a cada amostra. A hidrólise do substrato pela enzima foi determinada após leitura da absorbância a 540 nm usando um espectrofotômetro (LGS53, BEL Photonics). Uma unidade de α -amilase foi definida como uma variação de 0,1 de absorbância a 540 nm por 30 min de reação, como descrito por Franco et al. (2000).

3.3.3.10. Ensaio para a atividade da tripsina residual

A inibição da enzima foi determinada por ensaio da atividade da tripsina residual usando o substrato BA_pNA (estoque 5 μ M), após pré-incubação com os peptídeos. A atividade proteolítica foi determinada pela incubação de 10 μ L de

cada extrato de sementes de feijão-comum ($50 \mu\text{g. mL}^{-1}$) com $50 \mu\text{L}$ de tripsina e $25 \mu\text{L}$ de BApNA em tampão Tris-HCl $50 \mu\text{M}$ (pH 8,0), a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, num volume final de $200 \mu\text{L}$. O controle foi realizado sem a adição do extrato. A reação foi interrompida pela adição de $100 \mu\text{l}$ de ácido acético 30% (v/v). A hidrólise do substrato foi quantificada medindo-se a absorbância da *p*-nitroanilina liberada a 405 nm (Macedo et al., 2007).

3.3.3.11. Efeito da proteína sobre o crescimento fúngico

Inicialmente, os esporos de *C. lindemuthianum* e *F. solani* foram cultivados em placa de Petri contendo meio ágar Sabouraud por 11 dias a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Após esse período, os fungos foram utilizados em ensaios isolados no qual, foi adicionado 10 mL de meio ágar Sabouraud, onde os conídios foram liberados com auxílio de uma alça de Drigalski. A suspensão de esporos foi filtrada para eliminar detritos miceliais. Posteriormente, foi realizada a quantificação dos conídios em uma câmara de Neubauer por meio de um microscópio óptico (Axioplan, Zeiss).

O ensaio quantitativo para inibição do crescimento fúngico foi realizado seguindo o protocolo desenvolvido por Broekaert et al. (1990), com modificações. Esporos fúngicos (1×10^4 conídios. mL^{-1}) foram incubados em meio Sabouraud contendo os diferentes extratos brutos de sementes de feijão-comum ($50 \mu\text{g. mL}^{-1}$), em um volume final de $100 \mu\text{L}$. O ensaio foi realizado em placas de cultura de 96 poços, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ em incubadora BOD. Leituras ópticas em 620 nm foram tomadas no tempo zero e a cada 6h, num período total de 48h.

3.3.3.12. Sementes naturais de feijão-comum infestadas com *C. maculatus*

Sementes naturais de feijão-comum foram transferidas para tubos de ensaio de vidro (tamanho $12,0 \times 1,5 \text{ cm}$). Cada tubo de ensaio continha uma semente de cada acesso de feijão-comum, e foram infestados com cinco fêmeas férteis de *C. maculatus* (2 dias de idade) durante 24h, numa incubadora BOD, a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Os tubos foram vedados com um filme plástico e perfurados com uma agulha para oxigenação. Após 24h, as fêmeas foram removidas dos tubos e o número de ovos postos foram contados. Aos 15 dias após a oviposição (DAO), as

sementes foram fotografadas para observar a formação das larvas e os ovos foram removidos para observar a penetração das larvas.

3.3.3.13. Sementes artificiais cobertas com tegumento de sementes de feijão-comum infestadas com *C. maculatus*

Sementes de *P. vulgaris* de cada acesso foram descascadas, e o tegumento foi separado e macerado com nitrogênio líquido, para se obter uma farinha fina. Sementes artificiais cobertas com tegumento de sementes de *P. vulgaris* foram preparadas de acordo com a metodologia proposta por De Sá et al. (2014), com modificações.

Farinha de cotilédone de *V. unguiculata* (cv. Fradinho) foi moldada como cotilédone artificial e farinha de tegumento de sementes de *P. vulgaris* de cada acesso foi utilizada para moldar tegumento de sementes artificiais. Para a confecção da semente artificial, 20 mg de farinha de tegumento de sementes de *P. vulgaris* foram transferidas no fundo de um molde cilíndrico e coberto com 400 mg da farinha de cotilédone de *V. unguiculata*. O molde cilíndrico foi prensado com auxílio de uma prensa manual e, posteriormente a semente artificial foi retirada do molde. Após o preparo das sementes, o tegumento de sementes de *P. vulgaris* foi sobreposto sobre as mesmas. Sementes controle foram preparadas somente com farinha de cotilédone de *V. unguiculata* (cv. Fradinho).

As sementes artificiais e o controle foram transferidos para tubos de ensaio de vidro (tamanho 12 x 1,5 cm). Cada tubo de ensaio continha uma semente, e foram infestados com três fêmeas férteis de *C. maculatus* (2 dias de idade) durante 24h, numa incubadora BOD, a 28 °C. Os tubos foram vedados com um filme plástico e perfurados com uma agulha para oxigenação. Após este período, as sementes foram desinfetadas, e o excesso de ovos postos removidos, deixando-se apenas três ovos por tegumento de semente artificial. As sementes foram incubadas numa incubadora BOD, a 28 °C. Aos 15 DAO as sementes foram abertas para observar a presença de larvas sobreviventes.

3.3.3.14. Análise estatística

Todos os dados foram obtidos a partir de ensaios em triplicata, com três repetições de cada acesso de *P. vulgaris*. Os dados sobre inibidores da α -amilase salivar humana e α -amilase larval do inseto *C. maculatus*, inibição do crescimento dos fungos, atividade da tripsina, e de oviposição de insetos de *C. maculatus* foram submetidos a teste *t*. Diferenças médias ($p \leq 0,05$) foram consideradas significativas. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism (versão 5.0 para Windows).

3.3.4. RESULTADOS

3.3.4.1. Perfis Eletroforéticos das Proteínas

Os perfis eletroforéticos das proteínas dos extratos brutos de sementes dos 19 acessos de feijão-comum, obtidos após extração proteica estão apresentados na Figura 1. Em 13 raias correspondente a 13 acessos (UENF 2239, UENF 2240, UENF 2251, UENF 2253, UENF 2263, UENF 2264, UENF 2265, UENF 2266, UENF 2267, UENF 2268, UENF 2286, UENF 2287 e UENF 2288) foi possível observar a presença majoritária de uma banda proteica de 26,6 kDa. Em 15 raias correspondentes a 15 acessos (UENF 2239, UENF 2240, UENF 2251, UENF 2253, UENF 2256, UENF 2260, UENF 2263, UENF 2264, UENF 2265, UENF 2266, UENF 2267, UENF 2271, UENF 2275, UENF 2286 e UENF 2287) continham bandas proteica de 6,5 e 17.0 kDa. A raia UENF 2275 exibiu uma banda proteína menor que 6,5 kDa. As raias correspondentes aos acessos UENF 2252 e UENF 2274 não continham bandas de proteína detectáveis.

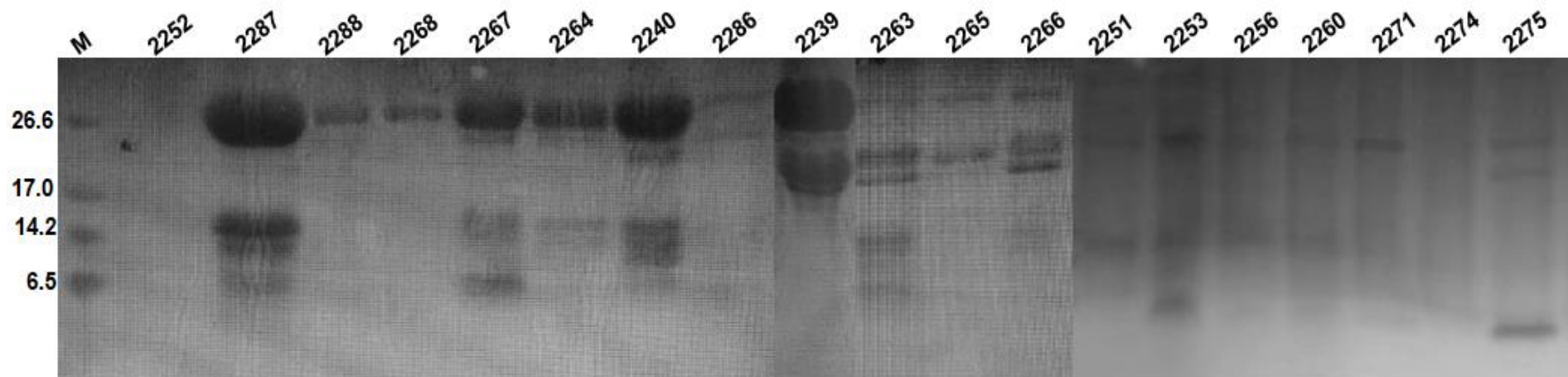


Figura 1. Visualização eletroferética de proteínas dos extratos proteicos em sementes de *P. vulgaris*, em gel de tricina corado com Coomassie Blue. (M) marcador de baixa massa molecular (kDa). Os números representam diferentes acessos de *P. vulgaris* do Banco de Germoplasma. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

3.3.4.2. Western Blotting

Os resultados de *Western blotting* indicaram que os extratos proteicos de nove acessos de sementes de feijão-comum UENF (2240, 2253, 2264, 2265, 2266, 2274, 2275, 2287 e 2288), eram positivos para peptídeos da família LTP (Figura 2), e os extratos proteicos de todos os acessos foram positivos a peptídeos da família da defensiva (Figura 3).

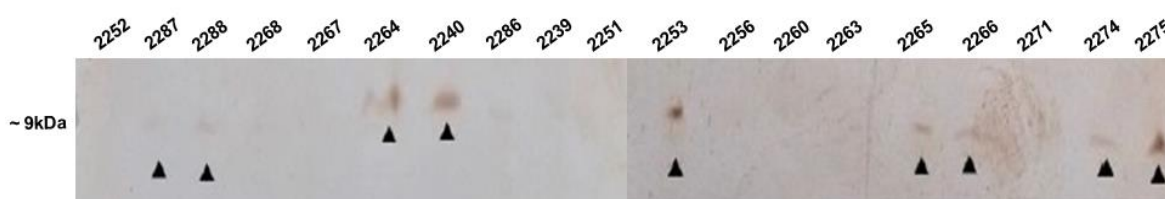


Figura 2. *Western Blotting* contendo o anticorpo primário anti-LTP dos extratos proteicos de sementes de *P. vulgaris*. Uma concentração de 1: 1000 foi utilizada em todos os extratos testados. Os números representam diferentes acessos de *P. vulgaris* do Banco de Germoplasma. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

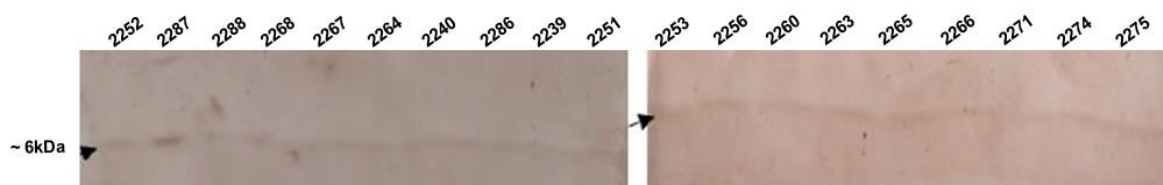


Figura 3. *Western Blotting* contendo o anticorpo primário anti-defensiva dos extratos proteicos de sementes de *P. vulgaris*. Uma concentração de 1: 200 em todos os extratos testados. Os números representam diferentes acessos de *P. vulgaris* do Banco de Germoplasma. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

3.3.4.3. Atividade inibitória das enzimas α -amilases

Todos os extratos proteicos de sementes de feijão-comum inibiram significativamente a atividade inibitória das enzimas α -amilases salivar humana e larval do inseto *C. maculatus* (Figura 4A, B). A porcentagem de inibição da enzima α -amilase salivar humana na maioria dos acessos (16 extratos proteicos) variou de 81,8 a 98,6%. O extrato proteico UENF 2256 obteve a maior inibição

cerca de 100%. A menor porcentagem de inibição foi observada nos extratos proteicos UENF 2240 (41,1%) e UENF 2271 (62,24%) (Figura 4A). Para a atividade inibitória da α -amilase larval do inseto *C. maculatus* a maioria dos acessos (17 extratos proteicos) variou entre 81,7% a 93,4%. A atividade inibitória mais elevada foi observada no extrato proteico UENF 2251 cerca de 100%, enquanto que, a mais baixa no extrato proteico UENF 2271 (66,3%) (Figura 4B).

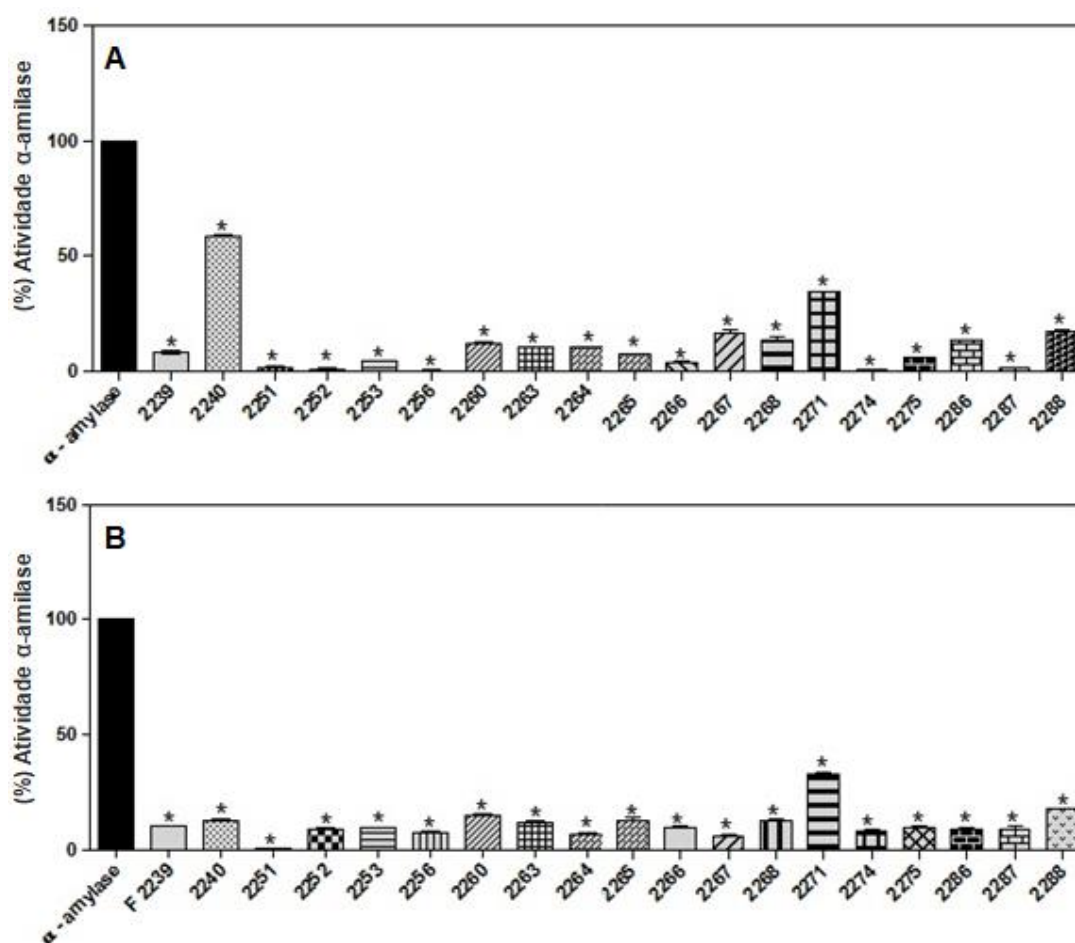


Figura 4. Efeito dos extratos proteicos das sementes de *P. vulgaris* ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sobre a atividade enzimática da: (A) α -amilase salivar humana; (B) α -amilase larval do inseto *C. maculatus*. Os valores representam médias (\pm SD) de triplicatas. *Indicam diferenças ($p \leq 0,05$) entre o tratamento experimental e controle. Os números representam diferentes acessos de *P. vulgaris* do Banco de Germoplasma. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

3.3.4.4. Atividade inibitória da tripsina

Os resultados indicaram que 79% dos extratos proteicos de sementes de feijão-comum inibiram significativamente a atividade da tripsina, e a porcentagem de inibição variou entre 37,2 a 97,9%. Os extratos de proteínas a partir dos acessos UENF 2239, UENF 2268, UENF 2271 e UENF 2288 não inibiram a atividade da tripsina (Figura 5).

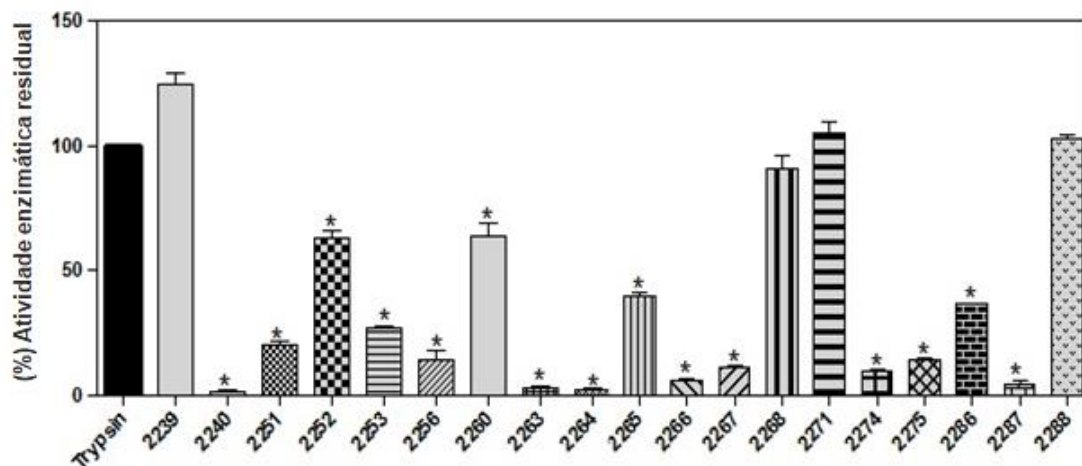


Figura 5. Efeito dos extratos proteicos das sementes de *P. vulgaris* ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), sobre a atividade enzimática residual da tripsina. Os valores representam médias ($\pm\text{SD}$) de triplicatas. *Indicam diferenças ($p \leq 0,05$) entre o tratamento experimental e controle. Os números representam diferentes acessos de *P. vulgaris* do Banco de Germoplasma. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

3.3.4.5. Efeito da proteína sobre o crescimento fúngico

O efeito dos extratos protéicos das sementes de feijoeiro-comum sobre a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos (*C. lindemuthianum* e *F. solani*) foi determinado. Nenhum dos acessos avaliados inibiu o crescimento dos fungos (Figuras 6A, B).

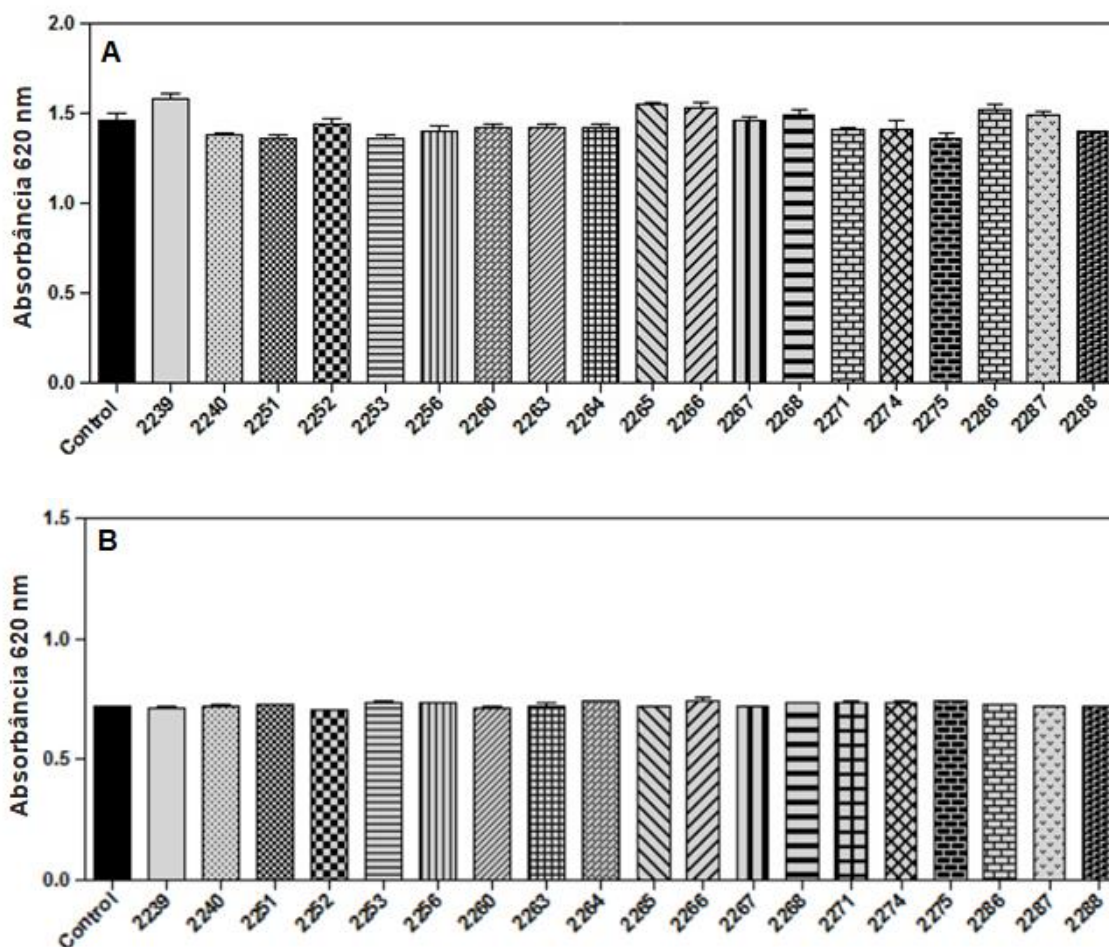


Figura 6. Ensaio de inibição de crescimento dos fungos: (A) *C. lindemuthianum* e (B) *F. solani*, na presença de extratos proteicos das sementes de *P. vulgaris* ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O crescimento foi observado por 48h. Os valores representam médias (\pm SD) de triplicatas. *Indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o tratamento experimental e controle. Os números representam diferentes acessos de *P. vulgaris* do Banco de Germoplasma. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

3.3.4.6. Desempenho e sobrevivência de *C. maculatus* em sementes naturais de feijão-comum

A oviposição de *C. maculatus* sobre as sementes naturais de *P. vulgaris* foi observada em todos os acessos (Figura 7A). O número de ovos postos variou amplamente entre os acessos, menos de 20 ovos nas sementes naturais do acesso UENF 2266 até 190 ovos no acesso UENF 2260 (Figura 7B). Embora a oviposição tenha sido evidente em todas as sementes, a eclosão larval foi reduzida para zero%, as larvas foram mortas dentro dos ovos ou na superfície dos cotilédones aos 15 DAO (Figura 7A, B). Aos 15 DAO, os ovos foram fotografados e os tegumentos dos ovos foram removidos para observar a

penetração das larvas. Os ovos apresentaram uma aparência branca (Figura 7a-s), indicando o início da escavação pela larva e o depósito da farinha dentro do ovo. Em todos os acessos, a eclosão das larvas na penetração do cotilédone foram parciais, embora seja possível observar um início de perfuração de cotilédones na maioria dos acessos (Figura 7a'-s').

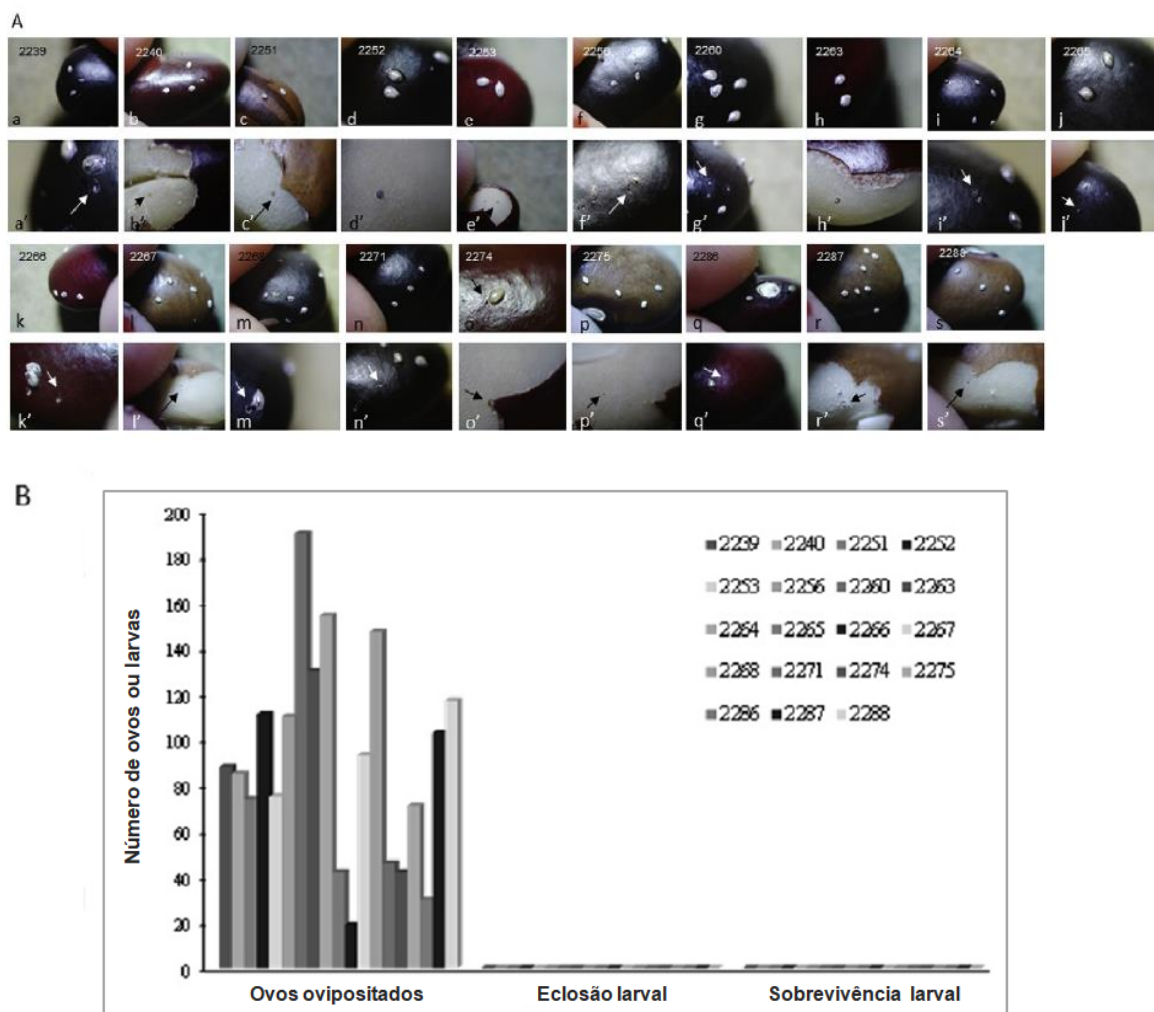


Figura 7. Desempenho e oviposição de lavras de *C. maculatus* sobre sementes naturais de *P. vulgaris* aos 15 DAO. (A) Fotos dos ovos sobre a superfície de tegumento dos cotilédones sobre sementes naturais. a-s: ovos no tegumento de sementes de *P. vulgaris*. a', f', g', i', j', k', m', n', q': Perfuração que intercepta o tegumento da semente (setas) b-e', h', l', o', p', r', s': Superfície do cotilédone mostrando o início da perfuração pelas larvas (setas). (B): Número de ovos postos, eclosão larval e, sobrevivência aos 15 DAO. Os números acima da figura representam diferentes acessos de *P. vulgaris* do Banco de Germoplasma. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

3.3.4.7. Desempenho e sobrevivência de *C. maculatus* em sementes artificiais cobertas com tegumento de feijão-comum

As sementes artificiais contendo tegumento de *P. vulgaris* compostas por 100% de farinha de cotilédone de *V. unguiculata* inibiram 100% a oviposição da fêmea de *C. maculatus* (Figura 8).

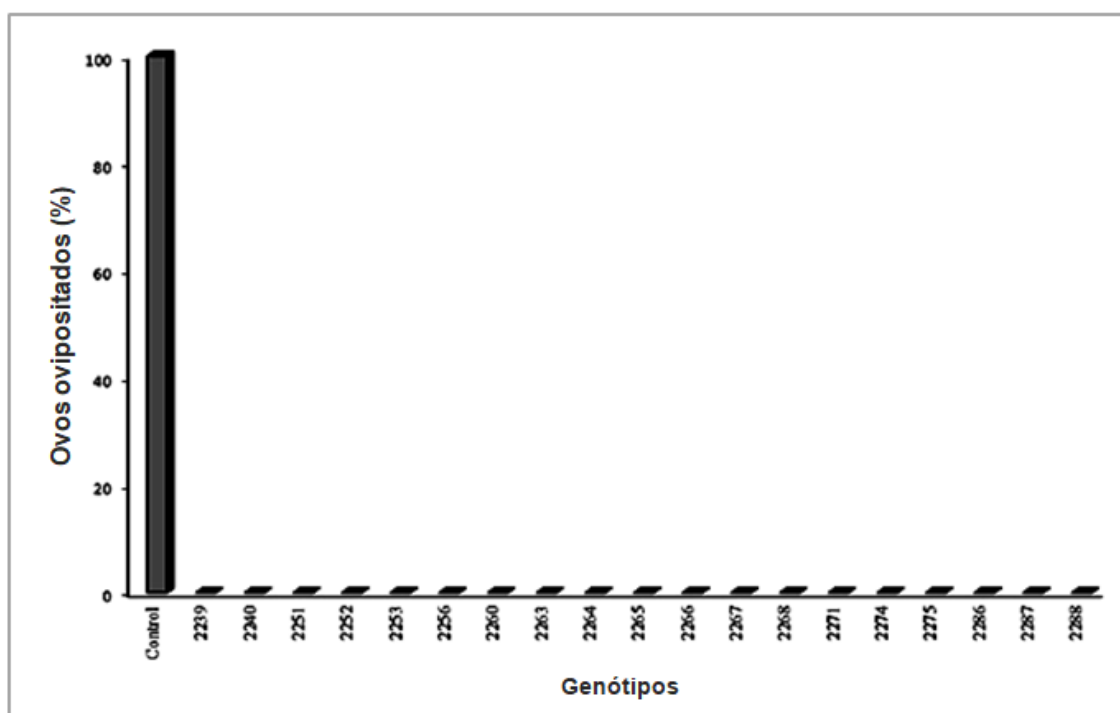


Figura 8. Interferência do tegumento de sementes artificiais *P. vulgaris* sobre o desenvolvimento da oviposição de *C. maculatus*. O número de ovos postos em sementes artificiais compostas exclusivamente de farinha de cotilédone de *V. unguiculata* (sementes controle) foi considerada como 100%. Os números representam diferentes genótipos de *P. vulgaris* do Banco de Germoplasma. UENF, Campos dos Goytacazes-RJ, 2020.

3.3.5. DISCUSSÃO

Inicialmente investigamos a presença de proteínas de defesa, tais como LTPs e defensinas a partir de extratos proteicos de sementes de feijão-comum. LTPs foram detectados em nove extratos de feijão-comum (Figura 2), enquanto

que as defensinas foram detectadas em todos os extratos proteicos (Figura 3). Estudos anteriores de caracterização de defensinas em plantas em sementes de *P. vulgaris* e de *V. unguiculata* (Wong et al., 2006; Games et al., 2008; Mello et al., 2011), mostrou que estes peptídeos foram capazes de inibir a α -amilase em *C. maculatus* e também em outros insetos como *Acanthoscelides obtectus* (Coleóptera, Chrysomelidae) e *Zabrotes subfasciatus* (Coleóptera, Chrysomelidae) (Pelegri et al., 2008; Santos et al., 2010).

Diversas proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana que podem inibir a α -amilase têm sido descritos (Pereira et al., 2018). Estas enzimas são essenciais para os insetos, e seus inibidores são componentes chaves no sistema de defesa de plantas frente ao ataque de pragas (Payan, 2004; Silva et al., 2014). A capacidade de AMPs, especialmente defensinas e LTPs, para inibir α -amilase tem sido relatado (Carvalho e Gomes, 2011; Diz et al., 2011; Zottich et al., 2011). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que todos os extratos proteicos de sementes feijão-comum inibiram significativamente a atividade da enzima α -amilase salivar humana e α -amilase larval de *C. maculatus* (Figura 4A, B), o que sugere que estas duas classes de AMPs podem estar presentes nestes acessos. Há uma similaridade estrutural e funcional entre as α -amilases salivar humana e larval de inseto que hidrolisam as ligações α -1,4-glicosídica de amido (Silano et al., 1975; Feng et al., 1996; Santos et al., 2017). Portanto, a α -amilase salivar humana pode ser usada como modelo para estudos de prospecção e caracterização de inibidores de proteinases com potencial para o desenvolvimento de fármacos e inseticidas. Dada a importância do controle de insetos-pragas através da inibição da enzima α -amilase e privando insetos da energia proveniente da degradação do amido, defensinas de plantas pode ajudar a desempenhar um papel na defesa dos vegetais contra insetos-pragas (Bloch et al., 1991; Osborn et al., 1995). Carvalho e Gomes (2011) têm mostrado que os insetos possuem um mecanismo de interrupção do crescimento devido ao contato com defensinas vegetais, e este fenômeno está diretamente relacionado com a inibição de insetos por enzimas digestivas, tais como proteases e α -amilases.

Os inibidores de tripsina são proteínas de defesa de plantas frequentemente encontradas em leguminosas que inibem a atividade proteolítica de enzimas digestivas. Tripsinas são moduladoras por estresse de seca, salinidade e fermento, e de lesões, e protegem as plantas contra agentes

patogênicos (Alves et al., 2010; Chan et al., 2013). Neste estudo, os extratos proteicos a partir de 15 acessos de feijão-comum inibiram a atividade da tripsina (Figura 5).

Foi também realizado um ensaio de inibição de crescimento *C. lindemuthianum* e *F. solani* com diferentes extratos proteicos de sementes de feijão-comum. Os extratos não inibiram significativamente o crescimento dos fungos (Figura 6). Este resultado pode ser devido à utilização de extratos totais das sementes. Estas sementes contêm diversas proteínas diferentes, incluindo proteínas de reserva, tais como globulinas e leguminas, que não têm ou apresentam baixa atividade antimicrobiana (Derbyshire et al., 1976; Casey et al., 1986; Müntz, 1996; Gomes et al., 1997). Portanto, a concentração de peptídeos com potencial de atividade antimicrobiana e diretamente envolvida com a defesa dos microrganismos pode ser baixa, o que limita a detecção desta atividade em ensaios *in vitro* (Egorov e Odintsova, 2012).

Sementes de *P. vulgaris* são constantemente atacadas, durante o armazenamento, por insetos bruquidae, principalmente o *Z. subfasciatus* e *A. obtectus*. No entanto, essas sementes são relativamente resistentes à infestação de insetos de *C. maculatus*, e esta resistência está relacionada com a presença de proteínas de defesa, tais como inibidores de α -amilase e protease (Huesing et al., 1991). Devido à presença destas importantes atividades de defesa nos cotilédones de acessos *Phaseolus* estudados neste trabalho, foi interessante tentar relacionar a presença dessas proteínas clássicas de defesa nos cotilédones com a resistência dessas sementes a infestação de *C. maculatus*.

Embora fêmeas de *C. maculatus* tenham sido capazes de ovipositar em sementes naturais de acessos de *P. vulgaris*, não foi observada nenhuma incubação de larvas e sobrevivência (Figuras 7A, B). Estes resultados mostraram que todas as sementes de *P. vulgaris* eram resistentes à infestação de *C. maculatus* e que as larvas morreram durante a penetração no tegumento das sementes. Assim, para investigar a relação da resistência de sementes de *P. vulgaris* com propriedades do tegumento de sementes foram feitas sementes artificiais contendo tegumento de sementes artificiais compostas por 100% de farinha de tegumento de sementes de *P. vulgaris*. Após a infestação da fêmea de *C. maculatus* observou-se uma inibição total na oviposição (Figura 8). A presença de proteínas, tais como vicilinas, proteases, quitinases, peroxidases e inibidores

de proteases, tem sido mostrada na camada de sementes de *C. ensiformis*, *G. max*, *A. lebbbeck*, *P. vulgaris* e tem sido relacionada com a defesa de insetos (Oliveira et al., 1999; Silva et al., 2004; Souza et al., 2012; Silva et al., 2016; Silva et al., 2018).

Dois abordagens diferentes são comumente usadas para avaliar a resistência de insetos: antibiose, no qual a planta tem um efeito deletério sobre os insetos, incluindo a inibição de crescimento, desenvolvimento, fecundidade e sobrevivência; e antixenose (ou não-preferência), em que o inseto é repelido ou não atraído para a sua planta hospedeira (Painter, 1951; Kogan e Ortman, 1978; Peterson et al., 2017). Antixenose está relacionado com a presença de alguma característica vegetal que afeta diretamente o comportamento dos insetos, tornando os tecidos vegetais menos favoráveis para alimentação e oviposição, ou selecionando como abrigo (Panda e Khush, 1995; Stout, 2013; Boiça Júnior et al., 2015). As características das plantas que podem afetar o comportamento dos insetos podem ser estrutural, bioquímica, ou física (Stout, 2013; Boiça Júnior et al., 2015). Nossos resultados sugerem que a ausência de oviposição pode ser um efeito bioquímico, isto é, o tegumento de sementes dos acessos de *P. vulgaris* podem ter características antinutricionais que podem reduzir a oviposição. Fêmeas selecionam sítios para oviposição (Craig e Itami, 2008), onde a prole pode facilmente encontrar abastecimento alimentar adequado, e este comportamento pode envolver a escolha do hospedeiro ideal para o desenvolvimento da prole (Jaenike, 1978). A capacidade de fêmeas para selecionar substratos mais adequados para oviposição constitui uma fonte essencial da resistência em interações planta-inseto (Schoonhoven et al., 2005).

Houve oviposição em sementes naturais de *P. vulgaris*, mas nenhuma oviposição em sementes artificiais (contendo farinha de tegumento de *P. vulgaris*), e isso podem ser devido à presença de compostos tóxicos no tegumento das sementes. Esta hipótese foi confirmada pelo fato das larvas terem eclodido, no entanto, não sobreviveram quando alimentadas com uma dieta contendo sementes naturais de *P. vulgaris* (Figura 7A, B), o que demonstra que essas sementes foram tóxicas para larvas de insetos de *C. maculatus*.

As proteínas de defesas, incluindo as quitinases (Silva et al., 2018), as proteases (Silva et al., 2016) e as proteínas de armazenamento semelhantes à vicilina-7S (Souza et al., 2012), estão presentes em semente de leguminosas e

são altamente tóxicos para larvas de *C. maculatus*. Estas proteínas estão presentes nas camadas externas do tegumento de sementes de várias leguminosas, tais como *C. ensiformis* (Oliveira et al., 1999), *P. lunatus* (Moraes et al., 2000) e *P. vulgaris* (Silva et al., 2004) e são tóxicas para larvas de *C. maculatus*. Estudos anteriores mostraram que o tegumento de sementes de *P. vulgaris* foi altamente prejudicial na oviposição, desenvolvimento embrionário, eclosão das larvas, massa corporal, emergência larval e sobrevivência de *C. maculatus* (Silva et al., 2004; Souza et al., 2011; De Sá et al., 2014).

Os resultados do presente estudo podem ajudar a caracterizar e isolar proteínas e/ou peptídeos a partir dos acessos UENF (2240, 2251, 2252, 2253, 2256, 2264, 2265, 2266, 2274, 2275 e 2287, os quais foram possíveis identificar a presença de defensinas e LTPs na maioria destes, além de inibir a atividade das enzimas da tripsina e das α -amilases. A caracterização bioquímica de sementes de *Phaseolus* é essencial para desenvolver novas cultivares resistentes a pragas e doenças e melhorar o manejo da cultura, para evitar perdas econômicas e reduzir o uso excessivo de agroquímicos. Desta forma, esta caracterização pode contribuir para o melhoramento genético com a aplicação biotecnológica de AMPs para o controle de insetos e microrganismos fitopatogênicos de importância agrônômica.

3.3.6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- Foi possível identificar a presença de AMPs como LTPs em nove extratos proteicos das sementes de feijão-comum, e quanto às defensinas em todos os extratos proteicos;
- Todos os extratos proteicos inibiram significativamente ($p \leq 0,05$) a atividade da enzima α -amilase salivar humana e larval do inseto *C. maculatus*;

- Quinze extratos proteicos inibiram significativamente ($p \leq 0,05$) a atividade da enzima da tripsina;

- Nenhuma atividade antifúngica sobre a inibição do crescimento dos fungos *C. lindemuthianum* e *F. solani* foi detectada nos extratos proteicos das sementes de feijão-comum;

- Sementes naturais de todos os acessos não inibiram a oviposição de *C. maculatus*, no entanto, as larvas não sobreviveram após a dieta com estas sementes;

- Sementes artificiais de todos os acessos inibiram a oviposição de *C. maculatus*, indicando que o tegumento da semente foi também repelente para os insetos.

4. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

– Imagens termográficas e os índices de reflectância foliar representam ferramentas promissoras para o monitoramento e a detecção precoce de doenças em vegetais;

– A presença de AMPs como LTPs e defensinas de plantas, com a capacidade de inibir as enzimas α -amilases (salivar humana e larval do inseto *C. maculatus*) e a tripsina, ambas relacionadas à defesa contra insetos, em sementes de *P. vulgaris*, podem colaborar para uma melhor compreensão da interação de plantas com patógeno e praga para o desenvolvimento de cultivares resistentes;

– Sementes artificiais cobertas com tegumento de todos os genótipos das sementes de *P. vulgaris* inibiram a oviposição do *C. maculatus*, indicando que o tegumento da semente teve efeito repelente ao inseto. Embora as sementes naturais de *P. vulgaris* não tenham inibido a oviposição, as larvas não sobreviveram após se alimentarem com estas sementes, o que sugere que seu mecanismo de resistência está relacionado com a diminuição da capacidade digestiva das larvas de *C. maculatus*;

– A resistência múltipla em *P. vulgaris* ao cretamento bacteriano comum e ao inseto *C. maculatus* foi observada no acesso UENF 2252, sendo o mais recomendado para o desenvolvimento de cultivares resistentes em programas de melhoramento de feijão-comum.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agra, M. F. (1999) Novon 9, 292.

AGRIANUAL (2015) *Anuário da Agricultura Brasileira*. IFNP, São Paulo, SP, Brasil. Consultoria, 472p.

Agrios, G.N. (2004) Plant diseases caused by fungi. In: Agrios, G.N. (ed.) *Plant Pathol.* 5.ed. Elsevier Academic Press, p. 385–614.

Agrios, G.N. (2005) *Plant pathology* (Vol. 5). Amsterdam: Elsevier: Academic Press, 919p.

Ahamed, T., Tian, L., Zhang, Y., Ting, K.C. (2011) A review of remote sensing methods for biomass feedstock production. *Biomass and Bioenergy*, 35: 2455–2469.

Ahmed, F.A., Sipes, B.S., Alvarez, A.M. (2016) Natural products to control postharvest gray mold of tomato fruit-possible mechanisms. *J Plant Pathol Microbiol*, 7: 1–7.

Almeida, F.A.C., Almeida, S.A., Santos, N.R., Gomes, J.P., Araújo, M.E.R. (2005) Efeitos de extratos alcoólicos de plantas sobre o caruncho do feijão *Vigna* (*Callosobruchus maculatus*). *R Bras Eng Agríc Amb*, 9: 585–590.

Alvarenga, M.A.R. (2013) *Origem, botânica e descrição da planta*. In: *Tomate*.

- Produção em campo, casa de vegetação e hidroponia*. 2.ed. Lavras: UFLA, 455p.
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M., Spavorek, G. (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol Z*, 22(6): 711–728.
- Alves, M., Chavez, I., Carrilho, D., Veloso, M., Pinto, C.R. (2010) Detection of novel trypsin inhibitors in the cotyledons of *Phaseolus vulgaris* seeds. *J Plant Physiol*, 167: 848–854.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2013) *Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos – PARA: relatório de atividades de 2011 e 2012*. Brasília, DF, 44p.
- Appleby, J.H., Credland, P.F. (2004) Environmental conditions affect the response of West African *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) populations to susceptible and resistance cowpeas. *J Stored Prod Res*, 40: 269–287.
- Arantes, B.H.T., Martins, G.D., Carvalho, E.R., Nogueira, L.C.A. (2019) Identificação de ferrugem na soja por meio de imagens de alta resolução espacial. *Rev Bras Geogr Fís*, 12(03): 1003–1016.
- Araújo, C.L., Bezerra, I.W.L., Oliveira, A.S., Moura, F.T., Macedo, L.L.P., Gomes, C.E.M., Barbosa, A.E.A.D., Macedo, F.P., Souza, T.N.M.S., Franco, O.L., B-J., C., Sales, M.P. (2005) In vivo bioinsecticidal activity toward *Ceratitidis capitata* (fruit fly) and *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and in vitro bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind tree (*Tamarindus indica*) seeds. *J Agric Food Chem*, 53(11): 4381–4387.
- Arnaud-Santana, E., Coyne, D.P., Eskridge, K.M., Vidaver, A.K. (1994) Inheritance, low correlations of leaf, pod, and seed reactions to common blight disease in common beans, and implications for selection. *J Am Soc Hortic Sci*, 119: 116–121.
- Astafieva, A.A., Rogozhin, E.A., Andreev, Y.A., Odintsova, T.I., Kozlov, S.A.,

- Grishin, E.V. Egorov T.A. (2013) A novel cysteine-rich antifungal peptide ToAMP4 from *Taraxacum officinale* Wigg. flowers. *Plant Physiol Bioch*, 70: 93–99.
- Barbedo, J.G.A. (2013) Digital image processing techniques for detecting, quantifying and classifying plant diseases. *Springerplus*, 2: 660.
- Barbosa, F.R., De Oliveira, A.C.G. (2012) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014*. 1° ed. Santo Antônio de Goiás, Documentos 272.
- Barboza, G.E., Bianchetti, L.D.B. (2005) Three new species of *Capsicum* (Solanaceae) and a key to the wild species from Brazil. *Syst Bot*, 30(4): 863–871.
- Barón, M., Pineda, M., Pérez-Bueno, M.L. (2016) Picturing pathogen infection in plants. *Z Naturforsch C*, 71: 355–368.
- Barton, C.V.M. (2012) Advances in remote sensing of plant stress. *Plant Soil*, 354: 41–44.
- Bastos, J.A.M. (1981) *Principais pragas de cultivares e seus controles*. Nobel, p. 50–84.
- Beebe, S.E. (2012) Common bean breeding in the tropics. In: Janick, J. (Eds.) *Plant Breed. Rev.*, 36: 357–426.
- Belin, E., Rousseau, D., Boureau, T., Caffier, V. (2013) Thermography versus chlorophyll fluorescence imaging for detection and quantification of apple scab. *Comput Electron Agric*, 90: 159–163.
- Benko-Iseppon, M.A., Galdino, L.S., Calsa, T. Jr., Kido, A.E., Tossi, C.L.B., Crovella, S. (2010) Overview on plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pept Sci*, 11: 181–188.
- Bento, C.S., Souza, A.G., Sudré, C.P., Pimenta, S., Rodrigues, R. (2017) Multiple genetic resistances in *Capsicum* spp. *Genet Mol Res*, 16(3).

- Bernfeld, P. (1955) Amylase α and β , *MethEnzymol*, 1, 149–158.
- Bianchini, A., Maringoni, A.C., Carneiro, S.M.P.G. (2005) *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. v.2. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 333–349.
- Birren, B., Fink, G., Lander, E. (2002) Fungal genome initiative: white paper developed by the fungal research community. Cambridge, Ma: Whitethead Institue Center for Genoma Research.
- Bloch, C.J., Richardson, M. (1991) A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect α -amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat γ - purothionins. *FEBS Lett.*, 279: 101–104.
- Bobbio, P.A., Bobbio, F.O. (1995) Pigmentos naturais. In: Bobbio, P.A., Bobbio, F.O. (eds.) *Introdução à Química de Alimentos*. 2ª ed., São Paulo: Varela, cap.6, p.191–223.
- Boechat, L.T., Pinto, F.A.C., De Paula Júnior, T.J., Queiroz, D.M., Teixeira, H. (2014). Detecção do mofo-branco no feijoeiro, utilizando características espectrais. *Rev Ceres*, 61(6): 907–915.
- Boersma, J.G., Hou, A., Gillard, C.L., Mcrae, K.B., Conner, R.L. (2015) Impact of common bacterial blight on the yield, seed weight and seed discoloration of different market classes of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Can J Plant Sci*, 95: 703–710.
- Boiça Júnior, A.L., Souza, B.H.S., Ribeiro, Z.A., Moraes, R.F.O., Eduardo, W.I., Nogueira, L. (2015) A defesa das plantas ao ataque dos insetos. In: Busoli, A.C., Castilho, R.C., Andrade, D.J., Rossi, G.D., Viana, D.L., Fraga, D.F., Souza, L.A. (eds.) *Tópicos em Entomologia Agrícola – VIII*. 1., Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel, cap. 15, p. 161–180.
- Bower, C. (2007) Postharvest handling, storage, and treatment of fresh market berries. In: Zhao, Y. (ed.) *Berry fruit: value-added products for health promotion*. Boca Raton: CRC, p. 262–288.

- Bradford, M.M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72(1-2): 248–254.
- Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., De Samblanx, G., Osborn, R.W. (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Crit Rev Plant Sci*, 16(3): 297–323.
- Broekaert, W.F., Lee, H.I., Kush, A., Chua, N.H., Raikhel, N. (1990) Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 7633–7637.
- Budagavi, D.P., Zarin, S., Chugh, A. (2017) Antifungal activity of Latarcin 1 derived cell-penetrating peptides against *Fusarium solani*. *Biomembranes*, 1860: 250–256.
- Campos, M.L., Souza, C.M., Oliveira, K.B.S., Dias, S.C., Franco, O.L. (2018) The role of antimicrobial peptides in plant immunity. *J Exp Bot*, 294.
- Cândido, E.S., Pinto, M.F., Pelegrini, P.B., Lima, T.B., Silva, O.N., Pogue, R., Grossi-De-Sá, M.F., Franco, O.L. (2011) Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *FASEB J*, 25(10): 3290–3305.
- Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, M.F. (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties: A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40: 1515–1539.
- Carneiro, J.E.S., De Paula Júnior, T.J., Borém, A. (2015) *Feijão do plantio à colheita*. Ed. Viçosa, MG: UFV, 384p.
- Carvalho, A.O., Gomes, V.M. (2009) Plant defensins—Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30: 1007–1020.
- Carvalho, A.O., Gomes, V.M. (2011) Plant defensins and defensin-like peptides – Biological activities and biotechnological applications. *Curr Pharm Des*, 17: 4270–4293.

- Carvalho, C., Treichel, M., Filter, C.S., Beling, R.R. (2016) Anuário brasileiro do tomate. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta, 84p. <http://www.editoragazeta.com.br/wp-content/uploads/2017/02/PDF-Tomate-2016_Dupla.pdf>. Acesso em 08/09/2019.
- Casali, V.W.D., Stringheta, P.C. (1984) Melhoramento do pimentão e pimenta para fins industriais. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 10 (113): 23–25.
- Casey, R., Domoney, C., Ellis, N. (1986) Legume storage proteins. Oxford Surv. *Plant Molecular Cell Biology*, 3: 1-95.
- Castro, M.S., Fontes, V.M. (2005) Plant defensins- Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30: 1007–1020.
- Cavalcanti, T.F.M. (2018) Agrobiodiversidade de feijão-comum conservado *on farm* em três regiões do estado do Rio de Janeiro. 98f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ.
- Chaerle, L., Hagenbeek, D., De Bruyne, E., Valcke, R., Van Der Straeten, D. (2004) Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant-pathogen interactions at an early stage. *Plant Cell Physiol*, 45: 887-896.
- Chaerle, L., Pineda, M., Romero-Aranda, R., Van Der Straeten, D., Baro'n, M. (2006) Robotized thermal and chlorophyll-fluorescence imaging of pepper mild mottle virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol*, 47: 1323–1336.
- Chaerle, L., Van Caeneghem, W., Messens, E., Lambers, H., Van Montagu, M., Van Der Straeten, D. (1999) Presymptomatic visualization of plant-virus interactions by thermography. *Nat Biotechnol*, 17: 813–816.
- Chan, S.Y., Zhang, Y., Ng, T.B. (2013) Brown kidney bean Bowman–Birk trypsin inhibitor is heat and pH stable and exhibits anti-proliferative activity. *Appl Biochem Biotech*, 169: 1306–1314.
- Charles, M. T., Mercier, J., Makhlouf, J., Arul, J. (2008) Physiological basis of UVC-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit. *Postharvest Biol*

Technol, 1(47): 10–20.

- Charles, M. T., Tano, K., Asselin, A., Arul, J. (2009) Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit. V. Constitutive defence enzymes and inducible pathogenesis-related proteins. *Postharvest Biol Technol*, 51: 414–424.
- Chemura, A., Mutanga, O., Dube, T. (2016) Separability of coffee leaf rust infection levels with machine learning methods at Sentinel-2 MSI spectral resolutions. *Precis Agric*, 18: 859–881.
- Chiwaki, K., Nagamori, S., Inoue, Y. (2005) Predicting bacterial wilt disease of tomato plants using remotely sensed thermal imagery. *J Agric Meteorol*, 61(3): 153–163.
- CID Bio-Science. (2020) Disponível em: <<https://cid-inc.com/plant-science-tools/leaf-spectroscopy/ci-710-miniature-leaf-spectrometer/>> Acesso em 01/02/2020.
- Cohn, J., Sessa, G., Martin, G.B. (2001) Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol*, 13: 55–62.
- Colariccio, A., Eiras, M., Chaves, A.L.R., Lourenção, A.L., Melo, A.M.T., Siqueira, W.J. (2000) Detecção do '*Chysoanthemum stem necrosis virus*' em tomateiro no estado de São Paulo. *Summa Phytopathol*, 25: 252–254.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. (2016) Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb>>. Acesso em 03/10/2017.
- Costa, J.G.C., Rava, C.A. (2003) Linhagens de feijoeiro comum com fenótipos agronômicos favoráveis e resistência ao crestamento bacteriano comum e antracnose. *Cienc e Agrotecnol*, 27(5): 1176–1182.
- Costa, J.M., García-Tejero, I.F., Chaves, M. (2013a) O uso da termografia na agricultura moderna. *Revista da APH* N.º 113.
- Costa, J.M., Grant, O.M., Chaves, M.M. (2013b) Thermal imaging to assess plant-environment interactions. *J Exp Bot*, 64: 3937–3949.

- Cota, I.E., Troncoso-Rojas, R., Sotelo-Mundo, R., Sánchez-Estrada, A., Tiznado-Hernández, M.E. (2007) Chitinase and β -1,3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. *Sci Hort*, 112: 42–50.
- Craig, T.P., Itami, J.K. (2008) Evolution of preference and performance relationships. In: Tilmon, K.J. (ed) *Specialization, speciation, and radiation: the evolutionary biology of herbivorous insects*. University of California Press, Berkeley, p. 20–28.
- Credland, P.F. (1987) Effects of host change on the fecundity and development of an unusual strain of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *J Stored Prod Res*, 23: 91–98.
- Credland, P.F., Dendy, J. (1992) Intraespecific variation in bionomic characters of the Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus*. *Entomol Exp Appl*, 65: 39–47.
- Cruz, L.P., De Sá, L.F.R., Santos, L.A., Gravina, G.A., Carvalho, A.O., Fernandes, K.V.S., Freire-Filho, F.R., Gomes, V.M., Oliveira, A.E.A. (2016) Evaluation of resistance in different cowpea cultivars to *Callosobruchus maculatus* infestation. *J Pest Sci*, 89: 117–128.
- D’Arcy, W.G. (1991) The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Hawkes, J.G., Lester, R.N., Nee, M., Estrada, N. (eds.) *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. London: Kew Royal Botanical Gardens, p. 75–137.
- Dalla Pria, M., Silva, O.C. (2010) *Cultura do feijão: doenças e controle*. Ponta Grossa, UEPG. 454p.
- Dang, L., Els, J.M., Damme, V. (2015) Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*, 117: 51–64.
- De Sá, L.F.R., Ventury, K.E., Machado, O.L.T., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J., Oliveira, A.E.A. (2018) Toxic effect of *Canavalia ensiformis* seed coat on larval development of *Callosobruchus maculatus*. *J Pest Sci*, 91: 313–326.
- De Sá, L.F.R., Wermelinger, T.T., Ribeiro, E.S., Gravina, G.A., Fernandes, K.V.S.,

- Xavier-Filho, J., Venancio, T.M., Rezende, G.L., Oliveira, A.E.A. (2014) Effects of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) seed coat on the embryonic and larval development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *J. Insect Physiol.*, 60: 50–57.
- Derbyshire, E., Wright, D.J., Boulter, D. (1976) Review: Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, 15: 3–24.
- Derckel, J.P., Baillieul, F., Manteau, S., Audran, J.C., Haye, B., Lambert, B. and Legendre, L. (1999) Differential induction of grapevine defences by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 89: 197–203.
- Dias, G.B., Gomes, V.M., Moraes, T.M., Zottich, U.P. (2013) Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. *Genet Mol Res*, 12: 6488–6501.
- Díaz, C.G., Bassanezi, R.B., Godoy, C.V., Lopes, D.B., Bergamin Filho, A. (2001) Quantificação do efeito do cretamento bacteriano comum na eficiência fotossintética e na produção do feijoeiro. *Fitopatol Bras*, 26(1): 71–76.
- Díaz, J., Ten Have A., Van Kan J.A.L. (2002) The role of ethylene and wound signalling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol*, 129: 1341–1351.
- Dik, A.J., Koning, G., Kohl, J. (1999) Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato. *Eur J Plant Pathol*, 105(2): 115–122.
- Diz, M.S.S., Carvalho, A.O., Ribeiro, S.F.F., Da Cunha, M., Beltramini, L., Rodrigues, R., Nascimento, V.V., Machado, O.L.T., Gomes, V.M. (2011) Characterisation, immune localisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. *Physiol Plantarum*, 142: 233–246.
- Dongre, T.K., Pawar, S.E., Thakare, R.G., Harwalkar, M.R. (1996) Identification of resistant sources to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) in *Vigna* spp. and inheritance of their resistance in black gram (*Vigna* var. *mungo*). *J Stored*

Prod Res, 32: 201–204.

- Droby, A., Lichter, A. (2007) Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In: Elad, Y. et al. (eds.) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, p. 349– 367
- Egorov, Ts.A., Odintsova, T.I. (2012) Defense peptides of plant immunity. *Russ J Bioorg Chem+*, 38: 1–9.
- El Oirdi, M., El Rahman, T. A., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M. C., Daayf, F., Bouarab, K. (2011) *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *The Plant Cell*, 23 (6): 2405–2421.
- Elad, Y. (2016) Cultural and integrated control of *Botrytis* spp., In: S. Fillinger, Y. Elad (Eds.) *Botrytis - the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Springer, Cham., p. 149–164.
- Elad, Y., Vivier, M., Fillinger, S. (2015) *Botrytis*: the good, the bad and the ugly. In: Fillinger, S., Elad, Y., Vivier, M. (eds.) *Botrytis-the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*, p. 1–15.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzinski, P., Delen, N. (2004) *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzinski, P., Delen, N. (eds.) *Botrytis: biology, pathology and control*. The Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 1–6.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2008) *Origem e história do feijão*. Disponível em: <<http://migre.me/7or1u>>. Acesso em: 05/12/2016.
- EMBRAPA HORTALIÇAS – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Hortaliças. (2015) *Capsicum*: Pimentas e pimentões no Brasil. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/capsicum/doencas.htm>>. Acesso: 27/08/2019.
- Eshbaugh, W.H. (1993) Peppers: history and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In: Janick, J., Simon, J.E. (eds.) *New crops*. Wiley, New York. p. 132-139.

- Fagundes, C., Palou, L., Monteiro, A.R., Pérez-Gago, M.B. (2015) Hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings formulated with antifungal food additives to reduce alternaria black spot and maintain postharvest quality of coldstored cherry tomatoes. *Sci Horti*, 193: 249–257.
- FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations - Statistics Division). (2017) Production/crops: Chillies and peppers. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 09/01/2020.
- Feng, G.H., Richardson, M., Chen, M.G., Kramer, K.J., Morga, T.D., Reeck, G.R. (1996) α -Amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and pattern of inhibition of insect and human α -amylases. *Insect Biochem Mol Biol*, 26: 419–426.
- Ferreira, C.F. (2002) Marcadores de DNA no mapeamento de regiões genômicas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) associados à resistência ao cretamento bacteriano comum. 107f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ.
- Ferreira, C.F., Pereira, M.G., Santos, A.S.S., Rodrigues, R., Bressan-Smith, R.E., Viana, A.P., Daher, R.F. (2003) Resistance to common bacterial blight in *Phaseolus vulgaris* L. recombinant inbred lines under natural infection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Euphytica*, 134: 43–46.
- Filgueira, F.A.R. (2008) *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 412p.
- Fillinger, S., Walker A-S. (2016) Chemical control and resistance management of *Botrytis* diseases. In: Fillinger, S., Elad, Y. (eds.) *Botrytis - the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Springer, Cham. 6102, p. 189–216.
- Fininsa, C. (2003) Relationship between common bacterial blight severity and bean yield loss in pure stand and bean - maize intercropping systems. *Int J Pest Manage*, 49(3): 177–185.

- FLIR Systems. (2020) Disponível em: <https://www.flirmedia.com/MMC/THG/Brochures/RND_014/RND_014_US.pdf>. Acesso em 01/02/2020.
- Franco, O.L., Rigden, D.J., Melo, F.R., Bloch, C., Silva, C.P., Grossi de Sá, M.F., (2000) Activity of wheat alpha-amylase inhibitors towards bruchid alpha-amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur J Biochem*, 267: 2166–217.
- Games, P.D., Santos, I.S., Mello, E.O., Diz, M.S.S., Carvalho, A.O., Souza-Filho, G.A., Da Cunha, M., Vasconcelos, I.M., Ferreira, B.S., Gomes, V.M. (2008) Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides*, 29: 2090–2100.
- Gamon, J.A., Peñuelas, J., Field, C.B. (1992) A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sens Environ*, 41: 35–44.
- Gamon, J.A., Serrano L., Surfus, J.S. (1997) The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types and nutrient levels. *Oecologia*, 112(4): 492–501.
- Gamon, J.A., Surfus, J.S. (1999) Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *New Phytol*, 143: 105–117.
- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A. (2001) Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Lett.*, 498: 219–222.
- García, T., Gutiérrez, J., Veloso, J., Gago-Fuentes, R., Díaz, J. (2015) Wounding induces local resistance but systemic susceptibility to *Botrytis cinerea* in pepper plants. *J Plant Physiol*, 176: 202–209.
- García-Tejero, I.F., Costa, J.M., Egipto, R., Lima, R.S.N., Durán, V.H., López, C., Chaves, M.M. (2016) Thermal data to monitor crop-water status in irrigated Mediterranean viticulture. *Agric Water Manag*, 176: 80–90.
- García-Tejero, I.F., Hernández, A., Padilla-Díaz, C.M., Diaz-Espejo, A., Fernández, J.E. (2017) Assessing plant water status in a hedgerow olive

- orchard from thermography at plant level. *Agric Water Manag*, 188: 50–60.
- Gebbers, R., Adamchuk, V.I. (2010) Precision agriculture and food security. *Science*, 327, 828–831.
- Gepts, P., Debouck, D.G. (1991) Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Schoonhoven, A. Van, Voysest, O. (eds.) *Common beans: research for crop improvement*. C.A.B. Intl., Wallingford, UK e CIAT, Cali, Colômbia, p. 7–53.
- Gitelson, A.A., Zur, Y., Chivkunova, O.B., Merzlyak, M.N. (2002) Assessing carotenoid content in plant leaves with reflectance spectroscopy. *J Photochem Photobiol*, 75: 272–281.
- Gitelson, A.A., Merzlyak, M.N., Zur, Y., Stark, R., Gritz, U. (2001) Non-destructive and remote sensing techniques, for estimation of vegetation status. In: Proceedings, Third European Conference on Precision Agriculture, Montpellier, 1: 205–210.
- Glas, J.J., Schimmel, B.C.J., Alba, J.M., Escobar-Bravo, R., Schuurink, R.C., Kant, M.R. (2012) Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *Int J Mol Sci*, 13: 17077–17103.
- Gomes, M.T., Oliva, M.L.V., Lopes, M.T., Sala, C.E. (2011) Plant proteinases and inhibitors: an overview of biological function and pharmacological activity. *Curr Protein Pept Sci*, 12: 417–436.
- Gomes, V.M., Mosqueda, M.I., Blanco-Labra, A., Sales, M.P., Fernandes, K.V.S., Cordeiro, R.A., Xavier-Filho, J. (1997) Vicilin storage proteins from *Vigna unguiculata* (legume) seeds inhibit fungal growth. *J Agr Food Chem*, 45(10): 4110–4115.
- Gomez, S. (2014) Infection and spread of *Peronospora sparsa* on *Rosa* sp. (Berk.) a microscopic and a thermographic approach. Dissertation, University of Bonn, Germany.
- Gowen, A.A., Tiwari, B.K., Cullen, P.J., McDonnell, K., O'donnell, C.P. (2010) Applications of thermal imaging in food quality and safety assessment-review.

Trends Food Sci Technol, 21: 190–200.

- Grabke, A. (2014) Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry - Molecular Mechanisms and Management. 106f. Tese (Ciências Agronômicas e de Cultivos comuns, Biologia comum e Patologias Farmacêuticas), Universidade de Clemson, Carolina do Sul.
- Hall, A. E., Singh, B.B., Ehlers, J.D. (1997) Cowpea breeding. *Plant Breed Rev*, 15: 217–224.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (2000) Responses to plant pathogens In: Biochemistry and molecular biology of plants. Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones R. L. (eds.) *American Society of Plant Physiology*, p. 1102–1156.
- Harvey, M., Quilley, S., Beynon, H. (2002) *Exploring the tomato: transformations of nature, society and economy*. Cheltenham, UK: Edward Elgar, 324p.
- Hawkes, J.G. (1999) The economic importance of the family Solanaceae. In: Nee, M., Symon, D.E., Lester, R.N., Jessop, J.P. (eds.) *Solanaceae IV*. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 1–8.
- Hayward, A.C. (1993) The hosts of *Xanthomonas*. In Swings, J.G., Civerolo, E.L., (eds.) *Xanthomonas*, Chapman & Hall, London, p. 51-54.
- Heath, M.C. (1997) Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal parasites. In *The Mycota V, Part B, plant relationships*. Edited by Carroll G. C., Tudzynski P. Berlin. *Springer*, 257–276.
- Heath, M.C. (2000) Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 406–416.
- Heil, M. (2010) Plastic defence expression in plants. *Evol Ecol*, 24: 555–569.
- Hématy, K., Cherk, C., Somerville, S. (2009) Host–pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 406–413.
- Hikishima, M., Canteri, M.G., Godoy, C.V., Koga, L.J., Da Silva, A.J. (2010) Quantificação de danos e relações entre severidade, medidas de refletância e

- produtividade no patossistema ferrugem asiática da soja. *Trop Plant Pathol*, 35: 096–103.
- Holaskova, E., Galuszka, P., Frebort, I., Oz, M.T. (2015) Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnol Adv*, 33: 1005–1023.
- Huesing, J.E., Shade, R.E., Chrispeels, M.J., Larry L., Murdock L.L. (1991) α -amylase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean seeds to cowpea weevil1. *Plant Physiol*, 96: 993–996.
- IBGE –Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2006) *Censo Agropecuário*. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 19/01/2016.
- IBGE –Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2017) Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agriculturaepecuaria/21814%202017%20-%20censo-agropecuario.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 03/12/2019. .
- Jaenike, J. (1978) On optimal oviposition behaviour in phytophagous insects. *Theor Popul Biol*, 14: 350–356.
- Jafari, M., Minaei, S., Safaie, N. (2017) Detection of pre-symptomatic rose powdery-mildew and gray-mold diseases based on thermal vision. *Infrared Phys Technol*, 85: 170–183.
- Jafari, M., Minaei, S., Safaie, N., Torkamani-Azar, F. (2016) Early detection and classification of powdery mildew infected leaves of rose with ANFIS based on extracted features of thermal images. *Infrared Phys Technol*, 76: 338–345.
- Janeczko, A., Dziurka, M., Gullner, G., Kocurek, M., Rys, M., Saja, D., Skoczowski, A., Tóbiás, I., Kornas, A., Barna, B. (2018) Comparative studies of compatible and incompatible pepper – *Tobamovirus* interactions and the evaluation of effects of 24-epibrassinolide. *Photosynthetica*, 56: 763–775.
- Jin, P., Wang, H., Zhang, Y., Huang, Y., Wang, L., Zheng, Y. (2017) UV-C enhances resistance against gray mold decay caused by *Botrytis cinerea* in strawberry fruit. *Sci Hortic*, 225: 106–111.

- Jones, H.G., Stoll, M., Santosa, T., De Sousa, C., Chaves, M.M., Grant, O.M. (2002) Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *J Exp Bot*, 53: 2249–2260.
- Kaplan, H. (2007) *Practical applications of infrared thermal sensing and imaging equipment*, 3rd (ed.) Washington, USA: SPIE Press.
- Kim, Y.S., Lee, H.H., Ko, M.K., Song, C.E., Bae, C.Y., Lee, Y.H., Oh, B.J. (2001) Inhibition of fungal appressorium formation by pepper (*Capsicum annuum*) esterase. *Mol Plant Microbe In*, 14(1): 80–85.
- Kingsolver, J.M. (2004) *Handbook of the Bruchidae of the United States and Canada*, vol 1. United States Department of Agriculture (USDA), Washington, p. 82–85.
- Khirade, S.D., Patil, A.B. (2015) Plant disease detection using image processing. international conference on computing communication control and automation.
- Knapp, S. (2002) Floral diversity and evolution in the Solanaceae. In: Cronk, Q.C.B., Bateman, R.M., Hawkins, J.A. (eds.) *Developmental genetics and plant evolution*. London: Taylor and Francis, p. 267–297.
- Ko, M., Cho, J.H., Seo, H.H., Lee, H.H., Kang, H.Y., Nguyen, T.S. (2016) Constitutive expression of a fungus-inducible carboxylesterase improves disease resistance in transgenic pepper plants. *Planta*, 244(2): 379–392.
- Kogan, M., Ortman, E. (1978) Antixenosis: a new term proposed to define Painter's "Nonpreference" modality of resistance. *Bulletin Entomol Soc Am*, 24: 175–176.
- Kurozawa, C., Pavan, M.A. (2005) Doenças do tomateiro. In: Kimati, H., Amorin, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. (eds.) *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, (2): 607–626p.
- Lam-Sánchez, A. (1992) Centros de origem das plantas cultivadas: tradução e compilação. Jaboticabal: UNESP/FUNEP. 45p.

- Leonard, T., Nguyen, E., Haney, F., Hans, J.V. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biochem*, 10: 10–16.
- Lev-Yaudan, S., Gould, K.S. (2009) Role of anthocyanins in plant defence. In: Winefield, C., Davies, K., Gould, K. Anthocyanins: biosynthesis, functions and applications. *Springer*, 22–28.
- Lima, R.S.N., García-Tejero, I.F., Lopes, T.S., Costa, J.M., Vaz, M., Durán-Zuazo, V.H., Chaves, M., Glenn, D.M., Campostrini, E. (2016) Linking thermal imaging to physiological indicators in *Carica papaya* L. under different watering regimes. *Agric Water Manag*, 164: 148–157.
- Lin, F., Wang, D., Zhang, D., Yang, X. (2018) Evaluation of spectral disease index PMI to detect early wheat powdery mildew using hyperspectral imagery data, *Int J Agric Biol*, 20(9): 1970–1978.
- Lindenthal, M., Steiner, U., Dehne, H.W., Oerke, E.C. (2005) Effect of downy mildew development on transpiration of cucumber leaves visualized by digital infrared thermography. *Phytopathology*, 95: 233-240.
- Liu, J., Tian, S., Meng, X., Xu, Y. (2007) Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biol Technol*, 44: 300-306.
- Lobo, V.L.S., Giordano, L.B., Lopes, C.A. (2005) Herança da resistência à mancha-bacteriana em tomateiro. *Fitopatol Bras*, 30: 343–349.
- Lopes, C.A., Ávila, A.C. (2005) *Doenças do tomateiro*. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, Brasil.
- Lucas, J.A. (2010) Advances in plant disease and pest management. *J Agric Sci*, 149: 91–114.
- Macedo, M.L., Garcia, V.A., Freire, M., Richardson, M. (2007) Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, 68: 1104–1111.

- Mahajan, G.R., Sahoo, R.N., Pandey, R.N., Gupta, V.K., Kumar, D. (2014) Using hyperspectral remote sensing techniques to monitor nitrogen, phosphorus, sulphur and potassium in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Precis Agric*, 15: 499–522.
- Mahlein, A.K. (2016) Plant disease detection by imaging sensors—Parallels and specific demands for precision agriculture and plant phenotyping. *Plant Dis*, 100: 241–251.
- Mahlein, A.K., Elias Alisaac, E., Masri, A.A., Behmann, J., Dehne, H.W., Oerke, E.C. (2019) Comparison and combination of thermal, fluorescence, and hyperspectral imaging for monitoring *Fusarium* head blight of wheat on spikelet scale. *Sensors*, 19: 2281.
- Mahlein, A.K., Kuska, M.T., Behmann, J., Polder, G., Walter, A. (2018) Hyperspectral sensors and imaging technologies in phytopathology: State of the art. *Annu Rev Phytopathol*, 56: 535–558.
- Mahlein, A.K., Steiner, U., Dehne, H.W., Oerke, E.C. (2010) Spectral signatures of sugar beet leaves for the detection and differentiation of diseases. *Precis Agric*, 11: 413–431.
- Mahlein, A.K., Steiner, U., Hillnhütter, C., Dehne, H.W., Oerke, E.C. (2012) Hyperspectral imaging for small-scale analysis of symptoms caused by different sugar beet diseases. *Plant Methods*, 8, 3.
- Malinovsky, F.G., Fangel, J.U., Willats, W.G.T. (2014) The role of the cell wall in plant immunity. *Front Plant Sci*, 5, 178.
- Mahmoud, A.M.A., El-Eslamboly, A.S.A. (2015) Production and evaluation of high yielding sweet pepper hybrids under greenhouse conditions. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 4: 573–580.
- MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Vegetal: Feijão*. (2013) Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>>. Acesso em 11/11/2016.
- Marin, D.B., Alves, M.C., Pozza, E.A., Belan, L.L., Freitas, M.L.O. (2019a)

- Multispectral radiometric monitoring of bacterial blight of *Coffee*. *Precis Agric*, 20: 959–982.
- Marin, D.B., Alves, M.C., Pozza, E.A., Gandia, R.M., Cortez, M.L.J., Mattioli, M.C. (2019b) Sensoriamento remoto multiespectral na identificação e mapeamento das variáveis bióticas e abióticas do cafeeiro. *Rev Ceres*, 66(2): 142–153.
- Martins, F.C., Figueiredo, N. (1998) Solanáceas (Solanaceae Juss.) do estado do Maranhão. Monografia de conclusão de curso. Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 86p.
- Marques Júnior, O.G., Ramalho, M.A.P. (1995) Determinação da taxa de fecundação cruzada de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) nas diferentes épocas de semeadura em Lavras-MG. *Ciência e Prática*, 19(3): 339–341.
- Márquez, M.L., Teran, H., Singh, S.P. (2007) Selecting common bean with genes of different evolutionary origins for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Crop Sci*, 47.
- Mello, E.O., Ribeiro, S.F.F., Carvalho, A.O., Santos, I.S., Da Cunha, M., Santa-Catarina, C., Gomes, V.M. (2011) Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification and induction of ROS in fungi cells. *Curr Microbiol*, 62(4): 1209–1217.
- Mello, E.O., Santos, I.S., Carvalho, A.O., Souza, L.S., Souza-Filho, G.A., Nascimento, V.V., Machado, O.L.T., Zottich, U., Gomes, V.M. (2014) Functional expression and activity of the recombinant antifungal defensin PvD1r from *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) seeds. *BMC Biochem*, 15, 7.
- Melo, P.C.T. (1989) Melhoramento genético do tomateiro. *Asgrow*, Campinas, 55p. (impresso).
- Merzlyak, M.N., Gitelson, A.A., Chivkunova, O.B., Rakitin, V.Y. (1999) Non-destructive optical detection of pigment changes during leaf senescence and fruit ripening. *Physiol Plantarum*, 106: 135–141.
- Messina, V. (2014) Nutritional and health benefits of dried beans. *Am J Clin Nutr*, 100(1): 437–442.

- Miklas, P.N., Coyne, D.P., Grafton, K.F., Mutlu, N., Reiser, J., Lindgren, D.T., Singh, S.P. (2003) A major QTL for common bacterial blight resistance derives from the common bean great northern landrace cultivar Montana No. 5. *Euphytica*, 131: 137–146.
- Mirzaei, S., Goltapeh, E.M., Shams-Bakhsh, M., Safaie, N., Chaichi, M. (2009) Genetic and phenotypic diversity among *Botrytis cinerea* isolates in Iran. *J. Phytopathol.* 157: 474–482.
- Mitcham, E. (2007) Quality of berries associated with preharvest and postharvest conditions. In: Zhao, Y. (ed.) Berry fruit: value-added products for health promotion. Boca Raton: CRC, p. 207–228.
- Mithöfer, A., Boland, W. (2012) Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu Rev Plant Biol*, 63: 431–450.
- Mookherjee, P.B., Chawla, M.L. (1964) Effect of temperature and humidity on the development of *Callosobruchus maculatus*. Fab. A serious pest of stored pulses. *Indian J*, 26(3): 345–351.
- Moraes, R., Sales, M.P., Pinto, M.S.P., Silva, L.B., Oliveira, A.E.A., Machado, O.L.T., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J. (2000) Lima bean (*Phaseolus lunatus*) seed coat phaseolinis detrimental to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Braz J Med Biol Res*, 33: 191–198.
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A. (2005) *Manejo integrado do mofo cinzento, causado por Botrytis cinerea*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 37p.
- Moreno, J., Altabella, T., Chrispeels, M.J. (1990) Characterization of α -amylase inhibitor, a lectin-like protein in the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol*, 92(31): 703–709.
- Moriya, É.A.S. (2015) Identificação de bandas espectrais para detecção de cultura de cana-de-açúcar sadia e doente utilizando câmara hiperespectral embarcada em VANT. 147p. Tese (Doutorado em Ciências Cartográficas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Presidente Prudente, SP.

- Moriya, É.A.S., Imai, N.N., Tommaselli, A.M. G. (2017) Avaliação do potencial de índices de vegetação para detecção de doença na cana-deaçúcar em imagens hiperespectrais adquiridas por VANT. *Anais do XVIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*. ISBN: 978-85-17-00088-1.
- Moscone, E.A., Scaldaferrro, M.A., Gabriele, M., Cecchinni, N.M., Ehrendorfer, F. (2007) The evolution of chili peppers (*Capsicum* – Solanaceae): a cytogenetic perspective. *Acta Hortic*, 745: 137–169.
- Müntz, K. (1996) Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. *J Exp Bot*, 47(298): 605–622.
- Naika, S., Jeude, J.V.L., Goffau, M., Hilmi, M., DAM, B.V. (2006) *A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização*. Agro dok 17, 104p.
- Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., Goździcka-Józefiak, A. (2014) Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol*, 59: 181-196.
- Nguyen, L.T., Haney, E.F., Vogel, H.J. (2011) The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biochem*, 29: 464–472.
- Nilsson, H.E. (1991) Hand-held radiometry and IR-thermography of plant disease in field plot experiments. *Int J Remote Sens*, 12: 545–557.
- Nishimura, M.T., Dangl, J. (2010) Arabidopsis and the plant immune system. *Plant J*, 61: 1053–1066.
- Oerke, E.C., Frohling, P., Steiner, U. (2011) Thermographic assessment of scab disease on apple leaves. *Precis Agric*, 12: 699–715.
- Oerke, E.C., Steiner, U., Dehne, H.W., Lindenthal, M. (2006) Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. *J Exp Bot*, 57: 2121–2132.
- Oerke, E.C., Gerhards, R., Menz, G., Sikora, R. (2010) *Precision crop protection The challenge and use of heterogeneity*. Dordrecht: Springer Netherlands,

468p.

- Oliveira, A.E.A., Sales, M.P., Machado, O.L.T., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J. (1999) The toxicity of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) cotyledon and seed coat proteins to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Entomol Exp Appl*, 92: 249–255.
- Oliveira, L.F.R., Oliveira, M.L.R., Gomes, F.S., Santana, R.C. (2017) Estimating foliar nitrogen in *Eucalyptus* using vegetation indexes. *Sci Agric*, 74: 142–147.
- Olmstead, R.G. (2013) Phylogeny and biogeography in Solanaceae, Verbenaceae and Bignoniaceae: A comparison of continental and intercontinental diversification patterns. *Bot J Linn Soc*, 171: 80–102.
- Olmstead, R.G., Bohs, L. (2007) A summary of molecular systematic research In Solanaceae: 1982- 2006. In: Spooner D.M., Bohs L., Giovannoni, J., Olmstead R.G., Shibata D. (eds.) *Solanaceae VI: genomics meets biodiversity proceedings of the sixth international solanaceae conference*. Acta Horticulture 745. International Society for Horticultural Science: Leuven, p. 255–268.
- Osborn, R.W., De Samblanx, G.W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Van Leuven, F., Attenborough, S., Rees, S.B., Broekaert, W.F. (1995) Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett*, 368(2): 257–262.
- Painter, R.H. (1951) *Insect Resistance in Crop Plants*. Lawrence, KS: The University Press of Kansas.
- Palaretti, V.V. (2018) Pressões hiperbáricas no controle de mofo cinzento e de mancha de alternaria na pós-colheita de tomate. 101f. Tese de Doutorado em Agronomia (Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal – SP.
- Panda, N., Khush, G.S. (1995) *Host plant resistance to insects*. CAB International, Wallingford, 431p.
- Park, S., Jeong, W.Y., Lee, J.H., Kim, Y.H., Jeong, S.W., Kim, G.S., Bae, D.W., Lim, C.S., Jin, J.S., Lee, S.J., Shin, S.C. (2012) Determination of polyphenol

- levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food chemistry*, 130: 981–985.
- Pastor-Corrales, M.A., Beebe, S.E., Correa, F.J. (1981) Comparing two inoculation techniques for evaluating resistance in beans to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. In: International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. *Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali*, p. 493–503.
- Paula Júnior, T.J., Zambolim, L. (2006) Doenças. In: Vieira, C., Paula Júnior, T.J., Borém, A. (eds.) *Feijão: Aspectos gerais e cultura no estado de Minas*. Ed. Viçosa, MG: UFV, p. 375–433.
- Payan, F. (2004) Structural basis for the inhibition of mammalian and insect alpha-amylases by plant protein inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, 1696: 171–180.
- Pedrali, L.D., Borges Júnior, N., Pereira, R.S., Tramontina, J., Alba, E., Juliana Marchesan, J. (2019) Sensoriamento remoto multiespectral para determinação de níveis de severidade de seca de ponteiros em *Eucalyptus* spp. *Sci For*, 47 (122): 224–234.
- Pelegri, P.B., Lay, F.T., Murad, A.M., Anderson, M.A., Franco, O.L. (2008) Novel insights on the mechanism of action of α -amylase inhibitors from the plant defensin Family. *Proteins*, 73(3): 719–729.
- Peñuelas, J., Filella I., Baret F. (1995) Semi-empirical indices to assess carotenoids/chlorophyll *a* ratio from leaf spectra reflectance. *Photosynthetica*, 31: 221–230.
- Peñuelas, J., Filella, I., Biel, C., Serrano, L., Savé, R. (1993) The reflectance at the 950-970 nm region as an indicator of plant water status. *Int J Remote Sens*, 14: 1887–1905.
- Peñuelas, J., Pinol, J., Ogaya, R., Filella, I. (1997) Estimation of plant water concentration by the reflectance water index WI (R_{900}/R_{970}). *Int J Remote Sens*, 18: 2869–2875.
- Peralta, I.E., Knapp, S., Spooner, D.M. (2006) Nomenclature for wild and

- cultivated tomatoes. *Rep Tomato Genet Coop*, 56(1): 6–12.
- Pereira, A.C.R.L., Oliveira, J.V., Gondim Junior, M.G.C., Câmara, C.A.G. (2008) Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Ciênc agrotec*, 32(3): 717–724.
- Pereira, L.S., Nascimento, V.V., Ribeiro, S.F.F., Rodrigues, R., Fernandes, K.V.S., Carvalho, A.O., Vasconcelos, I.M., Bento, C.S., Sudré, C.P., Zottich, U., Gomes, V.M. (2018) Characterization of *Capsicum annuum* L. leaf and root antimicrobial peptides: antimicrobial activity against phytopathogenic microorganisms. *Acta Physiol Plantarum*, 40: 107.
- Pereira, O.L. (2007) *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous e Braun: novo nome para o agente causal da mancha angular do feijoeiro. Brasília-DF: Editora da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, (Informativo Notícias Fitopatológicas, 31), 4p.
- Pérez-Bueno, M.L., Granum, E., Pineda, M., Flors, V., Rodriguez-Palenzuela, P., López-Solanilla, E., Barón, M. (2016a) Temporal and spatial resolution of activated plant defense responses in leaves of *Nicotiana benthamiana* Infected with *Dickeya dadantii*. *Front Plant Sci*, 6: 1209.
- Pérez-Bueno, M.L., Pineda, M., Cabeza, F.M., Barón, M. (2016b) Multicolor fluorescence imaging as a candidate for disease detection in plant phenotyping. *Front Plant Sci*, 7: 1790.
- Pérez-Bueno, M.L., Pineda, M., Díaz-Casado, E., Barón, M. (2015) Spatial and temporal dynamics of primary and secondary metabolism in *Phaseolus vulgaris* challenged by *Pseudomonas syringae*. *Physiol Plantarum*, 153: 161–174.
- Peterson, R.K.D., Varella, A.C., Higley, L.G. (2017) Tolerance: the forgotten child of plant resistance. *PeerJ*, 5: 3934.
- Pickersgill, B. (1986) *Capsicum* spp. In: León, J. (ed.) *Guidelines for seed exchange and plant introduction in tropical crops*. FAO, p. 73–78.
- Polat, I., Baysal, O., Mercati, F., Gümrükcü, E., Sülü, G., Kitapçı, A., Araniti, F.,

- Carimi, F. (2018) Characterization of *Botrytis cinerea* isolates collected on pepper in Southern Turkey by using molecular markers, fungicide resistance genes and virulence assay. *Infect Genet Evol*, 60: 151–159.
- Ponnappan, N., Budagavi, D.P., Yadav, B.K., Chugh, A. (2015) Membrane Active Peptides from marine organisms: Antimicrobials, cell-penetrating peptides and peptide toxins: Applications and prospects. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 7: 75–89.
- Ponzoni, F.J., Shimabukuro, Y.E. (2007) *Sensoriamento remoto no estudo da vegetação*. São José dos Campos, Parêntese Editora. 135p.
- Pozzobon, M.T., Schifino-Wittmann, M.T., Bianchetti, L.D.B. (2006) Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do $x=12$ and $x=13$ represent two evolutionary lines? *Bot J Linn Soc*, 151: 259–269.
- Productores de Hortalizas. (2004) Plagas y enfermedades de chiles y pimientos. Guía de identificación y manejo. México. Disponível em: <http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Pepper_Spanish.pdf>. Acesso em 18/12/2019.
- Raza, S-e-A., Prince, G., Clarkson, J.P., Rajpoot, N.M. (2015a) Automatic detection of diseased tomato plants using thermal and stereo visible light images. *PLoS One*, 10(4):e0123262.
- Raza, S-e-A., Sanchez, V., Prince, G., Clarkson, J., Rajpoot, N.M. (2015b) Registration of thermal and visible light images using silhouette extraction. *Pattern Recognit*, 48: 2119–2128.
- Raza, S-e-A., Smith, H.K., Clarkson, G.J.J., Taylor, G., Thompson, A.J., Clarkson, J., Rajpoot, N.M. (2014) Automatic detection of regions in spinach canopies responding to soil moisture deficit using combined visible and thermal imagery. *PLoS One*, 9(6):e97612.
- Reddy, K.V.R., Yedery, R.D., Aranha, C. (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents*, 24: 536–547.

- Rêgo, E.R., Finger, F.L., Rêgo, M.M. (2011) *Produção genética e melhoramento de pimentas (Capsicum spp.)* Areia-PB, 54p.
- Reifschneider, F.J.B. (2000) *Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil*. Brasília: EMBRAPA, 113p.
- Ren, S., Chen, X., An, S. (2017) Assessing plant senescence reflectance index-retrieved vegetation phenology and its spatiotemporal response to climate change in the Inner Mongolian Grassland. *Int J Biometeorol*, 61(4): 601–612.
- Ribas, P.P., Matsumura ATS. (2009) A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e ensino. *Revista Liberato*, 10(14): 149–158.
- Ribeiro, S.F., Da Cunha, A.O., Rodrigues, M., Melo, V.M., Vasconcelos, I.M., Melo, E.J.T., Cruz, L.P., Gomes, V.M. (2007) Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicom*, 50: 600–611.
- Rodrigues, R., Leal, N.R., Pereira, M.G., Lam-Sánchez, A. (1999) Combining ability of *Phaseolus vulgaris* L. for resistance to common bacterial blight. *Genet Mol Biol*, 22(4): 571–575.
- Rodrigues Neto, J., Malavolta Júnior, V.A., Victor, O. (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathol*, 12(1-2):16p.
- Romanazzi, G., Feliziani, E. (2014). *Botrytis cinerea* (Gray mold). In: Bautista-Baños, S. (ed.) *Postharvest Decay: Control Strategies*. Academic Press, Elsevier Inc.: London, UK, p. 131–146.
- Rouse, J.W., Haas, R.H., Schell, J.A., Deering, D.W. (1974) Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS. Proceedings, Third Earth Resources Technology Satellite-1 Symposium. Greenbelt: NASA SP-351, p. 301– 317.
- Sacchi, H., De Melo, A.M.T., Colariccio, A. (2003) Reação de progênies de pimentão ao *Potato virus Y*. *Bragantia*, 62(1): 53–60.
- Sandmann, M., Grosch, R., Graefe, J. (2018) The use of features from

- fluorescence, thermography, and NDVI imaging to detect biotic stress in lettuce. *Plant Dis*, 102(6): 1101–1107.
- Sankaran, S., Mishra, A., Ehsani, R. Davis, C. (2010) A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Comput Electron Agric*, 72: 1–13.
- Santos, I.S., Carvalho, A.O., Souza-Filho, G.A., Nascimento, V.V., Machado, O.L.T., Gomes, V.M. (2010) Purification of a defensin isolated from *Vigna unguiculata* seeds, its functional expression in *Escherichia coli*, and assessment of its insect α -amylase inhibitory activity. *Protein Expr Purif*, 71: 8–15.
- Santos, J.B., Gavilanes, M.L. (2008) Botânica. In: Vieira, C., Paula júnior, J., Borém. A. (eds.) *Feijão*. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, p.41–66.
- Santos, L.A., Taveira, G.B., Ribeiro, S.F.F., Pereira, L.D.S., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Oliveira, A.E.A., Machado, O.L.T., Araujo, J.D.S., Vasconcelos, I.M., Gomes, V.M. (2017) Purification and characterization of peptides from *Capsicum annuum* fruits which are alpha-amylase inhibitors and exhibit high antimicrobial activity against fungi of agronomic importance. *Protein Expr Purif*, 132: 97–107.
- Sartorato, A., Rava, C.A. (1994) Mancha-angular. In: Sartorato, A., Rava, C.A. (eds.) *Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. Brasília: EMBRAPA, p. 41–68.
- Schägger, H., Von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166: 368–379.
- Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A., Dicke, M. (2005) *Insect-plant biology*. Oxford University Press, Oxford, 440p.
- Scorciapino, M.A., Serra, I., Manzo, G., Rinaldi, A.C. (2017) Antimicrobial dendrimeric peptides: structure, activity and new therapeutic applications. *Int J Mol Sci.*, 18, 542.
- Shaner, G., Finney, R.F. (1977) The effects of nitrogen fertilization on the

- expression of slow-mildewing in knox wheat. *Phytopathology*, 70: 1183–1186.
- Shi, C., Yu, K., Xie, W., Perry, G., Navabi, A., Pauls, K.P., Miklas, P.N., Fourie, D. (2012) Development of candidate gene markers associated to common bacterial blight resistance in common bean. *Theor Appl Genet*. 125(7): 525–1537.
- Shi, C., Navabi, A., Yu, K. (2011) Association mapping of common bacterial blight resistance QTL in Ontario bean breeding populations. *BMC Plant Biol*, 11: 52.
- Shtienberg, D., Elad, Y., Ariela, N., Nitzani, Y., Kirshner, B. (1998) Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. *Eur J Plant Pathol*, 104(8): 753–763.
- Silano, V., Furia, M., Gianfreda, L., Macri, A., Palescandolo, R., Rab, A., Scardi, V., Stella, E., Valfre, F. (1975) Inhibition of amylases from different origins by albumins from the wheat kernel. *Biochim Biophys Acta*, 391: 170–178.
- Silva, A.J., Canteri, M.G., Santiago, D.C., Hikishima, M, Silva, A.L. (2009) A refletância na estimativa do efeito de fungicidas no controle da ferrugem asiática da soja. *Summa Phytopathol*, 35: 53–56.
- Silva, H.T. (2011a) *Agência de Informação Embrapa: Feijão - Morfologia*. Disponível em: <<http://migre.me/7qC7v>>. Acesso em 07/11/2016.
- Silva, J.B.C., Giordano, L.B. (2000) *Tomate para processamento industrial*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia - Embrapa Hortaliças, 168p.
- Silva, L.B., Sales, M.P., Oliveira, A.E.A., Machado, O.L.T., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J. (2004) The seed coat of *Phaseolus vulgaris* interferes with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F) (Coleoptera: Bruchidea)]. *An Acad Bras Ciênc*, 76: 57–65.
- Silva, N.C.M., Conceição, J.G., Ventury, K.E., De Sá, L.F.R., Oliveira, E.A.G., Santos, I.S., Gomes, V.M., Costa, M.N., Ferreira, A.T.S., Perales, J., Xavier-Filho, J., Fernandes, K.V.S., Oliveira, A.E.A. (2018) Soybean seed coat chitinase as a defense protein against stored product pest *Callosobruchus*

- maculatus*. *Pest Manag Sci*, 74: 1449–1456.
- Silva, N.C.M., De Sá, L.F.R., Oliveira, E.A.G., Costa, M.N., Ferreira, A.T.S., Perales, J., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J., Oliveira, A.E.A. (2016) *Albizia lebbek* seed coat proteins bind to chitin and act as a defense against cowpea weevil *Callosobruchus maculatus*. *J Agr Food Chem*, 64: 3514–3522.
- Silva, O.N., Mulder, K.C., Barbosa, A.A., Otero-Gonzales, A.J., Lópes-Abarrategui, C., Dias, S.C., Rezende, T.M., Franco, O.L. (2011b) Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. *Front Microbiol*, 2, 232.
- Silva, S.M., Koehnlein, E.A., Bracht, A., Castoldi, R., Morais, G.R, Baesso, M.L., Peralta, R.A., Souza, C.G.M., Sá-Nakanishi, A.B., Peralta, R.M. (2014) Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. *Food Res Int*, 56: 1–8.
- Singh, A., Ganapathysubramanian, B., Singh, A.K., Sarkar, S. (2016) Machine learning for high-throughput stress phenotyping in plants. *Trends Plant Sci*, 21: 110–124.
- Singh, S.P. (2001) Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. *Crop Sci*, 41(6): 1659–1675.
- Singh, S.P., Gepts, P., Debouck, D.G. (1991) Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Econ Bot*, 45: 379–396.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Malia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150: 76–86.
- Smith, R.C.G., Adams J., Stephens, D.J., Hick, P.T. (1995) Forecasting wheat yield in a Mediterranean-type environment from the NOAA satellite. *Aust J Agr Res*, 46: 113–125.
- Southgate, B.J. (1979) Biology of the Bruchidae. *Ann Ver Entomol*, 24(1): 449–473.

- Sousa, A.H., Maracajá, P.B., Silva, R.M.A., Moura, A.M.N., Andrade, W.G. (2005) Bioactivity of vegetal powders against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) in caupi bean and seed physiological analysis. *Rev Biol Ciênc Terra*, 5(2): 1519–5228.
- Souza, A.J., Ferreira, A.T.S., Perales, J., Beghini, D.G., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J., Venancio, T.M., Oliveira, A.E.A. (2012) Identification of Albizia lebbeck seed coat chitin-binding vicilins (7S globulins) with high toxicity to the larvae of the bruchid *Callosobruchus maculatus*. *Braz J Med Biol Res (Impresso)*, 45: 118–124.
- Souza, A.J., Santos, P.O., Pinto, M.S.T., Wermelinger, T.T., Ribeiro, E.S., Souza, S.C., Deus, M.F., Souza, M.C., Xavier-Filho, J., Fernandes, K.V.S., Oliveira A.E.A. (2011) Natural seed coats provide protection against penetration by *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. *Crop Protection*, 30: 651–657.
- Souza, C.V., Lorenzi, H. (2012) *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III*. 3ª ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa-SP, 768p.
- Souza, M.F.M., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Sudré, C.P. (2008) Resistance to *Xanthomonas* spp. in tomato: diallel analysis and gene effects estimative in a breeding programme carried out in Brazil. *J Phytopathol*, 156(11): 660–667.
- Staneva, E. (1982) A study of bean seed beetle *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera, Bruchidae) nutrient plants. *Plant Sci*, 4: 111–119.
- Steddom, K., Heidel, G., Jones, D., Rush, C.M. (2003) Remote detection of Rhizomania in sugar beet. *Phytopathology*, 93: 720–726.
- Stout, M.J. (2013) Reevaluating the conceptual framework for applied research on host-plant resistance. *Insect Sci*, 20: 263–272.
- Sudré, C.P., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Riva-Souza, E.M., Bento C.S. (2010) Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis.

Genet Mol Res, 9(1): 283–294.

- Terras, F.R.G., Torrekens, S., Van Leuven, F., Osborn, R.W., Vandeleyden, J., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F. (1993) A new family of basic cysteine-rich plant anti fungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett*, 316: 233–240.
- Thung, M., Sartorato, A. (2002) Alteração na ordem de importância das doenças do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) devido a mudanças nas práticas culturais e na preferência do tipo de grão no Brasil. In: Sartorato, A., Thung, M. (eds.) *Memórias da participação brasileira no "I Taller Internacional sobre la mancha angular del fríjol"*. Santo Antônio de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão, 101p.
- Tofoli, J.F., Ferrari, J.T., Domingues, R.J., Nogueira, E.M.C. (2011) *Botrytis* sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. *Biológico*, 73(1): 11–20.
- Towbin, J., Stehelin, T., Gordon, J. (1979) Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76: 4350–4352.
- Trindade, R.S., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Goncalves, L.S.A., Viana, J. M.S., Sudré, C.P. (2015) Combining ability for common bacterial blight resistance in snap and dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Sci Agron*, (37): 37–43.
- Vadivambal, R., Jayas, D.S. (2011) Applications of thermal imaging in agriculture and food industry—A review. *Food Bioproc Tech*, 4: 186–199.
- Vale, F.X.R., Jesus Júnior, W.C., Zambolim, L. (2004a) *Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas*. Belo Horizonte: Editora Perfil, 531p.
- Vale, F.X.R., Zambolim, L., Zambolim, E. M., Alvarenga, M.A.R. (2004b) Manejo integrado das doenças do tomateiro: Epidemiologia e controle. In: Alvarenga, M.A.R. (ed.) *Tomate: Produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia*. Lavras, MG: UFLA, Cap.9, p. 213–308.

- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, 44: 135-162.
- Viecelli, C.A., Stangarlin, J.R., Kuhn, O.J., Schwan-Estrada, K.R.F. (2010) Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. *Summa Phytopathol*, 36(1): 73–80.
- Vieira, C. (1967) *O feijão-comum: cultura, doenças e melhoramento*. Ed. Viçosa, MG: UFV, 220p.
- Vieira, C., Borém, A., Ramalho, M.A.P. (2005) *Melhoramento de Feijão*. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 969p.
- Viñals, F.N., Ortega, R.G., Garcia, J.C. (1996) *El cultivo de pimientos, chiles y ajies*. Madrid: Mundi-Prensa, 607p.
- Viswanathan, R., Mohanraj, D., Padmanaban, P. (2000) Possible involvement of anthocyanin compounds in resistanc of sugarcane against red rot. *Indian Phytopathol*, 53(3): 311–313.
- Wang, M., Ling, N., Dong, X., Zhu, Y., Shen, Q., Guo, S. (2012) Thermographic visualization of leaf response in cucumber plants infected with the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Plant Physiol Bioch*, 61: 153–61.
- Wang, Y., Yu, T., Xia, J., Yu, D., Wang, J., Zheng, X.D. (2010) Biocontrol of postharvest gray mold of cherry tomatoes with the marine yeast *Rhodosporidium paludigenum*. *Biol Control*, 53: 178–182.
- Wen, D.M., Chen, M.X., Zhao, L., Ji, T., Li, M., Yang, X.T. (2019) Use of thermal imaging and fourier transform infrared spectroscopy for the pre-symptomatic detection of cucumber downy mildew. *Eur J Plant Pathol*, 155: 405–416.
- Williams, J.O. (1980). Note on bruchidae associated with stored products in Nigeria. *Tropical Grain Legume Bulletin*, 26: 5–10.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, J.A. (2007) *Botrytis*

- cinerea*: the cause of gray mold disease. *Mol Plant Pathol*, 8: 561–580.
- Wit, P.J.G.M. (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves cellular and molecular. *Life Sciences Switzerland*, 64: 2726–2732.
- Wójtowicz, M., Wójtowicz, A., Piekarczyk, J. (2016) Application of remote sensing methods in agriculture. *Commun Biometry Crop Sci*, 11: 31–50.
- Wong, J.H., Zhang, X.Q., Wang, H.X., Ng, T.B. (2006) A mitogenic defensin from white cloud beans (*Phaseolus vulgaris*). *Peptides*, 27: 2075–2081.
- WPTC (2017) Word Processing Tomato Council. Banco de dados. Monteux: WPTC. Disponível em: < www.wptc.to >. Acesso em: 03/01/2020
- Xavier-Filho, J. (1993) *Sementes e suas defesas contra insetos*. Fortaleza, CE: UFCA, 31p.
- Ye, X.Y., Ng, T.B., Rao, P.F. (2001) A Bowman-Birk-trypsin-chymotrypsin inhibitor from broad beans. *Biochem Biophys Res Commun*, 289: 91–96.
- Yokoyama, L.P. (2002) *Tendências de mercado e alternativas de comercialização do feijão*. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA-CNPAP (EMBRAPA-CNPAP. Comunicado Técnico, 43), 4p.
- Zhang, L., Van Kan, J.A.L. (2013) *Botrytis cinerea* mutants deficient in d-galacturonic acid catabolism have a perturbed virulence on *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*, but not on tomato. *Mol Plant Pathol*, 14: 19–29.
- Zhang, M., Qin, Z., Liu, X., Ustin, S.L. (2003) Detection of stress in tomatoes induced by late blight disease in California, USA, using hyperspectral remote sensing. *Int J Appl Earth Obs*, 4(4): 295–310.
- Zottich, U., Da Cunha, M., Carvalho, A.O., Dias, G.B., Silva, N.C.M., Santos I.S., Nascimento, V.V., Miguel, E.C., Machado, O.L.T., Gomes V.M. (2011) Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. *Biochim Biophys Acta (BBA)*, 4: 375–383.