

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E
BIOLÓGICAS EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**COMPARAÇÃO ENTRE MARCADORES ERIC, BOX E
VNTRs VISANDO ESTUDOS POPULACIONAIS
DE *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, AGENTE CAUSAL
DA BACTERIOSE DA MANDIOCA**

Laís Barreto de Oliveira

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2018**

**COMPARAÇÃO ENTRE MARCADORES ERIC, BOX E VNTRs
VISANDO ESTUDOS POPULACIONAIS DE *Xanthomonas
phaseoli* pv. *manihotis*, AGENTE CAUSAL DA BACTERIOSE DA
MANDIOCA**

Laís Barreto de Oliveira

Licenciada em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Claudia Fortes Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**COMPARAÇÃO ENTRE MARCADORES ERIC, BOX E VNTRs
VISANDO ESTUDOS POPULACIONAIS DE *Xanthomonas
phaseoli* pv. *manihotis*, AGENTE CAUSAL DA BACTERIOSE DA
MANDIOCA**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação

Laís Barreto de Oliveira

Aprovado em 17 de dezembro de 2018

Dr^a. Claudia Fortes Ferreira

Embrapa Mandioca e Fruticultura – CNPMF

(Orientador)

Dr^a. Thamyres Silveira

Instituto Federal do Norte de Minas Gerais – IFNMG

(Examinador Externo)

Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

(Examinador Interno)

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Laís Barreto de

Comparação entre marcadores eric, box e vntrs visando estudos populacionais de *Xanthomonas phaseoli* PV. *manihotis*, agente causal da bacteriose da mandioca. – Cruz das Almas, BA, 2018.

54 f. il.; 30 cm.

Orientador: Profa. Dra. Claudia Fortes Ferreira.

Coorientador: Prof. Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)-
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2018.

1. Mandioca. 2. Marcador molecular. 3. Doença de planta I. Ferreira, Janay Almeida dos. II. Oliveira, Saulo Alves Santos de. III. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia IV. Título.

CDD: 633.682

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Rita e Melquiades** que fizeram e fazem de tudo por mim. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida. Dedico a vocês cada pequena e grande vitória. Não é fácil, mas por vocês, busco todas minhas forças para continuar.

Aos meus irmãos, **Larah e Lucca**, que mesmo de longe, enchem meus dias de alegria. Amo vocês.

À toda **minha família** pelo apoio e orações.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser minha luz, por me amar e me dar a vida. Por ser minha força e por nunca me abandonar, principalmente nesse período onde em vários momentos minha fé foi testada.

Aos meus pais, Rita e Melquiades, por estarem sempre comigo, me apoiando nas minhas escolhas, por todo amor e cuidado, carinho, por ter feito o que podiam e não podiam para me dar uma boa educação. É por vocês que continuo trilhando esse caminho, em busca do melhor para nós.

Aos meus irmãos, que mesmo com toda correria, ausência, demonstram todo amor, conseguem fazer eu mostrar minha melhor versão. Eu amo tanto vocês e agradeço a Deus por tê-los em minha vida.

A minha grande família, que sempre acreditou em meu potencial, que sempre orou por mim, que sempre esteve ao meu lado, se preocuparam muito, mas que me deram muita força. Muito obrigada às minhas avós, lindas e maravilhosas, minhas tias, meus tios, primos e primas. Vocês são demais. Amo vocês.

Aos meus amigos e amigas, que sei que não foi fácil entender minhas ausências e faltas, mas que a cada reencontro me sentia fortalecida, eu amo vocês.

Ao meu namorado, Lucas Estrela, que foi uma das pessoas que não deixou eu desistir, que acompanhou mais de perto todo meu esforço, suportou meus estresses, minhas crises, que me deu colo e muito amor. Eu te amo.

A minha orientadora Claudia Fortes Ferreira e co-orientador Saulo Alves de Oliveira, por todos os ensinamentos, compreensão, e ajuda para a concretização desse trabalho.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, por fazer parte deste programa de Pós-Graduação.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, por fornecer o espaço para a realização desse trabalho.

Ao Laboratório de Fitopatologia, pela infraestrutura concedida na parte inicial do meu trabalho. Ao pessoal que esteve comigo me ajudando, especialmente Dani, Danilo, Bruno, Cris, Selma.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, que foi onde permaneci até a finalização da pesquisa. À toda equipe, pelos momentos de risadas, conversas, em especial, Vandeson, Seu Raimundo e Andresa por todo apoio, ajuda, dedicação para fazer tudo dar certo e pelo incentivo e força a todo tempo.

A todos que torceram por mim, fizeram orações, que acreditaram, que incentivaram, meu muito obrigada.

EPÍGRAFE

*“ O céu não é o limite. A sua mente é o limite.
Os piores monstros não estão lá fora, eles vivem em nós.”*

(Autor desconhecido)

COMPARAÇÃO ENTRE MARCADORES ERIC, BOX E VNTRs VISANDO ESTUDOS POPULACIONAIS DE *Xanthomonas phaseoli* PV. *manihotis*, AGENTE CAUSAL DA BACTERIOSE DA MANDIOCA

RESUMO: A espécie *Manihot esculenta* Crantz, pertence à família Euphorbiaceae, que engloba plantas com porte arbóreo, arbustivo ou herbáceo. A mandioca é uma das culturas que mais se destaca na economia mundial. No entanto, apesar da sua importância, a mandioca é afetada por vários fatores bióticos e abióticos. Dentre os principais fatores bióticos, destaca-se a bacteriose, causada pela bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*). Essa doença é capaz de infectar toda a parte aérea da planta, incluindo folhas e hastes, afetando a planta em qualquer estágio do seu desenvolvimento e limitando a produção, onde a principal forma de controle é o uso de cultivar resistente. O crescente aumento da ocorrência desta doença em países da América Latina e África, vem ocasionando grandes perdas em lavouras. Sabe-se que a durabilidade da resistência depende de fatores como, a diversidade do hospedeiro, bem como a diversidade e a dinâmica das populações do patógeno. Portanto, uma melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade de *Xpm*, em nível molecular, bem como um estudo populacional mais abrangente são necessários. Sendo assim, o principal objetivo do trabalho foi avaliar a estrutura populacional de *Xpm* proveniente de principais áreas produtoras, com base em Rep-PCR: marcadores ERIC e BOX, e a técnica VNTR, de forma a auxiliar o melhor manejo da doença e sustentabilidade do sistema produtivo da mandioca.

Palavras-Chaves: *Manihot esculenta*; Estudo populacional; CBB; Marcadores moleculares; Patógeno.

**COMPARISON BETWEEN ERIC, BOX AND VNTRs IN POPULATION STUDIES
OF *Xanthomonas phaseoli* PV. *manihotis*, THE CAUSAL AGENT OF
BACTERIOSIS IN CASSAVA**

ABSTRACT: *Manihot esculenta* Crantz species belongs to the Euphorbiaceae Family, which encompass plants with arboreal stature, shrubs or are herbaceous. Cassavas play an important role in the worldwide economy. However, like many other crops, it is affected by various biotic and abiotic factors. Among the biotic factors, cassava bacterial blight (CBB), caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), is the main disease. *Xpm* infects all the aerial part of the plant, including leaves and stems at any stage of the development of the plant limiting production, where main control is by resistant cultivars. Increasing bacteriosis in Africa and Latin America has led to great losses in cassava harvest. It is well known that resistance durability depends on factors such as host diversity as well as diversity and dynamics of populations of the pathogen. Hence, better comprehension of the mechanisms of *Xpm* pathogenicity at a molecular level as well as broader population studies are necessary. Therefore, the main objective of the present work was to evaluate the population structure of *Xpm* in main production areas using Rep-PCR – ERIC, BOX and VNTR markers for better disease management and sustainability of the cassava production sector.

Key-words: *Manihot esculenta*; Population study; CBB; Molecular markers; Pathogen.

SUMÁRIO

	Págs
INTRODUÇÃO	10
Aspectos gerais.....	10
Bacteriose da mandioca.....	11
Análises moleculares relacionadas a fitopatógenos.....	14
Melhoramento genético da mandioca.....	16
Referências.....	18
CAPÍTULO 1	27
Introdução.....	30
Materiais e Métodos.....	31
Resultados e discussão.....	36
Conclusão.....	48
Referências.....	50

INTRODUÇÃO

Aspectos gerais

A mandioca pertence à classe Magnoliopsida, ordem Malpighiales, família Euphorbiaceae e ao gênero *Manihot* Mill (CORDEIRO et al, 2013; ZHOU et al, 2016). A maioria dos membros desta família são ervas e alguns arbustos ou árvores, que crescem continuamente com dois períodos alternados, um para crescimento e outro para armazenamento de carboidratos em suas raízes tuberosas; sendo que estes períodos são seguidos por um intervalo de dormência (ALVES, 2002; ZHOU et al, 2016).

A mandioca é uma das raízes mais prestigiadas no mundo. De acordo com a FAO (2018), no ano de 2016, a produção mundial de mandioca ganhou destaque, exibindo sucessivo crescimento, com registro de pouco mais de 277 milhões de toneladas de raiz, destacando-se a Nigéria (57 milhões de toneladas) como maior produtora de mandioca de todos os países africanos, seguido por Tailândia e Indonésia (CONAB; CEPEA 2018).

O gênero *Manihot* inclui aproximadamente 98 espécies distribuídas em todo o mundo (ROGERS e APPAN, 1973) onde *Manihot esculenta* Crantz, é a única espécie do gênero que é cultivada e possui relevância econômica (OLSEN et al, 2004). No Brasil são encontradas 78 espécies, de acordo com Cordeiro et al. (2013), das quais 67 são endêmicas.

Estudos taxonômicos sobre esse gênero são escassos (DA SILVA et al., 2017) e a denominação do centro de origem foi tida como controversa durante vários anos. Entretanto, há alguns anos, esse centro foi atribuído à América Latina, onde a mandioca tem sido cultivada pela população indígena há pelo menos 4 mil anos (OLSEN e SCHAAL, 1999, 2001; ROA et al., 2000; OLSEN et al, 2004; NASSAR e ORTIZ, 2009; AKINPELU, 2011).

Estudos moleculares apontaram que a mandioca se originou nas terras tropicais, ao longo da margem sul da bacia amazônica, a fronteira da floresta tropical e a savana, onde a luz solar, o calor e a chuva, são abundantes, e intervalos de seca são reduzidos (LÉOTARD et al, 2009; ZHOU et al, 2016). A domesticação resultou em cultivares de mandioca com boas características, incluindo um alto acúmulo de biomassa, alto rendimento de amido e tolerância à seca (ZHOU et al, 2016).

A mandioca é uma espécie diploide ($2n = 36$), altamente heterozigótica,

alógama e de propagação vegetativa por meio de estacas, podendo ocorrer autofecundação (HALSEY et al., 2008). A propagação assexuada pode manter a heterose, além de permitir a geração de populações experimentais e descoberta de genes com características importantes para o cultivo (FREGENE e POUNTI-KAERLAS, 2002).

O ciclo de vida geralmente é de 8 a 10 meses entre plantio e colheita, sendo considerado muito mais curto que o da maioria outras espécies de plantas tropicais, especialmente as plantas lenhosas das florestas tropicais (HALSEY et al., 2008; DOUST, 2009). A mandioca é muito importante para a segurança alimentar de países em desenvolvimento, e é considerada a terceira maior fonte de carboidratos do mundo (PLUCKNETT et al., 1998; PINWEHA et al., 2015).

A espécie é cultivada em muitos países devido ao seu crescimento eficiente, disponibilidade durante todo o ano, maior tolerância a estresses abióticos, quando comparada com outras culturas comerciais, e sua adequação a ser incorporada aos tradicionais sistemas agrícolas de insumos (KUIPER et al., 2007).

Existem diferentes formas de uso da mandioca, sendo a farinha, seu principal produto, onde pode ser utilizada no preparo de pão, biscoitos, confeitaria, massas, cuscuz, produtos similares e na produção de adesivos (CARDOSO et al., 2017). Além do seu uso na culinária nacional, é utilizada também na composição de diferentes produtos industriais, constituindo matéria-prima da indústria alimentícia, têxtil, farmacêutica, química, produção de biocombustível e ração animal, devido à sua raiz enriquecida com amido (FU et al, 2016).

No Brasil, o cultivo da mandioca ocupa uma área de aproximadamente 2,2 bilhões de hectares com produção de aproximadamente 20 bilhões de toneladas (IBGE, 2018). A mandioca é produzida em todas as regiões, destacando-se a Região Nordeste como a principal produtora com mais de 37% da área cultivada (519 mil ha) (IBGE, 2018). Com uma produção de 21 milhões de toneladas, o Brasil ocupa o 4º lugar, dentre os maiores produtores mundiais de raiz de mandioca (CONAB, 2018).

Bacteriose da mandioca

Vários fatores bióticos como doenças, insetos e ácaros, e abióticos, como a deterioração fisiológica pós-colheita e o déficit hídrico, dentre outros, influenciam o crescimento, desenvolvimento, reprodução e produtividade de diversas culturas

(BANITO et al. 2010; CARABALÍ et al., 2010; AKINBO et al., 2012; MATOS et al., 2018). Apesar de a mandiocultura ser geralmente cultivada em regiões propensas à seca e em solos de baixa fertilidade, como em solos alcalinos ou ácidos, um período de seca prolongada pode afetar diretamente a produção (CEBALLOS, 2012).

Muitas doenças vêm causando prejuízos econômicos na cultura da mandioca em vários locais do mundo, como no continente Africano, na Índia e em algumas regiões da América Latina e do Caribe, fazendo com que as raízes se tornem comercialmente inutilizáveis (LOZANO e BOOTH, 1974; CEBALLOS, 2012; RUBIO et al., 2017). No Brasil, destacam-se, a podridão radicular (*Phytophthora*, *Sclerotium*, *Lasiodiplodia*, *Neoscytalidium* e *Fusarium*), a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), o superalongamento (*Sphaceloma manihoticola*), o superbrotamento (*Cassava frogskin disease*), as viroses (*Cassava vein mosaic vírus*) e a bacteriose (*Xanthomonas phaseoli*) (SANTIAGO et al.; MEDINA, 2018).

A bacteriose da mandioca foi descrita pela primeira vez no Brasil por Bondar (1912), no Estado de São Paulo. É causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Xpm) (Sin= *X. axonopodis* pv. *manihotis*), um bastonete Gram-negativo e intimamente relacionado com bactérias que causam doenças em outras culturas, como citros, tomate e pimenta (VAUTERIN et al., 1995; BANITO et al. 2010; LÓPEZ e BERNAL, 2012).

A ocorrência desta doença vem aumentando de forma considerável ao longo dos anos e seu caráter destrutivo é um fator limitante da produção em diversos países da América Latina e da África (VERDIER et al., 2004; MELO et al., 2018; MBARINGONG et al., 2017), onde as perdas causadas por Xpm podem atingir 100% a depender da variedade e condições edafoclimáticas (MOSES et al., 2008). No Brasil, esta doença vem ocasionando grandes perdas em lavouras, principalmente no eixo Centro-Sul, englobando os estados de Mato Grosso, São Paulo e Paraná, no Distrito Federal, e Região Norte e Nordeste (ISHIDA et al., 2016).

É uma doença extremamente destrutiva, principalmente em países da América do Sul e na África, que reduz a produtividade tanto de forma direta, pela destruição da parte aérea da planta (folhas, pecíolos e hastes), como indireta, pela redução na produção de manivas utilizadas na propagação vegetativa da mandioca (VAUTERIN et al., 1995; SANCHEZ et al., 1999; FANOU et al., 2018).

A bactéria, uma vez presente na planta, faz com que as manivas sirvam como fonte de inóculo primário para os ciclos de cultivo seguintes, já que Xpm, também

infecta a haste e o sistema vascular (VAUTERIN et al., 1995; MIURA e MONTEIRO, 1997; VERDIER et al., 1998; KEMP et al., 2004; MASSOLA e BEDENDO, 2005).

Os sintomas mais característicos da doença causada pela *Xpm*, são a requeima das folhas, incluindo a mancha-angular, anasarca, murcha (Figura 1), requeima das folhas afetadas exsudação de goma, necrose das hastes e tombamento (DEDAL et al., 1980; TRUJILLO et. al, 2014; MUTKA et al., 2016; MARTIN et al., 2017; MEDINA et al., 2018) (Fig. 1). A dispersão do patógeno pode ocorrer dentro do campo por meio do impacto das gotas de chuva e/ou por meio do contato entre folhas de plantas vizinhas (CEBALLOS, 2012), sendo que a disseminação da doença a longa distância, ocorre via manivas, oriundas de plantas doentes (KEMP et al., 2004).



Figura 1 (A e B): A) Sintomas de *Xpm* nas folhas após 10 dias de inoculação da bactéria e B) após 16 dias de inoculação.

Na primeira fase da colonização das plantas, as bactérias são epífitas, sendo encontradas em superfícies foliares. Em seguida, penetram o mesofilo das folhas e invadem o sistema vascular. A resistência da planta hospedeira é principalmente expressa durante esta segunda fase (JORGE et al., 2001).

A estratégia de controle mais eficiente da bacteriose é a utilização de cultivares resistentes. A diferença entre variedades resistentes e suscetíveis é expressa como uma variação na taxa de colonização de *Xpm* dos tecidos vasculares. Por esta razão, a resistência é geralmente considerada de caráter quantitativa (KPÉMOUA et al., 1996; VERDIER et al., 2004; FUKUDA, 2006; LÓPEZ e BERNAL, 2012).

Entretanto, existem poucas cultivares de mandioca disponíveis com algum grau de resistência à *Xpm*, havendo a necessidade da busca por fontes de resistência que possam ser utilizadas nos programas de melhoramento da mandioca. O conhecimento

dos fatores determinantes que desencadeiam a doença é fundamental para que as estratégias de controle tenham sucesso, além de servirem de base para o manejo integrado da doença e sustentabilidade do sistema de produção da mandioca (MIURA e MONTEIRO, 1997; SANCHEZ et al., 1999; FUKUDA, 2006; LÓPEZ e BERNAL, 2012; PERUCH et al., 2013; TATIS, 2018).

Análises moleculares relacionadas a fitopatógenos

A cultura da mandioca possui alta variabilidade genética, favorecendo o melhoramento genético (NASSAR e GRATTAPAGLIA, 1986; DA CUNHA, 2011). Uma das ferramentas mais utilizadas para se compreender os genomas, são os marcadores moleculares, visto que identificam pontualmente os polimorfismos de DNA, não são influenciados pelo ambiente e não dependem do tecido ou das fases de desenvolvimento da planta que se deseja estudar (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 2008; DA CUNHA, 2011).

A tecnologia de marcadores moleculares é uma ferramenta eficiente para a caracterização, gerenciamento de recursos genéticos, programas de melhoramento de culturas e avaliação da diversidade genética dentro e entre espécies (MATSUMURA et al, 2015). A estimativa da diversidade genética como critério para seleção de genitores em programas de melhoramento é descrita por vários autores (DIAS e KAGEYAMA, 1997; VIDIGAL et al., 1997; RIBEIRO et al., 1999; FERRÃO et al., 2002).

A PCR baseada em elementos repetitivos (Rep-PCR) tem sido amplamente utilizada para estudar os padrões específicos de tensão obtidos a partir da amplificação por PCR de elementos de DNA repetitivos presentes nos genomas bacterianos (STATE et al, 2008; SAVARI et al, 2016). As vantagens da Rep-PCR em relação a outros métodos de análise molecular incluem a capacidade de diferenciar espécies de bactérias estreitamente relacionadas, além de ser um método de genotipagem de alta reprodutividade, ser simples, rápido, barato e confiável (DOMBEK et al, 2000; STEPHENSON et al, 2009).

Dois dos elementos repetitivos utilizados para a análise molecular são os elementos BOX e as sequências do *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC). Os elementos BOX são elementos repetitivos em mosaico, compostos por diferentes combinações de três sequências de subunidades. Estas três sequências de

subunidades são boxA, boxB e boxC com 59, 45 e 50 nucleotídeos de comprimento, respectivamente (OLIVE et al., 1999; MISHRA, 2015). As sequências do ERIC possuem 126 pb de comprimento com uma repetição invertida central altamente conservada. Está situado em regiões transcritas não codantes do cromossomo (WATURANGI et al, 2012).

Sistemas de amplificação baseados em ácido nucléico como a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) são métodos promissores para a rápida identificação de bactérias patogênicas às plantas. A identificação microbiana rápida e precisa é uma parte essencial em qualquer programa de inspeção e pesquisa de patógenos (VANNESTE, 2000; SRINIVASA et al., 2012).

Métodos clássicos para distinguir esses patógenos são baseados em características morfológicas e de crescimento, como o isolamento dessas bactérias patogênicas de plantas doentes ou sementes, seguido de análise morfológica e caracterização bioquímica/fisiológica. A resposta de hipersensibilidade e patogenicidade são os métodos de rotina para detecção e identificação, porém, onerosos (STAMPS et al., 1990; VANNESTE, 2000; SRINIVASA, 2012). Portanto, abordagens moleculares têm sido buscadas como alternativas para uma identificação mais precisa e rápida de fitopatógenos (STAMPS et al., 1990; RESTREPO et al., 2004; SRINIVASA et al., 2012).

Métodos mais recentes, estão sendo cada vez mais aplicados para o diagnóstico de patógenos de plantas e incluem métodos imunológicos, tecnologia de sonda de DNA / RNA e amplificação da PCR de sequências de ácidos nucléicos. Essas técnicas possuem várias vantagens potenciais sobre os métodos convencionais de diagnóstico, pois são mais rápidas e mais precisas (MCCARTNEY et al., 2003; MELO, 2018).

Diversos métodos moleculares têm sido utilizados para avaliar a diversidade e detectar bactérias patogênicas de plantas no intuito de gerar mecanismos eficazes para o controle de doenças (LEUNG et al., 1993; VERDIER et al., 2004; TRINDADE et al., 2005). Tais ferramentas são de fundamental importância para a compreensão da diversidade e dinâmica populacional dos patógenos das plantas. Obter essas informações é um pré-requisito para selecionar fontes de resistência a doenças (MARIANO et al., 2005; MILANESI et al., 2009; TRUJILLO et al., 2014).

Procedimentos foram desenvolvidos para detecção de bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*. Alterações nas condições de PCR de

primers específicos (XV/ XK) para patógenos do gênero, já descritos na literatura, foram feitas, para identificação precisa da *Xpm*. Para isso, Melo et al (2018) utilizaram o iniciador de sentido direto (XV), juntamente com o iniciador reverso modificado (XK_MOD) e validaram o uso desses *primers*.

Vários marcadores moleculares já foram implementados em estudos de populações de *Xanthomonas*: RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), BOX e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VERDIER et al., 1993; RESTREPO E VERDIER, 1997; RESTREPO et al., 1999, 2000; VERDIER et al., 2004; TRINDADE et al., 2005; MEZETTE, 2013; TRUJILLO et al., 2014).

Outras técnicas de genotipagem foram desenvolvidas (AFLP; Multilocus *Sequence Typing* (MLST)), para reduzir o tempo de padronização, bem como reduzir o tempo e custo necessários para obtenção de resultados (CHIOU, 2010; FILLO et al., 2011). Uma dessas técnicas baseia-se no sub-produto do sequenciamento de genomas, o *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR), que fornece dados em um formato simples e não ambíguo baseado no número de sequências repetitivas (GARCIA-YOLDI et al., 2007).

Os VNTRs foram implementados para a genética de população e diversidade de patógenos de plantas, bem como para microrganismos patogênicos, como *Xylella fastidiosa*, *Xanthomonas citri* pv. *citri*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. Os VNTRs permitem identificar a variabilidade que não foi detectada usando outros marcadores moleculares (ARRIETA-ORTIZ et al. 2013; TRUJILLO et al. 2014).

Melhoramento genético da mandioca

O princípio do melhoramento genético de plantas se baseia no aumento da variabilidade genética que já existe mediante cruzamentos controlados, seleção artificial e avaliação dos genótipos selecionados em diferentes ambientes (VIEIRA et al., 2005; LIMA et al., 2018). Sendo assim, os programas de melhoramento genético podem fazer uso de técnicas moleculares para acelerar a introdução de genes importantes que proporcionam características agrônômicas de interesse, como alta produtividade, qualidade e tolerância/resistência aos principais fatores bióticos e abióticos das culturas (HAHN et al., 1989; NASSAR et al., 2009, DE OLIVEIRA, 2012;

CHAVARRIAGA et al., 2016; REY e VANDERSCHUREN, 2017).

Nos programas de melhoramento, a mandioca é selecionada por sua adaptação a zonas edafoclimáticas (ecozonas) que são descritas de acordo com as restrições climáticas, bióticas e abióticas (HERSHEY, 1987). Para a cultura, o melhoramento genético tem progredido em várias linhas, como avaliação de variedades crioulas, coleta e intercâmbio de germoplasma regional e global, recombinação e seleção de clones e uso de espécies silvestres para ampliar a base genética (FARIAS e BELLOTTI, 2006; VILAS BOAS et al., 2015).

A conservação de acessos de *Manihot* garante a preservação do “pool” gênico do grupo e contribui para seu uso pelos programas de melhoramento que visa o desenvolvimento de variedades com alta produtividade e resistentes/tolerantes aos principais fatores bióticos e abióticos que acometem a cultura (PINOTTI et al., 2010; GABRIEL et al., 2014; VILAS BOAS et al., 2015).

Os acessos de *Manihot* são conservados em bancos de germoplasma distribuídos em várias instituições pelo mundo, como no Programa de Recursos Genéticos (PRG) do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), situado na Colômbia, bem como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, no Brasil, que dispõe de sete Bancos Ativos de Germoplasma de mandioca (BAGs), totalizando mais de 3.300 acessos preservados (AZEVEDO e BUSTAMANTE, 2014).

REFERÊNCIAS

- AKINBO, O.; LABUSCHAGNE, M.; FREGENE, M. Introgression of whitefly (*Aleurotrachelus socialis*) resistance gene from F₁ inter-specific hybrids into commercial cassava. **Euphytica**, v.183, p.19-26, 2012.
- AKINPELU, A. O.; AMAMGBO, L. E. F.; OLOJEDE, A. O; OYEKALE, A. S. Health implications of cassava production and consumption. **Journal of Agriculture and Social Research (JASR)**, v. 11, n. 1, 2011.
- ALVES, A. A. C. Cassava botany and physiology. **Cassava: biology, production and utilization**, v. 1, p. 67-89, 2002.
- ARRIETA-ORTIZ, M. L.; RODRÍGUEZ-R, L. M.; PEREZ-QUINTERO, A. L.; POULIN, L.; DIAZ, A. C.; ROJAS, N. A.; BOUREAU, T. Genomic survey of pathogenicity determinants and VNTR markers in the cassava bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strain CIO151. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79704, 2013.
- AZEVEDO, V. C. R.; BUSTAMANTE, P. G. Recursos genéticos de plantas conservados na Embrapa: histórico e inventário atualizado. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, DF, 2014.
- BANITO, A.; KPÉMOUA, K. E.; WYDRA, K. Screening of cassava genotypes for resistance to bacterial blight using strainx genotype interactions. **Journal of Plant Pathology**, p. 181-186, 2010.
- CARABALÍ, A.; BELLOTTI, A. C.; MONTOYA-LERMA, J.; FREGENE, M. *Manihot flabellifolia* Pohl, wild source of resistance to the whitefly *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Hemiptera: Aleyrodidae). **Crop Protection**, v.29, p.34-38, 2010.
- CARDOSO, T.; DEMIATE, I. M.; DANESI, E. D. G. Biodegradable Films with *Spirulina platensis* as Coating for Cambuci Peppers (*Capsicum* sp.). **American Journal of Food Technology**, v. 12, p. 236-244, 2017.
- CEBALLOS, H.; KULAKOW, P.; HERSHEY, C. Cassava breeding: current status, bottlenecks and the potential of biotechnology tools. **Tropical plant biology**, v. 5, n. 1, p. 73-87, 2012.
- CEPEA - **Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada**. Piracicaba, SP. Disponível em <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/mandioca.aspx__> Acesso: agosto 2018.
- CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; BRAND, A.; MEDINA, A.; PRÍAS, M.; ESCOBAR R.; MARTINEZ, J.; DÍAZ, P.; LÓPEZ, C.; ROCA, W.M.; TOHME, J. The potential of using biotechnology to improve cassava: a review. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 52, n. 5, p. 461-478, 2016.
- CHIOU, C. S. Multilocus variable-number tandem repeat analysis as a molecular tool for subtyping and phylogenetic analysis of bacterial pathogens. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 10, n. 1, p. 5-7, 2010.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Mandioca - Análise Mensal-**

Agosto/2018. Disponível em: < https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-mandioca/item/download/22151_f1536f7843af3e6cd8c33c6312e267a7> Acesso em: Agosto. 2018.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; SILVA, M. J. da; SODRÉ, R. C. *Manihot*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17591>>. Acesso: agosto de 2018).

DA CUNHA ALVES, A. A.; MARTINS, M. I. G.; DE MELO, C. A. F.; DE CARVALHO, R. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 9, p. 1082-1088, 2011.

DA SILVA, M. J.; DE SOUZA INOCENCIO, L.; SODRÉ, R. C.; ALONSO, A. A. Morphological and anatomical evidence support a new wild cassava: *Manihot fallax* (Crotonoideae, Euphorbiaceae), from Mato Grosso, Brazil. **PhytoKeys**, n. 91, p. 139-156, 2017.

DE OLIVEIRA, E. J.; DE RESENDE, M. D. V.; DA SILVA SANTOS, V.; FERREIRA, C. F.; OLIVEIRA, G. A. F., DA SILVA, M. S., e AGUILAR-VILDOSO, C. I. Genome-wide selection in cassava. **Euphytica**, v. 187, n. 2, p. 263-276, 2012.

DEDAL, O. I., PALOMAR, M. K., e NAPIERE, C. M. Host range of *Xanthomonas manihotis* Starr. **Annals of Tropical Research**, v. 2, n. 3, p. 149-155, 1980.

DIAS, L.A.S.; KAGEYAMA, P.Y. Multivariate genetic divergence and hybrid performance of cacao (*Theobroma cacao* L.). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, 1997.

DOMBEK, P. E.; JOHNSON, L. K.; ZIMMERLEY, S. T.; SADOWSKY, M. J. Use of repetitive dna sequences and the pcr to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2572-2577, 2000.

DOUST, A. N; KELLOGG, E. A; DEVOS, K. M; BENNETZEN, J. L. Foxtail millet: a sequence- driven grass model system. **Plant Physiology**, v. 149, n. 1, p. 137-141, 2009.

FANOU, A. A.; ZINSOU, A. V.; WYDRA, K. Cassava Bacterial Blight: A Devastating Disease of Cassava. In: **Cassava**. InTech, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.71527>>. Acesso: Julho de 2018.

FAOSTAT. **database**. Disponível em <<http://faostat.fao.org/faostat>>. Acesso em: agosto de 2018.

FARIAS, A.R.N.; BELLOTTI, A.C. Pragas e seu controle. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P.; FUKUDA, W.M.G. **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 591-671, 2006.

FERRÃO, M. A. G.; VIEIRA, C.; CRUZ, C. D.; CARDOSO, A. A. Divergência genética em feijoeiro em condições de inverno tropical. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1089- 1098, 2002.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 2008.

FILLO, S.; GIORDANI, F.; ANNIBALLI, F.; GORGÉ, O.; RAMISSE, V.; VERGNAUD, G.; OLSEN, J. S. Clostridium botulinum group I strains genotyping by 15 loci Multi Locus VNTR Analysis (MLVA). **Journal of clinical microbiology**, p. JCM. 05396-11, 2011.

FREGENE, M.; PUONTI-KAERLAS, J. **Cassava: biology, production and utilization**. CABI, 2002.

FU, L.; DING, Z.; HAN, B.; HU, W.; LI, Y.; ZHANG, J. Physiological Investigation and Transcriptome Analysis of Polyethylene Glycol (PEG)-Induced Dehydration Stress in Cassava: **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 283, 2016.

FUKUDA, C. Doenças e seu controle. **Aspectos socioeconômicos e agrônomicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 433-454, 2006.

GABRIEL, L. F.; STRECK, N. A.; UHLMANN, L. O.; DA SILVA, M. R.; DA SILVA, S. D. Mudança climática e seus efeitos na cultura da mandioca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 18, n. 1, 2014.

GARCÍA-YOLDI, D.; LE FLECHE, P.; DE MIGUEL, M. J.; MUÑOZ, P. M.; BLASCO, J. M.; CVETNIC, Z.; LÓPEZ-GOÑI, I. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with other PCR-based methods for typing Brucella suis isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 12, p. 4070-4072, 2007.

HAHN, S. K.; ISOBA, C. G.; IKOTUN, T. Resistance breeding in root and tuber crops at the International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria. **Crop Protection**, v. 8, n. 3, p. 147-168, 1989.

HALSEY, M.E.; OLSEN, K.M.; TAYLOR, N.J.; CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P. Reproductive biology of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and isolation of experimental field trials. **Crop Science**, v.48, p.49-58, 2008.

HERSHEY, C. H. **Cassava Breeding: A Multidisciplinary Review: Proceedings of a Workshop Held in the Philippines, 4-7 March 1985**. CIAT, 1987.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Rendimento médio, por ano da safra e produto das lavouras**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/188>> Acesso em: 06 agosto 2018.

ISHIDA, A.; CARDOSO, S.; ALMEIDA, C.; NORONHA, A. D. S.; CUNHA, E. Incidência da bacteriose da mandioca (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) no Estado do Pará. **Embrapa Amazônia Oriental-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2016.

JORGE, V.; FREGENE, M.; VÉLEZ, C. M.; DUQUE, M. C.; TOHME, J.; VERDIER, V. QTL analysis of field resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in cassava. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, n. 4, p. 564-571, 2001.

KEMP, B. P.; HORNE, J.; BRYANT, A.; COOPER, R. M. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gumD gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). **Physiological and molecular plant pathology**, v. 64, n. 4, p. 209-218, 2004.

KPÉMOUA, K.; BOHER, B.; NICOLE, M.; CALATAYUD, P. e GEIGER, J.P. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 1131-1143, 1996.

KUIPER, L.; EKMEKCI, B.; HAMELINCK, C.; HETTINGA, W.; MEYER, S.; KOOP, K. Bio-ethanol from Cassava. **Ecofys Netherlands**, p. 1-38, 2007.

LÉOTARD, G., D, A.; KJELLBERG, F.; DOUZERY, E. J.; DEBAIN, C.; DE GRANVILLE, J. J.; MCKEY, D. Phylogeography and the origin of cassava: new insights from the northern rim of the Amazonian basin. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, n. 1, p. 329-334, 2009.

LEUNG, H.; NELSON, Rebeca J.; LEACH, J. E. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. **Advances in plant pathology**, 1993.

LIMA, L. F.; DE SOUZA, D. C.; RESENDE, L. V.; GONÇALVES, W. M. MANEJO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 15, n. 1, p. 109-126, 2018.

LÓPEZ, C.; BERNAL, A. J. Cassava bacterial blight: using genomics for the elucidation and management of an old problem. **Tropical Plant Biology**, v. 5, n. 1, p. 117-126, 2012.

LOZANO, J. C.; BOOTH, R. H. Diseases of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **PANS Pest Articles & News Summaries**, v. 20, n. 1, p. 30-54, 1974.

MARIANO, R. L.; SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. Controle biológico de doenças radiculares. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**, p. 303, 2005.

MARTIN, A. A.; KOUABENAN, A.; ISSA, W.; SEYDOU, T.; MARTIAL, K. F.; BRAHIMA, C.; DAOUDA, K. Assessment of the NECO's Effectiveness against Cassava Bacterial Blight Caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* In Côte D'Ivoire. **Agricultural Research**, v. 12, n. 4, p. 190-198, 2017.

MASSOLA, N.S.; BEDENDO, I.P. Doenças da mandioca. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. et al. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agrônômica Ceres, p.449-456, 2005.

MATOS, V. A.; CRUZ, M. S.; CRESPI, D.; GALATA, R. F.; CARVALHO, A.; BERNARDES, M. S. Propagação da mandioca como um passo para a melhoria da agricultura familiar. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 1, 2018.

MATSUMURA, E. E.; SECCO, V. A.; MOREIRA, R. S.; DOS SANTOS, O. J. A. P.; HUNGRIA, M.; DE OLIVEIRA, A. L. M. Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Annals of microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2187-2200, 2015.

MBARINGONG, G. A.; NYABOGA, E. N.; WANG'ONDU, V.; KANDUMA, E. Evaluation of Selected Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Cultivars Grown in Kenya for Resistance to Bacterial Blight Disease. **World**, v. 5, n. 2, p. 94-101, 2017.

MCCARTNEY, H. A.; FOSTER, S. J.; FRAAIJE, B. A.; WARD, E. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 59, n. 2, p. 129-142, 2003.

MEDINA, C. A.; REYES, P. A.; TRUJILLO, C. A.; GONZALEZ, J. L.; BEJARANO, D. A.; MONTENEGRO, N. A.; BERNAL, A. The role of type III effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in virulence and suppression of plant immunity. **Molecular plant pathology**, v. 19, n. 3, p. 593-606, 2018.

MELO, R. de C. C.; BRAGANÇA, C.; NOGUEIRA P. K.; SILVA, H.; FERREIRA, C.; OLIVEIRA, S. Improvement of the specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* based on the pthB gene, 2018.

MEZETTE, T. F.; BLUMER, C. G.; VEASEY, E. A. Morphological and molecular diversity among cassava genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 48, n. 5, p. 510-518, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo>>. Acesso: Setembro de 2018

MILANESI, P. M.; FINGER, G.; BLUME, E.; MUNIZ, M. F. B.; JUNGES, E.; DURIGON, M. R.; WEBER, M. N. D.; BRAGAGNOLO, J. Toxicidade de espécies de *Fusarium* isoladas de raízes de genótipos de soja com sintomas de podridão vermelha da raiz. In: XLII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2009, Rio de Janeiro. **Tropical Plant Pathology** - Suplemento. São Paulo: Editora TecArt, v. 34. p. 144, 2009.

MISHRA, R. K.; PANDEY, B. K.; PATHAK, N.; ZEESHAN, M. BOX-PCR-and ERIC-PCR-based genotyping and phylogenetic correlation among *Fusarium oxysporum* isolates associated with wilt disease in *Psidium guajava* L. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 25-32, 2015.

MIURA, L.; MONTEIRO, A. J. A. Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) – Controle de doenças. In: VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. (Ed.). Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília – DF: **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. v. 2, p. 791-814, 1997.

MOSES, E.; ASAFU-AGYEI J. N.; ADUBPFUOR, K.; AUGUSTINE, A. Guide to Identification and Control of Cassava Disease. **CSIR-Crop Research Institute**, Kumasi, Ghana, 2008.

MUTKA, A.M; FENTRESS, S.J; SHER, J.W; BERRY, J.C; PRETZ, C; NUSINOW, D.A; BART, R. Quantitative, image-based phenotyping methods provide insight into spatial and temporal dimensions of plant disease. **Plant physiology**, p. pp. 00984.2016, 2016.

NASSAR, N.M.A.; GOMES, P.T.C.; CHAIB, A.M.; BONFIM, N.N.; BATISTA, R.C.D.; COLLEVATTI, R.G. Cytogenetic and molecular analysis of an apomictic cassava hybrid and its progeny. **Genetics and Molecular Research**, v.8, p.1323-1330, 2009.

NASSAR, N.M.A.; GRATTAPAGLIA, D. Variabilidade de clones de mandioca em relação a fertilidade e aspectos morfológicos. **Turrialba**, v.36, p.555-559, 1986.

NASSAR, N.M.A.; ORTIZ, R. Cassava genetic resources: Manipulation for crop improvement. **Plant Breeding Reviews**, v. 31, p. 247, 2009.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.

OLSEN, K. M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 517–526, 2004.

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 10, p. 5586-5591, 1999.

PERUCH, L. e COLARICCIO, A. e NEUBERT, E. e LUIS MORETO, A. e DE LORENZI, E. Sintomas e controle das principais doenças da mandioca em Santa Catarina. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.26, n.2, p.52-54, 2013.

PINOTTI, E. B.; BICUDO, S. J.; CURCELLI, F.; DE SOUZA DOURADO, W. Levantamento florístico de plantas daninhas na cultura da mandioca no município de Pompéia–SP. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 6, n. 1, p. 120-125, 2010.

PINWEHAA, N.; ASVARAKA, T.; VIBOONJUNB, U.; NARANGAJAVANAA, J. Involvement of miR160/miR393 and their targets in cassava responses to anthracnose disease. **Journal of Plant Physiology**, v. 174, p. 26–35, 2015.

PLUCKNETT, D. L.; PHILLIPS, T. P.; KAGHO, R. B. A global development strategy for cassava: Transforming a traditional tropical root crop. **Draft report prepared for the International Fund for Agricultural Development (work in progress)**, 1998.

RESTREPO, S.; DUQUE, M.; TOHME, J.; VERDIER, V. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 107-114, 1999.

RESTREPO, S.; VELEZ, C. M.; DUQUE, M. C.; VERDIER, V. Genetic structure and population dynamics of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia from 1995 to 1999. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 1, p. 255-261, 2004.

RESTREPO, S.; VERDIER, V. Geographical Differentiation of the Population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4427-4434, 1997.

REY, M.E.C.; VANDERSCHUREN, H. Cassava mosaic and brown streak diseases: Current perspectives and beyond. **Annual review of virology**, v. 4, p. 429-452, 2017.

RIBEIRO, F.E.; SOARES, A.R.; RAMALHO, M.A.P. Divergência genética entre populações de coqueiro-gigante-do-Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1615-1622, 1999.

ROA, A. C.; CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; DUQUE, M. C.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; IGLESIAS, C.; TOHME, J. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 11, p. 1647-1655, 2000.

ROGERS, D. J.; APPAN, S. G. Manihot and Manihotoides (Euphorbiaceae): A computer assisted study. **Flora Neotropica**, v. 13, 1973.

RUBIO, J. S. R.; CARRASCAL, C. E. L.; MELGAREJO, L. M. Physiological behavior of cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) in response to infection by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* under greenhouse conditions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 100, p. 136-141, 2017.

SANCHEZ, G.; RESTREPO, S.; DUQUE, M. C.; FREGENE, M.; BONIERBALE, M.; VERDIER, V. AFLP assessment of genetic variability in cassava accessions (*Manihot esculenta*) resistant and susceptible to the cassava bacterial blight (CBB). **Genome**, v. 42, n. 2, p. 163-172, 1999.

SANTIAGO, C. H.; SANTANA, M. P.; JUNIOR, C., RODRIGUEZ, L.; OLIVEIRA, S. A. S. D.; OLIVEIRA, E. J. D. Methodologies for selecting cassava with resistance to dry and black root rot under controlled conditions. **Bragantia**, n. AHEAD, 2018.

SAVARI, M.; ROSTAMI, S.; EKRAMI, A.; BAHADOR, A. Characterization of toxin-antitoxin (TA) systems in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Iran. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 9, n. 1, 2016.

SRINIVASA, C.; SHARANAIHAH, U.; SHIVAMALLU, C. Molecular detection of plant pathogenic bacteria using polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 44, n. 3, p. 217-223, 2012.

STAMPS, D. J.; WATERHOUSE, G. M.; NEEHOOK, F.J.; HALL, G. S. **Revised tabular key to the species of Phytophthora**. CAB-International, 1990.

STATE, P. I.; BOUGLE, D.; COTON, E.; COTON, M.; LECLERCQ, R.; and VERGNAUD, M. Genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* isolates by PFGE, BOX-PCR and sequencing of the *fliC* gene. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 1, p. 26-34, 2008.

STEPHENSON, D. P.; MOORE, R. J.; ALLISON, G. E. Comparison and utilisation of repetitive element PCR for typing *Lactobacillus* isolated from the chicken gastrointestinal tract. **Applied and environmental microbiology**, 2009.

TATIS, P. A. D.; CORZO, M. H.; CABEZAS, J. C. O.; CIPAGAUTA, A. M.; PRÍAS, M. A.; VERDIER, V.; CARRASCAL, C. E. L. The overexpression of *RXpm1*, a cassava gene coding for an RLK, confers disease resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Planta**, v. 247, n. 4, p. 1031-1042, 2018.

TRINDADE, L. C.; LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 46-54, 2005.

TRUJILLO, C. A.; ARIAS-ROJAS, N.; POULIN, L.; MEDINA, C. A.; TAPIERO, A.; RESTREPO, S.; BERNAL, A. J. Population typing of the causal agent of cassava bacterial blight in the Eastern Plains of Colombia using two types of molecular markers. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 161, 2014.

VANNESTE, J. L. **Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora.** CABI, 2000.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.

VERDIER, V.; DONGO, P.; BOHER, B. Assessment of genetic diversity among isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 11, p. 2591-2601, 1993.

VERDIER, V.; MOSQUERA, G.; ASSIGBÉTSE, K. Detection of the Cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by Polymerase chain reaction. **Plant Disease**, v. 82, n. 1, p. 79-83, 1998.

VERDIER, V.; RESTREPO, S.; MOSQUERA, G.; JORGE, V.; LOPEZ, C. Recent progress in the characterization of molecular determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*-cassava interaction. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 4, p. 573-584, 2004.

VIDIGAL, M. C. G.; VIDIGAL FILHO, P. S.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; BRACCINI, L. E. Divergência genética entre cultivares de mandioca por meio de estatística multivariada. **Bragantia**, v. 56, n. 2, p. 263-271, 1997.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. D. F.; FALEIRO, F. G.; FUKUDA, W. M. G.; E JUNQUEIRA, N. T. V. **Variabilidade genética para caracteres morfológicos entre acessos do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Cerrados.** Embrapa Cerrados, 2005.

VILAS BOAS, S. A.; OLIVEIRA, S. A. S.; HOHENFELD, C. S.; SANTOS, V. S.; OLIVEIRA, E. J. Identificação de acessos de mandioca com resistência múltipla à podridão radicular. In: **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 16.; CONGRESSO LATINO-AMERICANO E CARIBENHO DE MANDIOCA, 2015, Foz do Iguaçu. Integração: segurança alimentar e geração de renda: anais. Foz do Iguaçu: SBM, 2015. 1 CD-ROM.

WATURANGI, D. E.; JOANITO, I.; YOGI, Y.; THOMAS, S. Use of REP-and ERIC-PCR to reveal genetic heterogeneity of *Vibrio cholerae* from edible ice in Jakarta, Indonesia. **Gut pathogens**, v. 4, n. 1, p. 2, 2012.

ZHOU, L.; VEGA, F. E.; TAN, H.; LLUCH, A. E. R.; MEINHARDT, L. W.; FANG, W.; ZHANG, D. Developing Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Markers for the

Identification of Coffee Germplasm, **Tropical Plant Biology**, v. 9, n. 2, p. 82-95, 2016.

CAPÍTULO 1

**FERRAMENTAS MOLECULARES BOX, ERIC-PCR E MARCADORES VNTRS
PARA ESTUDO POPULACIONAL DE *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihot***

FERRAMENTAS MOLECULARES BOX, ERIC-PCR E MARCADORES VNTRS PARA ESTUDO POPULACIONAL DE *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihot*

RESUMO: A bacteriose da mandioca (CBB), causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *Manihotis* (*Xpm*), é uma das principais doenças que limita a produção da mandioca no mundo. Para desenvolver uma maneira eficiente de controle da doença, é preciso conhecer a dinâmica populacional do patógeno, sendo necessários, estudos que proporcionem a obtenção de informações a respeito das diferentes populações desta bactéria existentes em regiões produtoras de mandioca, em que há ocorrência da doença. Com o objetivo de caracterizar a estrutura populacional do patógeno, foram realizadas coletas em cinco regiões produtoras de mandioca do Brasil. Folhas de mandioca com sintomas de bacteriose foram coletadas a bactéria isolada e posteriormente procedeu-se à confirmação por meio de *primers* específicos para *Xpm*. Essas bactérias foram submetidas a reações de PCR, utilizando os *primers* BOX, ERIC e VNTRs, a fim de caracterizar os isolados e as análises estatísticas obtidas pelo *software* R. Um teste de patogenicidade foi realizado para avaliar a incidência desses isolados em três variedades. Os estudos populacionais geraram dados relevantes sobre as populações de patógenos em nível local, onde as informações podem contribuir para gerar e/ou aprimorar novas estratégias para o manejo da doença. A partir dos resultados obtidos, foi possível deduzir que, provavelmente, a dispersão do patógeno tenha ocorrido devido ao intercâmbio de materiais contaminados.

Palavras chaves: Detecção de *Xpm*; Patogenicidade; Padrão genético.

**MOLECULAR TOOLS BOX, ERIC-PCR AND VNTRS MARKERS FOR
POPULATION STUDY OF *Xanthomonas Phaseoli* pv. *manihoti***

ABSTRACT

RESUMO: Cassava bacterial blight (CBB), caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *Manihotis* (*Xpm*), is one of the main diseases limiting cassava production worldwide. In order to develop an efficient way to control the disease the population dynamics as well as information regarding studies that reveal the different populations of this bacteria in cassava producing regions presenting the disease, are necessary. The objective of the present work was to characterize the population structure of the pathogen collected in five cassava producing regions in Brazil. Cassava leaves with CBB symptoms were collected, the bacteria isolated and afterwards the presence of the bacteria confirmed by specific *Xpm* primers. These bacteria were submitted to PCR reactions using BOX, ERIC and VNTRs for characterization of the isolates and statistical analysis carried out using the R software. A pathogenicity test to check for incidence of this pathogen in three varieties, was also carried out. Population studies revealed important data about the populations of the pathogen at local level where this information can contribute to generate and/or improve strategies in disease management. Results show that the dispersion of the pathogen may be due to exchange of contaminated material.

Keywords: Detection of *Xpm*; Pathogenicity; Genetic pattern.

CAPÍTULO 1

Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), originária da floresta tropical amazônica na América do Sul, é hoje uma das três principais culturas tuberosas do mundo (OTSUBO, 2009). Pertence à classe Magnoliopsida, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae, inserida no gênero *Manihot*, que inclui 98 espécies (WURDACK et.al 2005; HOPPE, 2017; CARVALHO, 2018).

A cultura se destaca, tendo como principal atrativo altos teores de carboidratos, o que leva a ser cultivada em muitos países devido à sua robustez, e disponibilidade durante todo o ano, além da flexibilidade e adequação quanto aos tradicionais sistemas agrícolas de insumos (KUIPER et al., 2007).

A produção mundial de raiz de mandioca corresponde cerca de 277 milhões de toneladas (CONAB, 2018). O Brasil é o quarto maior produtor mundial com uma produção de aproximadamente 21 milhões de toneladas em 2018 (CONAB, 2018) cultivadas em 1,4 milhões de hectares. Entretanto, quando se compara com os anos anteriores, observa-se uma diminuição de 2,46%, tanto de área plantada quanto de produção (IBGE, 2018).

Um dos fatores que interfere na produção da cultura, além do déficit hídrico, é o aparecimento de pragas e doenças, que podem ocasionar uma redução significativa na produtividade e comercialização, o que leva a grandes prejuízos econômicos, como a bacteriose da mandioca. Essa doença é uma das principais, sendo encontrada em várias partes do mundo onde a mandioca é plantada (NILMANEE, 1986; HAHN et al., 1989; FU et al., 2016; SANTIAGO et al., 2018).

A bacteriose da mandioca ou *Cassava Bacterial Blight* (CBB), causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, é de significativa preocupação sempre que a mandioca é cultivada. O movimento de hastas infectadas e assintomáticas é um dos principais meios de dispersão de patógenos (DESLANDES; 1944; MEDINA, 2018).

Embora o manejo integrado pelo uso de bactericidas e boas práticas culturais sejam recomendados para o seu controle, essas técnicas são laboriosas e custosas para os produtores, fazendo com que o uso de variedades resistentes seja a melhor forma de controle da doença. No entanto, as variedades resistentes à *Xpm*, ainda não estão bem caracterizadas. Portanto, torna-se necessária uma boa caracterização morfológica e molecular de *Xpm*, para contribuir para a obtenção de variedades de

mandioca resistentes.

Os marcadores moleculares são ferramentas indispensáveis para estudos de diversidade de bactérias patogênicas de plantas. Os mais utilizados nesse tipo de estudo são os microssatélites, ou *Simple Sequence Repeats* (SSRs) e rep - PCR (BOX-PCR, ERIC-PCR) (BERED et al., 1997; SALLA et al., 2002; COSTA et al., 2003; GANGA et al., 2004; VIEIRA et al., 2009; BEOVIDES, 2015). Para o estudo da diversidade genética em Xpm, além dos marcadores supracitados, os do tipo AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) também são muito utilizados (RESTREPO et al. 1999, RADEMAKER et al. 2000, TRUJILLO et al. 2014).

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi, analisar a diversidade genética da bactéria causadora da bacteriose da mandioca (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*) coletada nas principais regiões produtoras de mandioca no País, por meio da comparação das ferramentas moleculares BOX, ERIC-PCR e marcadores VNTRs.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos isolados

Foram coletadas folhas de mandioca que apresentaram sintomas de bacteriose em propriedades localizadas nas principais regiões produtoras do país, como no estado do Paraná, São Paulo, Bahia, Ceará e Mato Grosso do Sul. Após a coleta, o material vegetal foi levado para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado em Cruz das Almas-BA.

As folhas foram submetidas a um processo de desinfestação, lavadas em água corrente, cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm², imersas em álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 50% por 1 min e novamente 30 segundos em álcool 70%, seguido por três lavagens em água destilada esterilizada (ADE) por 30 segundos.

Os fragmentos de tecido foram macerados com auxílio de pistilo em 1 mL de ADE. Realizou-se uma diluição seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), para cada isolado, na suspensão obtida (extrato da maceração + ADE), em microtubos de 1,5 µL contendo 450 µL de ADE. A partir dessa diluição, foram semeados em 3 placas de Petri (uma para cada diluição) contendo o meio YPG (5 g de extrato de levedura, 5 g de proteose [peptona], 5 g de glucose, 15 g de ágar, 1 L de ADE) (RESTREPO et al., 2000), e

espalhados com auxílio de esferas de vidro e incubados em B.O.D. por 24 horas a 28 °C. A repicagem das bactérias foi conduzida pelo método de esgotamento e novamente colocadas para crescimento em B.O.D. na mesma temperatura. As bactérias foram conservadas mantidas em meio nutriente líquido (3 g de Extrato de carne; 5 g de peptona; água destilada [q.s.p] 1L) com glicerol 30%.

Para o método de conservação em meio líquido com glicerol a 30 %, os isolados foram repicados em tubos de 2 mL contendo meio caldo nutriente e incubados por 24 h, a 25 °C em B.O.D. Concluída a incubação, os tubos foram centrifugados a 800 x g por 5 minutos para precipitar as bactérias. O sobrenadante foi descartado e substituído por 1 mL de solução salina de MgCl₂ a 10 mM para resuspender e lavar o precipitado. Feito isso, realizou-se uma nova centrifugação a 800 x g por 5 minutos com posterior descarte do sobrenadante e adição de 1 mL de caldo Nutriente com 30 % de glicerol. Os tubos foram então armazenados a -80 °C em ultrafreezer.

Caracterização dos isolados

Com o auxílio de palito de madeira esterilizado, duas colônias foram raspadas de cada placa e colocadas em microtubos de PCR contendo 100µL de ADE e levados ao termociclador por 10 minutos a 95 °C; processo utilizado para extração de DNA. Em seguida, as amostras foram mantidas conservadas a 4 °C para utilização nas reações de PCR. A caracterização molecular dos isolados bacterianos foi realizada via amplificação com *primers* específicos para isolados patogênicos de *Xpm* (VERDIER,1998; MELO et al., 2018).

As reações de PCR foram realizadas utilizando as concentrações finais: 3 µl de DNA desnaturado a 95 °C, 1X de tampão da Taq, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM dos iniciadores F 10 mM (XV: 5' -TTC-GGC-AAC-GGC-AGT-GAC-CAC-C- 3'), iniciador R 10 mM (XK_MOD: 3' -AAT-CGG-AGA-TTA-CCT-GAG-CG- 5') específicos (com modificação) para *X. phaseoli* pv. *manihotis* (VERDIER et al., 1998; MELO et al., 2018), e o volume final ajustado para 15 µl.

A PCR foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguidos de 36 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95 °C; anelamento do iniciador a 60 °C, por 30 segundos; e extensão a 72°C, por 1 min., finalizando com um ciclo de 7 min a 72 °C.

O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1% corado com

brometo de etídeo, em tampão TBE 0,5%, por 4 horas a 80 V.O marcador utilizado foi 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen, Brasil).

Teste de patogenicidade

Foram utilizados para a avaliação da patogenicidade apenas os isolados considerados como *Xpm*, com base na presença de banda característica para o patovar, por meio da PCR. Para tanto, dos 80 isolados de *Xpm* identificados, apenas 54 foram utilizados no teste, visto que os demais não cresceram após as 48 h da repicagem em placas de Petri com meio YPG a 28 °C. Os inóculos foram preparados, ressuspensando-se os isolados selecionados em 30 ml de solução de MgCl₂ 10 mM, e ajustando a concentração de unidades formadoras de colônia para uma absorbância de 0,02 (OD₆₀₀) em espectrofotômetro, conforme o protocolo descrito por Cohn et al, (2015).

Para a inoculação, foram feitos 3 ferimentos no lado abaxial da folha da planta de mandioca e com uma seringa, sem agulha, a suspensão bacteriana foi depositada por infiltração. Utilizando um dedo da mão livre, a folha foi levemente pressionada contra a seringa durante a infiltração, aplicando-se uma pressão suficiente para estimular o inóculo a penetrar nos espaços intercelulares do limbo foliar. Cinco isolados diferentes foram inoculados em cada planta. Foram feitas 5 repetições por isolado e por variedade de mandioca (Figura 2).

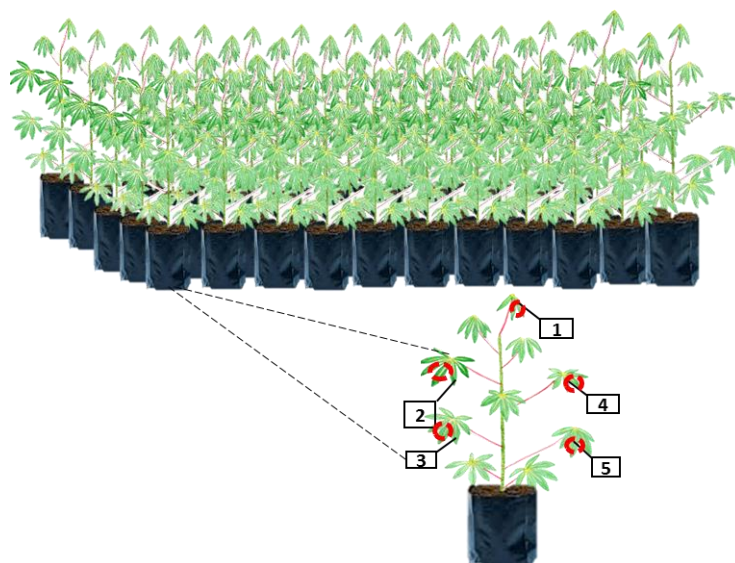


Figura 2. Representação da disposição de um dos três blocos para o teste de patogenicidade contendo 55 plantas e em vermelho, o local onde cada isolado foi inoculado.

Após a inoculação, as plantas foram ensacadas por 24hr, com o objetivo de aclimatá-las, facilitando a dispersão do patógeno dentro da planta. O teste foi realizado com as variedades Formosa, Cigana e Kiriris, já descritas na literatura como moderadamente resistente, moderadamente resistente e suscetível, respectivamente (NEVES et al, 2015). Foram 3 blocos, compostos por 55 plantas (cada bloco) de cada variedade, totalizando 165 plantas. As mesmas estavam com 12 semanas de idade e cerca de 40 centímetros de altura no início do experimento. As avaliações foram realizadas após 5 dias. Após 8 dias houve aparecimento de sintomas em algumas plantas, dentro das repetições. Posteriormente, a cada 3 dias, novas avaliações foram feitas, como ausência de presença de sintoma, até a morte destas e os resultados do experimento, organizados em uma planilha.

Estudo da diversidade genética

- **Marcadores BOX-PCR**

Para as reações de BOX-PCR utilizou-se iniciador BOX 1AR (5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G 3') (Tabela 1). A reação foi composta dos seguintes reagentes: Tampão 10 X; 50 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 0,2 do iniciador; 1U de *Taq* DNA polimerase; 3 µl de DNA; e água milliQ para um volume final de 18 µL. As amostras foram amplificadas em termociclador. O programa utilizado para amplificação foi 95 °C por 2 minutos, seguido de 39 ciclos de: 94 °C por 1 minuto para a desnaturação, 51 °C por 1 minuto para anelamento e 72 °C por 1 minuto para a extensão. A extensão final foi realizada a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X, por eletroforese conduzida a 70-80 V durante aproximadamente 4 horas.

- **Marcadores ERIC- PCR**

Para a análise de Eric-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR*) utilizou-se iniciador ERIC1R (5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3') e ERIC2F (5' AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG 3') (Tabela 1) e mesma composição supracitada de reagentes da reação BOX-PCR, assim como o programa de amplificação, com alteração na temperatura de anelamento para 48 °C.

- **Marcadores VNTRs**

Para as reações de PCR dos VNTRs (Tabela 1), as seguintes concentrações finais dos reagentes foram realizadas: 3 µl de DNA (5ng/µl), 1X de tampão da Taq, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,005 mM de iniciadores para cinco locos VNTR adicionais que pareciam ser específicos para *Xpm* (*XaG1_02*, *XaG1_29*, *XaG1_67*, *XaG1_52*, *XaG1_73*). O programa utilizado para amplificação foi 95 °C por 4 minutos, seguido de 39 ciclos de: 94 °C por 50 segundos para a desnaturação, Δ°C (de acordo com cada par de primer, que variou entre 52 °C a 55 °C) por 50 segundos para anelamento e 72 °C por 1 minuto para a extensão. A extensão final foi realizada a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X, por eletroforese conduzida a 70-80 V durante aproximadamente 4 horas.

Tabela 1. Tabela complementar dos marcadores utilizados para análises.

Técnica	Primer	Sequência	Referência
REP- PCR	BOX 1AR	5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG3'	KOEUTH et al. (1995)
	ERIC1R	5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3'	VERSALOVICS et al. (1991)
	ERIC 2F	5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'	
VNTR			
	G1_02	TCCCCAT	NAKAMURA et al. (1987)
	G1_29	ATCCCGA	NAKAMURA et al. (1987)
	G1_52	CCGCCACAACGCA	NAKAMURA et al. (1987)
	G1_67	CGACAC	NAKAMURA et al. (1987)
	G1_73	GGTCAT	NAKAMURA et al. (1987)

Análise dos dados

Os perfis de banda gerados a partir dos marcadores BOX, ERIC-PCR e VNTR's foram utilizados para a construção de matrizes binárias ('0' = ausência de bandas e '1' = presença de bandas) e as mesmas convertidas em matrizes de dissimilaridade. Dendrogramas para cada método (BOX e ERIC-PCR) foram construídos com base no coeficiente de Jaccard, utilizando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) e os pacotes "vegan" e "poppr" no software R (R Development Core Team, 2016). As correlações entre as matrizes de distância geradas pelos marcadores BOX + ERIC, BOX + VNTR

e ERIC+VNTR foram realizadas usando o teste de Mantel no pacote “ade4” do software R (R Development Core Team, v.3.3.3, 2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação dos isolados

Um total de 468 isolados foram obtidos associados à bacteriose da mandioca coletados em diferentes regiões produtoras nos estados (Figura 3): Bahia (Guanambi e Laje), Ceará (Russas), São Paulo (Ocaçu), Paraná (Paranavaí e Londrina) e Mato Grosso do Sul (Naviraí).

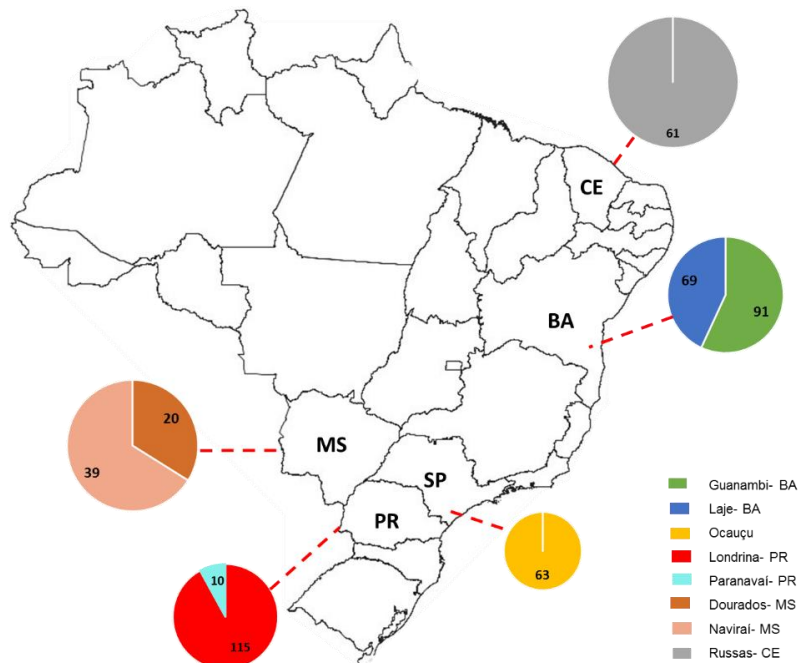


Figura 3. Mapa do Brasil indicando locais de coleta de folhas de mandioca apresentando sintomas de CBB e número de isolados obtidos por cidade.

A bacteriose da mandioca, causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *Manihotis*, é uma das doenças mais importantes da cultura (BONDAR, 1912; VAUTERIN et al. 1995; MELO et al., 2018). As primeiras informações sobre a doença foram descritas por Bondar, em 1912 (ISHIDA et al, 2016), no estado de São Paulo, havendo os primeiros indícios de ocorrência. Posteriormente, notou-se que todas as regiões de cultivo de mandioca, também havia incidência da doença (PEREIRA e ZAGATTO, 1967; LOZANO e SEQUEIRA, 1974; LOZANO, 1986; MIURA; MONTEIRO, 1997; ISHIDA et al, 2016).

Dos 468 isolados submetidos às ampliações com os *primers* XV e XK*mod*, a sequência alvo esperada (900 pb) foi detectada em DNA de 17% (80) dos isolados, confirmando assim a identidade do patógeno (Tabela 2). A maioria desses isolados, foi coletada no Estado da Bahia.

Teste de patogenicidade

Após a inoculação dos 54 isolados (Tabela 2), os sintomas da bacteriose iniciaram após o 5^o dia após montagem do experimento e foram realizadas avaliações até a morte das plantas. Foi observado que todos os isolados avaliados mostraram-se patogênicos.

Tabela 2. Isolados identificados associados à bacteriose da mandioca com seus respectivos locais de coleta e utilizados no teste de patogenicidade e nas análises de diversidade genética.

Id.	Isolados	Localidade	Xkmod	Box	Eric	Vntr	Teste	Patogenicidade
13	Caipira bloco4 nota -3 1.1.1	Londrina-PR	+	-	-	-	Não	NR
14	Caipira B4/N3 1.1.2	Londrina-PR	+	-	-	+	Não	NR
18	Caipira - b4-n3 4.1.2	Londrina-PR	+	+	-	+	Não	NR
21	Caipira - b4-n3 5.2.1	Londrina-PR	+	-	-	+	Não	NR
25	Naviraí 1 1.1.1	Naviraí-MS	+	+	-	+	Não	NR
26	Naviraí 1 1.1.2	Naviraí-MS	+	+	-	+	Não	NR
55	Corrente 1.1	Londrina-PR	+	+	-	+	Sim	+
56	Corrente 1.2	Londrina-PR	+	+	-	+	Sim	+
83	Bernardo 1.1.1	Laje- BA	+	+	-	+	Sim	+
93	Cigana 820/16 1.1	Laje- BA	+	+	-	+	Sim	+
101	Cigana 821/16 3.1	Laje- BA	+	-	-	+	Sim	+
133	BGM 1502 4.1	Londrina-PR	+	-	-	+	Não	NR
134	BGM 1502 4.2	Londrina-PR	+	-	-	+	Não	NR
167	Novo Rumo 106 -175 B 2.2	Laje- BA	+	+	-	+	Sim	+
168	Novo Rumo 106 -175 B 3.1	Laje- BA	+	-	-	+	Sim	+
169	Novo Rumo 106-175 B 3.2	Laje- BA	+	+	-	+	Sim	+
171	NS 86-B 1.2	Laje- BA	+	+	-	-	Sim	+
172	IAC 90 nota2 1.1.1	Ocaçu- SP	+	+	-	+	Sim	+
173	IAC 90 nota21.1.2	Ocaçu- SP	+	+	-	+	Não	NR
174	IAC 90 nota2 1.2.1	Ocaçu- SP	+	+	-	+	Sim	+
175	IAC 90 nota2 1.2.2	Ocaçu- SP	+	-	+	+	Sim	+
176	IAC 90 nota2 2.1.1	Ocaçu- SP	+	-	+	+	Sim	+
177	IAC 90 nota2 2.1.2	Ocaçu- SP	+	+	+	+	Não	NR
178	IAC 90 nota2 2.2.1	Ocaçu- SP	+	+	+	+	Sim	+
179	IAC 90 (nota 2) 2.2.2	Ocaçu- SP	+	-	+	+	Não	NR
180	Novo Rumo 106 - 175 A 2.1	Laje- BA	+	+	+	+	Sim	+

184	Corrente 1.1	Laje- BA	+	+	+	+	Sim	+
186	Caipira 1.1.1 -1	Laje- BA	+	-	-	+	Sim	+
187	Caipira 1.1.1 -2	Laje- BA	+	+	+	+	Sim	+
188	Caipira 1.1.2 -1	Laje- BA	+	-	-	+	Sim	+
192	Caipira 2.2.1	Laje- BA	+	+	+	+	Sim	+
196	Caipira 4.1.1 -1	Laje- BA	+	-	+	-	Sim	+
209	Caipira 6.1.1 -1	Laje- BA	+	+	+	+	Sim	+
245	Tapioqueira- b5 (antrac.) 3.1.2 -2	Londrina-PR	+	+	+	+	Sim	+
249	Tapioqueira- b5 (antrac.) 4.2.1 -2	Londrina-PR	+	+	+	+	Não	NR
251	Tapioqueira b5 (antrac.) 4.2.2 2	Londrina-PR	+	+	+	+	Sim	+
260	Caipira 4.1.1 2	Londrina-PR	+	+	+	-	Sim	+
261	261 PRA 1.1	ParanávaiPR	+	+	+	+	Sim	+
296	GuanambiSaulo 1.1.1 1	Guanambi-BA	+	+	+	+	Não	NR
297	GuanambiSaulo 1.1.1 2	Guanambi-BA	+	+	+	+	Não	NR
311	Guanambi Saulo 4.1.1 2	Guanambi-BA	+	+	+	-	Não	NR
312	Guanambi Saulo 4.1.2 1	Guanambi-BA	+	+	+	+	Não	NR
313	Guanambi Saulo 4.1.2 2	Guanambi-BA	+	+	+	-	Não	NR
315	Guanambi Saulo 5.1.1 2	Guanambi-BA	+	+	+	-	Não	NR
316	Guanambi Saulo 5.1.2 1	Guanambi-BA	+	+	+	+	Não	NR
317	Guanambi Saulo 5.1.2 2	Guanambi-BA	+	+	-	+	Sim	+
318	Guanambi Saulo 5.2.1	Guanambi-BA	+	+	+	+	Sim	+
322	Guanambi Saulo 6.1.2 1	Guanambi-BA	+	-	+	-	Não	NR
323	Guanambi Saulo 6.1.2 2	Guanambi-BA	+	-	+	-	Não	NR
332	Ocaçu SA (am. Chico) 1.1.1 1	Ocaçu- SP	+	-	+	+	Sim	+
333	Ocaçu SA (am.Chico) 1.1.1 2	Ocaçu- SP	+	-	+	+	Sim	+
357	Corrente (Bloco2) 4.1	Dourados-MS	+	+	+	-	Sim	+
361	Corrente 10	Dourados-MS	+	-	+	+	Sim	+
370	Russas 1 2.1	Russas-CE	+	+	-	-	Não	NR
389	Russas 7 1.1	Russas-CE	+	+	-	+	Não	NR
390	Russas 7 1.2	Russas-CE	+	+	-	+	Sim	+
391	Russas 7 3.1	Russas-CE	+	+	+	+	Não	NR
392	Russas 7 3.2	Russas-CE	+	+	+	+	Sim	+
409	Russas 09B 2.2	Russas-CE	+	+	+	+	Sim	+
413	BRS 399 2	Dourados-MS	+	-	+	+	Sim	+
414	BRS 399 3	Dourados-MS	+	-	+	+	Não	NR
429	Cigana 823/16 2	Guanambi-BA	+	-	+	+	Sim	+
434	BGM 0934 2	Guanambi-BA	+	+	+	+	Sim	+
440	Ocaçu (5120) 2	Ocaçu- SP	+	-	-	+	Sim	+
441	Ocaçu (5120) 3	Ocaçu- SP	+	+	+	+	Sim	+
443	Naviraí 03 2	Naviraí-MS	+	+	+	+	Sim	+
450	NS 81B	Dourados-MS	+	+	+	+	Sim	+
451	NS 80B	Dourados-MS	+	+	+	+	Sim	+
452	NS 83 ^a	Dourados-MS	+	+	+	+	Sim	+
453	Russas CE02 1	Russas-CE	+	-	+	+	Sim	+
456	Russas CE02 4	Russas-CE	+	-	+	+	Sim	+

458	Russas CE02 6	Russas-CE	+	-	+	+	Sim	+
459	Russas CE06 1	Russas-CE	+	+	+	+	Sim	+
460	Russas CE06 2	Russas-CE	+	-	+	+	Sim	+
461	Russas CE06 3	Russas-CE	+	-	+	-	Sim	+
462	Russas CE-06 4	Russas-CE	+	+	-	-	Sim	+
463	Russas CE-06 5	Russas-CE	+	+	+	+	Sim	+
465	IF-GBI-03 2	Guanambi-BA	+	-	+	+	Sim	+
466	IF-GBI-03 3	Guanambi-BA	+	-	+	-	Não	NR
467	IF-GBI-03 4	Guanambi-BA	+	-	+	-	Não	NR

'Id' = identificador, '+' = presença de amplificação para o primer/marcador; '-' = ausência de amplificação para o primer/marcador; 'NR' = Não Realizado

Entre as variedades estudadas, a Kiriris apresentou-se como mais suscetível ao patógeno. Do total de folhas inoculadas, cerca de 4% caíram antes do término das avaliações, e aproximadamente 58% apresentaram sintomas, enquanto que a variedade Cigana apresentou-se como pouco suscetível, com cerca de 34% das folhas inoculadas com presença de sintomas. A distribuição da presença e ausência de sintomas, bem como quedas das folhas foram significativamente diferentes entre as variedades pelo teste de χ^2 a 5% de probabilidade (Figura 4).

Esses resultados confirmam o relato pelos autores Verdier et al. (2004), de que a maioria das cultivares comerciais de mandioca é suscetível às linhagens prevalentes de *Xpm*, embora existam algumas cultivares de mandioca que apresentam níveis relativamente altos de resistência natural à CBB (RESTREPO et al. 2000^a, 2000^b)

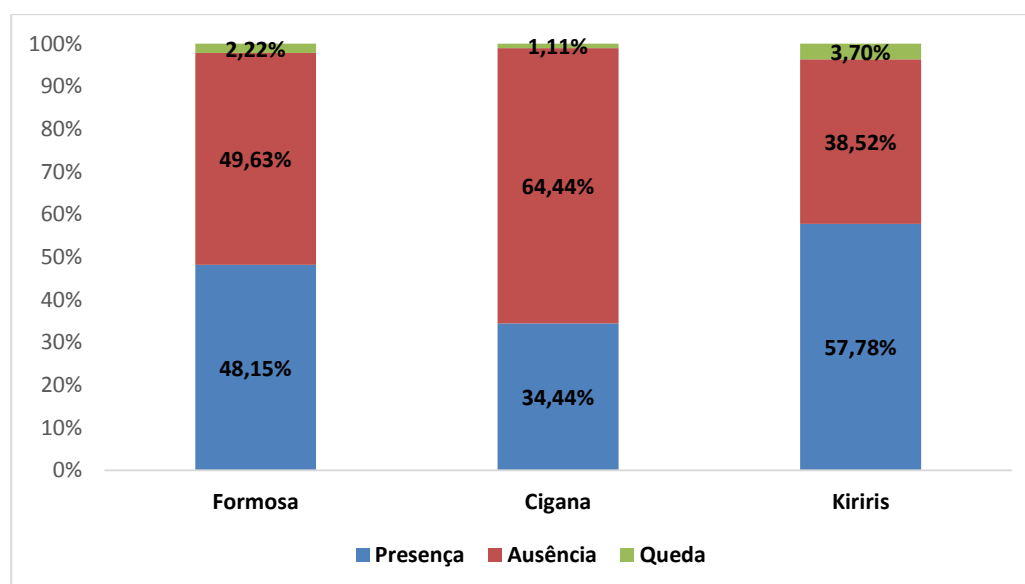


Figura 4. Total de folhas inoculadas por variedade que apresentaram sintomas, que não apresentaram sintomas e que caíram durante o período de avaliações.

Após 8 dias da inoculação, lesões angulares tornaram-se evidentes e 13 dias após observou-se necrose das lesões, posteriormente seca e queda foliar. Nenhum isolado induziu a exsudação de pus bacteriano. Durante as avaliações, notou-se uma diferença de intensidade dos sintomas nas folhas, dos diferentes isolados, possivelmente indicando uma variabilidade entre eles, uma vez que todos estavam nas mesmas condições ambientais. Alguns induziram o aparecimento de mais folhas sintomáticas, dentre eles, os isolados: 133; 169; 188; 209; 318; 459; 463, provenientes de Londrina- PR, Laje- BA, e Russas-CE (Tabela 2).

Em um estudo realizado por Nunes et al. (2008), afim de caracterizar isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* a partir de um teste de patogenicidade na cultura do feijão, concluíram que a variação de virulência em patógenos de plantas é quase sempre determinada em termos de fenótipo de virulência ao invés do genótipo, o que significa que as frequências de genes de virulência não podem ser estimadas a partir dos ensaios de patogenicidade, apesar de ser um método altamente sensível e específico que pode ser aplicado para detecção e identificação em *Xanthomonas* spp. relacionadas.

Para a seleção de resistência a doenças, é importante selecionar uma ou mais espécies (patógeno), já conhecidas, altamente patogênicas, endêmicas em regiões que a cultura seja cultivada. O conhecimento da variabilidade patogênica é um fator necessário para a eficácia e durabilidade da resistência do hospedeiro.

Estudo da diversidade

Estudos de diversidade são necessários para compreensão da variabilidade genética e de espécies de patógenos, onde as técnicas de análise molecular, são cruciais com finalidade epidemiológica, estudo da genética de populações, assim como, auxiliar o controle e manejo do patógeno (SILVA et al., 2018).

Na Figura 5, onde foram analisados os isolados utilizando o marcador BOX-PCR, dez subgrupos foram formados. No primeiro subgrupo estão os isolados provenientes de Ocaçu (SP), no segundo e terceiro grupos, isolados oriundos de Laje (BA); o quarto subgrupo, constituído por isolados de Ocaçu (SP) e Laje (BA); quinto, de Paranavaí (PR) e Dourados (MS); no sexto subgrupo, isolados de Guanambi (BA); sétimo e oitavo subgrupo, de Naviraí (MS), nono subgrupo, isolados de Londrina (PR) e décimo subgrupo, isolados oriundos de Russas, Ceará.

Nota-se que os isolados de Laje (BA) e Ocaçu (SP) apresentam uma certa proximidade genética de acordo com este marcador, o que pode ser advindo do compartilhamento alelos, onde estes isolados poderiam ter a mesma origem comum e com o tempo migraram-se pelos locais, através da propagação vegetativa, decorrente da troca de materiais, por parte de agricultores, provavelmente contaminados.

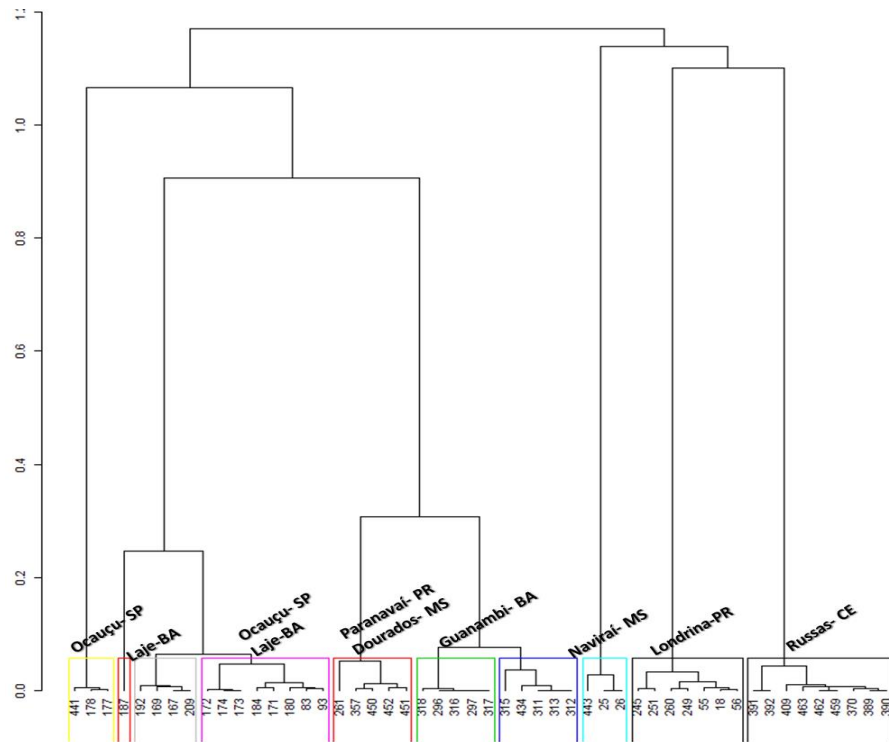


Figura 5. Dendrograma construído utilizando os padrões de bandas obtidos pelo marcador BOX-PCR mostrando o agrupamento de 50 isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihot*. Matriz de diversidade gerada pelo coeficiente de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento pelo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*).

Os dados obtidos com o marcador ERIC-PCR (Figura 6), também mostrou a formação de 10 subgrupos. No entanto, isolados que estavam separados (da mesma população) no BOX-PCR, neste estão agrupados. No ERIC-PCR, são mostradas mais diferenças entre os subgrupos. Os grupos de isolados também foram divididos por região: no primeiro, isolados de Paranavaí (PR), no segundo e terceiro subgrupo, Isolados de Guanambi (BA); no quarto, isolados de Londrina (PR); quinto, de Laje (BA); no sexto subgrupo, isolados de Dourados (MS); sétimo, isolados de Ocaçu (SP); oitavo subgrupo, Russas (CE), nono décimo subgrupo isolados de Dourados (MS). No entanto, também nota-se que houve capacidade discriminatória intra-grupos, pois os isolados oriundos de Guanambi foram separados em dois subgrupos distintos,

apesar de estarem no mesmo nó.

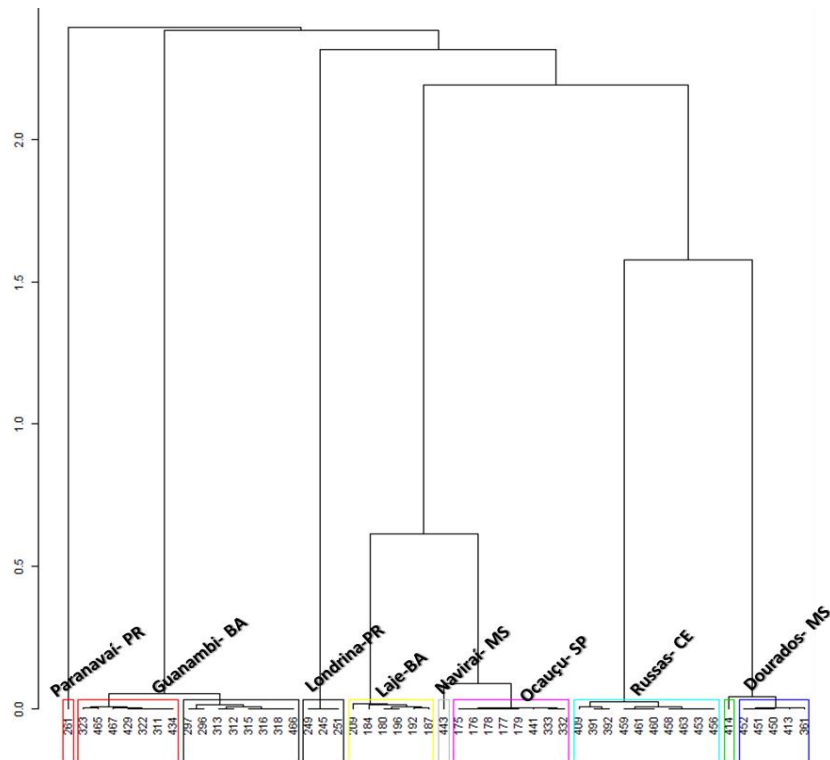


Figura 6. Dendrograma construído utilizando os padrões de bandas obtidos pela técnica ERIC-PCR mostrando o agrupamento de 50 isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihot*. Matriz de diversidade gerada pelo coeficiente de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento pelo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*).

O uso de marcadores VNTRs (Figura 7) também mostrou padrão semelhante aos marcadores BOX e ERIC-PCR, apesar de serem marcadores que estão em regiões não tão conservadas do genoma. Os mesmos mostraram também a formação de 10 subgrupos. Nos dois primeiros subgrupos, isolados da cidade de Russas (CE), foram agrupados, no terceiro subgrupo, Isolados de Paranavaí (PR); no quarto, isolados de Guanambi (BA); quinto, de Londrina (PR); no sexto subgrupo, isolados de Laje (BA) e Ocaçu (SP); sétimo, isolados de Laje (BA); oitavo subgrupo, Ocaçu (SP); nono subgrupo, Naviraí (MS) e décimo subgrupo isolados de Dourados (MS). Percebe-se que mais uma vez, assim como no BOX-PCR, os isolados de Ocaçu (SP) e Laje (BA) apresentaram algum tipo de agrupamento, o que indica que, apesar da separação geográfica, os isolados possuem algumas semelhanças genéticas que permaneceram inalteradas ao longo do caminho evolutivo.

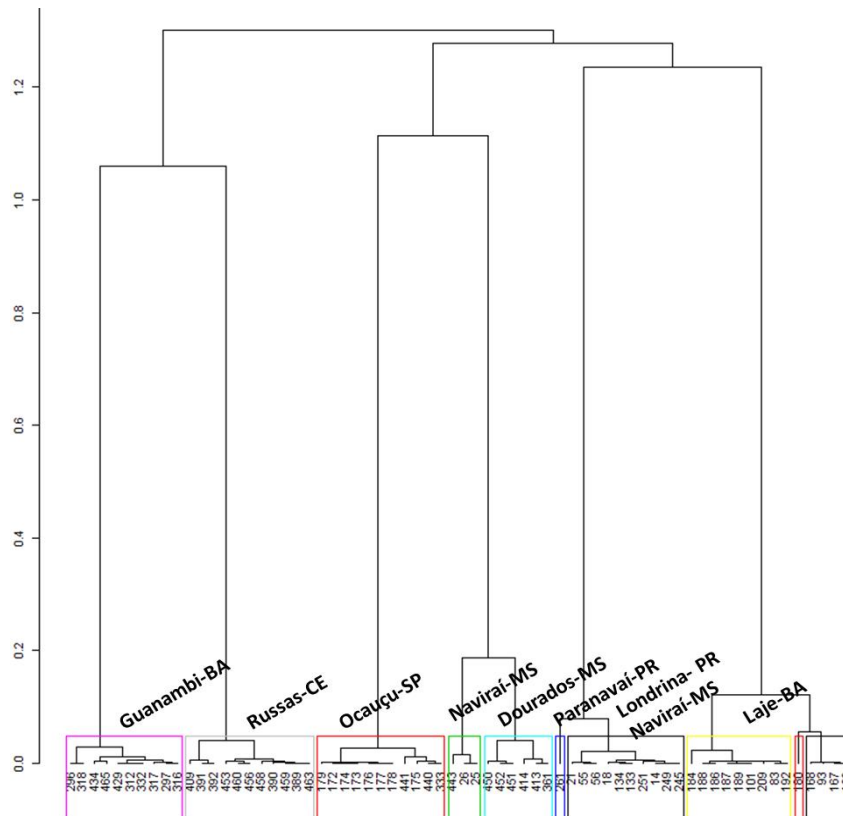


Figura 7. Dendrograma construído utilizando os padrões de bandas obtidos pelos VNTR's, mostrando o agrupamento de 66 isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihot*. Matriz de diversidade gerada pelo coeficiente de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento pelo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages).

Conforme os dendogramas gerados pelos iniciadores, verifica-se a variabilidade dos isolados. No geral, os agrupamentos foram parecidos considerando as três técnicas moleculares (BOX-PCR, ERIC-PCR e VNTRs).

O iniciador ERIC-PCR, foi o que melhor separou os grupos por população e que apresentou maior similaridade entre os isolados das mesmas populações. Como exemplo, o grupo cinco, com todos isolados da população de Laje (BA), mostrando que os isolados 180 e 196 e os isolados 192 e 187 são muito semelhantes. Também é possível observar essa maior similaridade dentro dos outros grupos e também nos grupos formados pelos VNTRs.

O iniciador BOX-PCR foi o que apresentou menor similaridade entre os subgrupos. Em dois subgrupos (4 e 5), houve junção de isolados de diferentes populações, assim como em um dos grupos (7) gerados pelos iniciadores VNTRs, entretanto, vê-se que a similaridade entre estas, é menor.

A bacteriose é uma doença vascular e afeta a qualidade do material de plantio, levando a reduções no rendimento de sementes. A mandioca é propagada,

principalmente, por plantio de manivas, e o patógeno é assim disseminado principalmente através de material de plantio infectado, o que provavelmente explica as diferenças entre os subgrupos de isolados oriundos de diferentes locais, e as diferenças dentro dos grupos. As técnicas de detecção sensíveis, assim como manejo adequado, fiscalização agropecuária, são necessárias para amenizar a introdução do patógeno em regiões livres de bacteriose (LOZANO, 1986; BOHER e VERDIER, 1995; VERDIER, 1998).

Cinquenta dos oitenta isolados amplificaram com a técnica de Rep-PCR utilizando os *primers* universais ERIC e BOX para identificar a diversidade genética. A utilização da técnica Rep-PCR, utilizando os *primers* BOX e ERIC foi eficaz para caracterização dos isolados de *Xpm*. Esta técnica também pode ser considerada uma ferramenta útil para fins de diagnóstico em patologia vegetal.

A Figura 8 mostra a rede de *minimum spanning* para as populações de isolados estudadas de acordo com o marcador BOX-PCR. Observa-se que a maioria dos isolados foi agrupada dentro do seu próprio local de coleta, entretanto, nota-se que houve influência de algumas populações em outras, como isolados oriundos de Guanambi (BA), Naviraí (MS) e Dourados (MS) em um mesmo agrupamento, com uma distância genética menor. A análise mostrou também que isolados oriundos de Russas (CE), Paranaíba (MT) e Laje (BA), compartilham o mesmo perfil genético e também apresentam uma distância genética menor.

É interessante observar que a rede de *minimum spanning* possui poder discriminatório um pouco diferente da análise de cluster, pois os isolados semelhantes nesta análise não apareceram na análise de cluster. Além disso, é possível observar também que os isolados foram basicamente distribuídos de acordo com suas respectivas populações. Nota-se que a distância genética mínima entre os isolados nas populações foi menor, sinalizando que para este marcador, a diversidade foi menor entre e dentro das populações, visto que os perfis genéticos são iguais ou semelhantes e poucos haplótipos únicos.

A rede de *minimum spanning* obtida pelos VNTRs (Figura 10), foi a que mais apresentou ramificações, porém a distância entre os isolados não foi muito alta, se comparada à rede gerada pelo *primer* ERIC (Figura 9). É possível observar que, apesar dos isolados serem diferentes (haplótipos únicos), estes, dentro de suas respectivas populações, ficaram mais próximos.

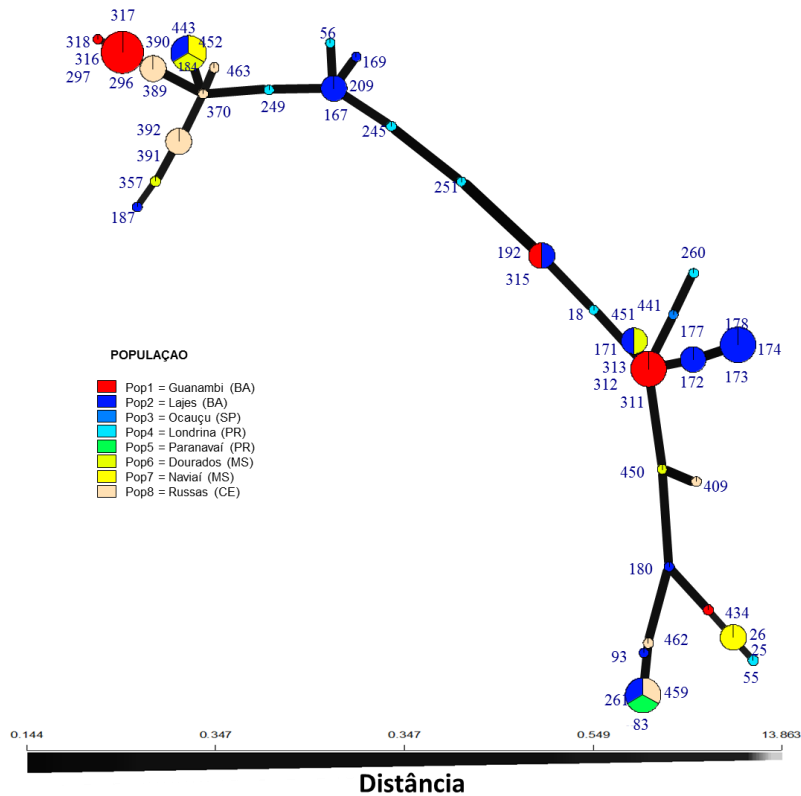


Figura 8. Rede de *minimum spanning*, formada pelos marcadores BOX-PCR, mostrando a relação entre os genótipos individuais de múltiplos locos (MLGs) observados nas populações. Cada nó representa um MLG diferente. Os tamanhos e cores dos nós correspondem ao número de indivíduos e membros da população, respectivamente. A espessura da borda e a cor, são proporcionais à distância genética absoluta. Comprimentos de aresta são arbitrários.

Em dois grupos, isolados da população do Ceará (389, 390 e 391, 392), mostraram-se geneticamente parecidos. Porém, os outros isolados ficaram bem dispersos, indicando maior diversidade genética dentro da mesma população. No Ceará, quase não há relatos sobre a doença, porém, pode-se observar que alguns isolados estão próximos às populações da Bahia e Mato Grosso do Sul, e o intercâmbio de manivas manivas contaminadas, pode explicar essa ocorrência (LOZANO, 1986; VERDIER, 1998)

Para a técnica de ERIC-PCR (Figura 9), a rede de *minimum spanning* mostra uma distância genética bem maior entre os isolados estudados dentro das populações, exceto entre os isolados 180 e 184, oriundos de Guanambi (BA).

O aumento da distância genética pode caracterizar-se como um maior poder discriminatório do marcador para os indivíduos observados. Através da técnica ERIC-PCR, observou-se que os haplótipos mais frequentes, são os coletados da Bahia, São Paulo e Paraná e foram os maiores grupos formados (provavelmente haplótipos

acentrais). A distância genética mínima entre os isolados, foi maior entre dois isolados da Bahia (180 e 184), que foram coletados no mesmo local.

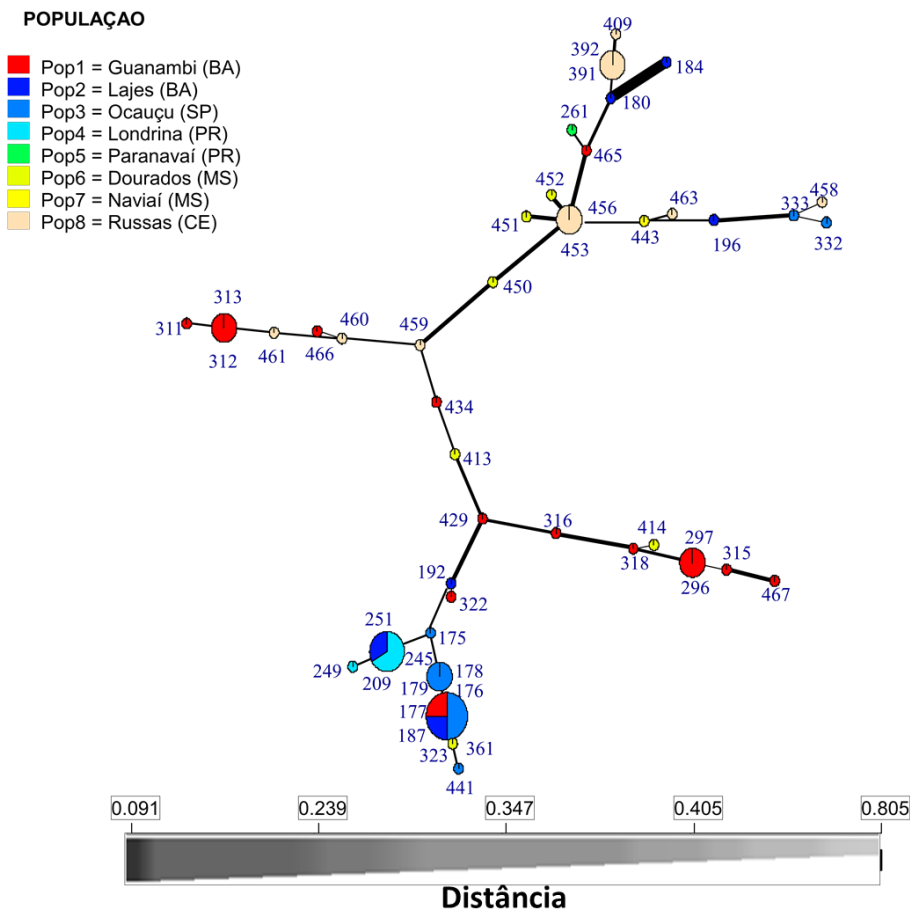


Figura 9. Rede de *minimum spanning* formada pela técnica ERIC-PCR, mostrando a relação entre os genótipos individuais de múltiplos locos (MLGs) observados nas populações. Cada nó representa um MLG diferente. Os tamanhos e cores dos nós correspondem ao número de indivíduos e membros da população, respectivamente. A espessura da borda e a cor são proporcionais à distância genética absoluta. Comprimentos de aresta são arbitrários.

Através dessas redes geradas, notou-se que o marcador BOX (Figura 8) conseguiu agrupar melhor os isolados de acordo com seu local de coleta. Porém, os VNTRs (Figura 10) foram os que melhor discriminou os isolados e mostraram a variabilidade entre esses e o ERIC que mais distanciou as populações (Figura 9).

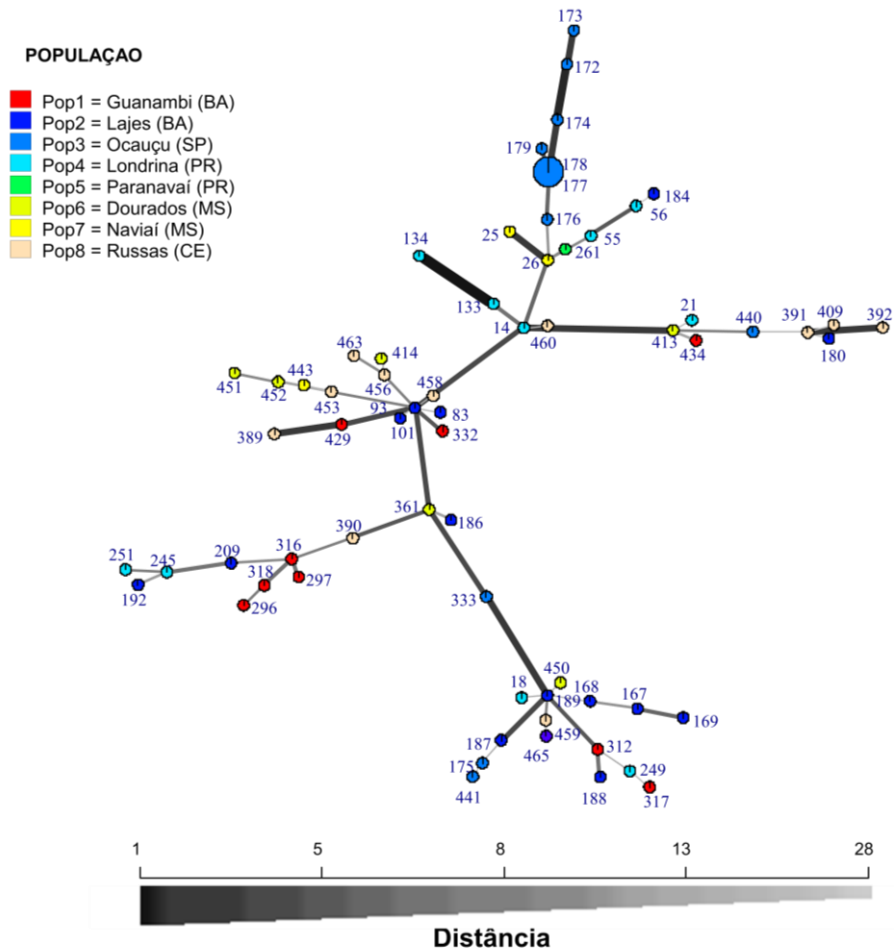


Figura 10. Rede *minimum spanning*, formada pela técnica VNTR's, mostrando a relação entre os genótipos individuais de múltiplos locos (MLGs) observados nas populações. Cada nó representa um MLG diferente. Os tamanhos e cores dos nós correspondem ao número de indivíduos e membros da população, respectivamente. A espessura da borda e a cor são proporcionais à distância genética absoluta. Comprimentos de aresta são arbitrários.

Quando os dados obtidos pelas diferentes técnicas de análises foram combinados (Figura 11), as populações ficaram muito distantes, porém, muitos isolados não apareceram, visto que os dados utilizados para gerar a rede de *minimum spanning*, foram selecionados a partir dos que foram comuns entre os três marcadores. Apenas dois isolados das populações do Ceará (391 e 392) e dois isolados da Bahia (177 e 178) ficaram bastantes próximos.

As três técnicas apresentaram perfis de bandas diferentes, provavelmente pelo fato de que estes marcadores fazem uso de seqüências repetitivas dispersas no genoma.

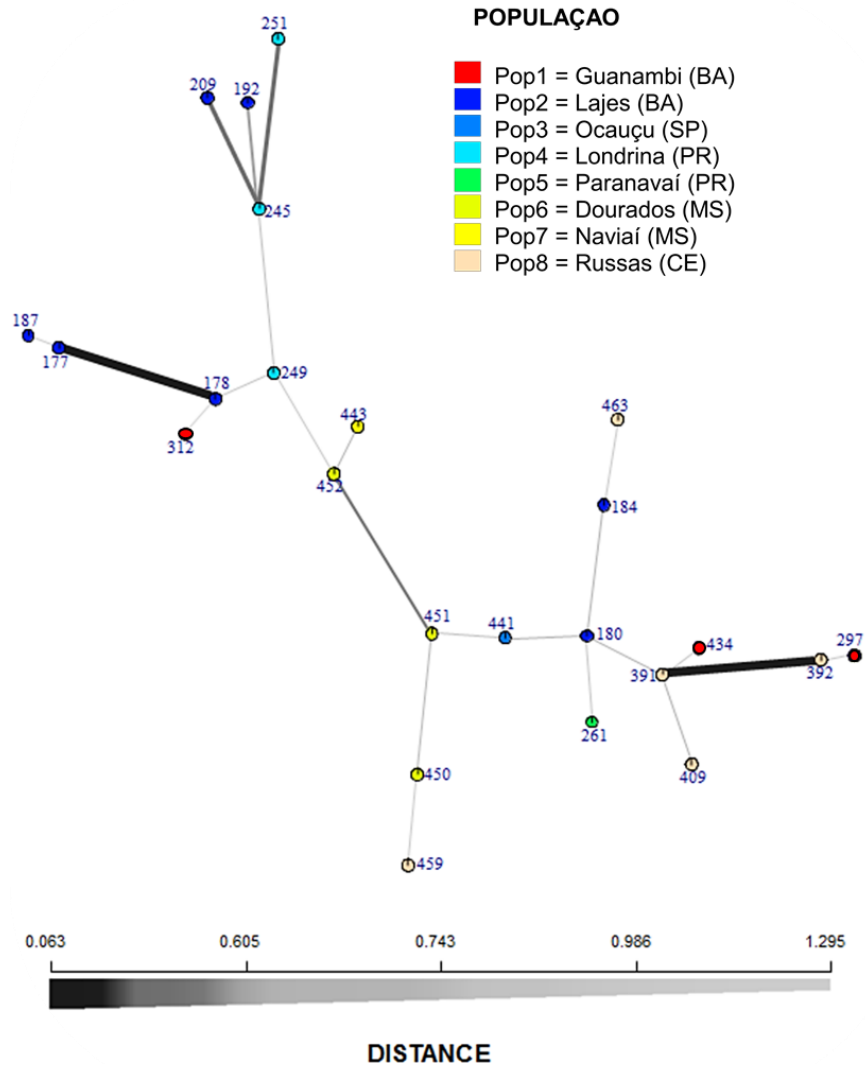


Figura 11. Rede *minimum spanning*, formada pelos marcadores BOX, ERIC e VNTR's, mostrando a relação entre os genótipos individuais de múltiplos locos (MLGs) observados nas populações. Cada nó representa um MLG diferente. Os tamanhos e cores dos nós correspondem ao número de indivíduos e membros da população, respectivamente. A espessura da borda e a cor são proporcionais à distância genética absoluta. Comprimentos de aresta são arbitrários.

O teste de Mantel revelou correlação positiva baixa entre os marcadores moleculares BOX e VNTR (0,19) e positiva e relativamente alta, entre os marcadores ERIC e VNTR (0,52) e BOX e ERIC (0,68). Uma maior correlação entre as matrizes de BOX x ERIC já era um tanto esperada, uma vez que esses marcadores estão mais associados a regiões mais conservadas do genoma em comparação com os marcadores VNTR.

CONCLUSÃO

O estudo da diversidade de *Xpm* é o primeiro passo para melhorar o

entendimento sobre a disseminação de agentes patogênicos e implicações para o controle de doenças. Diagnóstico molecular de *Xpm* é fundamental para fomentar estudos de estrutura de população para auxiliar o manejo da cultura e implicações que irão refletir em maior produtividade.

O método descrito no protocolo Cohn et al (2015), mostrou-se bastante satisfatório, visto que todos isolados inoculados induziram sintomas nas plantas mostrando a patogenicidade dos isolados de *Xpm* e contribuindo na identificando variedades de mandioca mais resistentes à CBB. É preciso a realização de novos testes para se determinar a patogenicidade de outros isolados de outras regiões, de forma a auxiliar no desenvolvimento de variedades de mandioca resistentes à doença e reduzir a disseminação da doença.

REFERÊNCIAS

- BEOVIDES, Y.; FREGENE, M.; GUTIÉRREZ, J. P.; MILIÁN, M. D.; COTO, O.; BUITRAGO, C.; RODRÍGUEZ, D. Molecular diversity of Cuban cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars assessed by simple sequences repeats (SSR). **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 19, n. 4, p. 364-377, 2015.
- BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. DE. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciencia Rural. Santa Maria**, vol. 27, n. 3 (jul./ago. 1997), p. 513-520, 1997.
- BOHER, B.; VERDIER, V. Cassava bacterial blight in Africa: the state of knowledge and implications for designing control strategies. **African crop science journal**, v. 2, n. 4, p. 505-509, 1995.
- BONDAR G. Una nova molestia bacteriana das hastes da mandioca. **Chácaras e Quintais**. São Paulo, v.5, p. 15-18, 1912.
- CARVALHO, L. J. C. B.; ANDERSON, J. V.; CHEN, S.; MBA, C.; DOĞRAMACI, M. Domestication Syndrome in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): Assessing Morphological Traits and Differentially Expressed Genes Associated with Genetic Diversity of Storage Root. In: **Cassava**. InTech, 2018.
- COHN, M., SHYBUT, M., DAHLBECK, D. E STASKAWICZ, B Assays to Assess Virulence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* on Cassava. **Bioprotocol**, v. 5, p. 1522, 2015.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Mandioca - Análise Mensal-Agosto/2018**. Disponível em: < https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-mandioca/item/download/22151_f1536f7843af3e6cd8c33c6312e267a7> Acesso em: Agosto. 2018.
- COSTA, M. R.; CARDOSO, E. R.; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética da cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2003.
- DESLANDES, J. A. Observações fitopatológicas na Amazônia. **Boletim Fitosanitário**, v. 1, p. 197-24, 1944.
- FU, L.; DING, Z.; HAN, B.; HU, W.; LI, Y.; ZHANG, J. Physiological Investigation and Transcriptome Analysis of Polyethylene Glycol (PEG)-Induced Dehydration Stress in Cassava: **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 283, 2016.
- GANGA, R. M. D.; RUGGIERO, C.; LEMOS, E. G. D. M.; GRILI, G. V. G.; GONÇALVES, M. M.; CHAGAS, E. A.; WICKERT, E. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, p. 494-498, 2004.
- HAHN, S. K.; ISOBA, C. G.; IKOTUN, T. Resistance breeding in root and tuber crops at the International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria. **Crop Protection**, v. 8, n. 3, p. 147-168, 1989.

HOPPE, S.; SHIKIDA, P. F. A.; DA SILVA, J. R. Análise Econômico-Financeira da Implantação de uma Destilaria para Produção de Álcool Carburante a partir da Mandioca." **Revista Brasileira de Gestão Urbana** v. 1, n. 2, p. 245-257, 2017.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Rendimento médio, por ano da safra e produto das lavouras**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/188>> Acesso em: Agosto 2018.

ISHIDA, A.; CARDOSO, S.; ALMEIDA, C.; NORONHA, A. D. S.; CUNHA, E. Incidência da bacteriose da mandioca (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) no Estado do Pará. **Embrapa Amazônia Oriental-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2016.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bactéria. **Genome Research**, v. 5, p. 408-418, 1995.

KUIPER, L.; EKMEKCI, B.; HAMELINCK, C.; HETTINGA, W.; MEYER, S.; KOOP, K. Bio-ethanol from Cassava. **Ecofys Netherlands**, p. 1-38, 2007.

LOZANO, J. C. Cassava bacterial blight: a manageable disease. **Plant Disease**, v. 70, n. 12, p. 1989-1993, 1986.

LOZANO, J. C.; SEQUEIRA, L. Bacterial blight of cassava in Colombia: I. Etiology. **Phytopathology**, v. 64, n. 1, p.74-82, 1974.

MEDINA, C. A.; REYES, P. A.; TRUJILLO, C. A.; GONZALEZ, J. L.; BEJARANO, D. A.; MONTENEGRO, N. A.; BERNAL, A. The role of type III effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in virulence and suppression of plant immunity. **Molecular plant pathology**, v. 19, n. 3, p. 593-606, 2018.

MELO, R. de C. C.; BRAGANÇA, C.; NOGUEIRA P. K; SILVA, H.; FERREIRA, C.; OLIVEIRA, S. **Improvement of the specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis based on the pthB gene**, 2018.

MIURA, L.; MONTEIRO, A. J. A. Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) – Controle de doenças. In: VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. (Ed.). Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília – DF: **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. v. 2, p. 791-814, 1997.

NAKAMURA, Y.; LEPPERT, M.; O'CONNELL, P.; WOLFF, R.; HOLM, T.; CULVER, M.; KUMLIN, E. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**. v. 235, n. 4796, p. 1616-1622, 1987.

NEVES, E. S., DA SILVA, M. A., OTSUBO, A. A., DE OLIVEIRA, E. J., SANTOS, V. D. S., E DE OLIVEIRA, S. A. S. Reação de acessos de germoplasma e variedades de mandioca à bacteriose no Município de Dourados-MS. In **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 16; CONGRESSO LATINO-AMERICANO E CARIBENHO DE MANDIOCA, 2015, Foz do Iguaçu. Integração: segurança alimentar e geração de renda: anais. Foz do Iguaçu: SBM, 2015. 1 CD-ROM.

NILMANEE, S. Diseases of Cassava. In: Raychaudhuri, S.P. and Verma, J.P., Eds., **Resistance Breeding in Root and Tuber Crops at International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria**, Today & Tomorrow's Printers & Publishers, New Delhi, p. 213-247, 1986.

NUNES, W. M. DE C.; CORAZZA, M. J.; SOUZA, S. A. C. D. DE; TSAI, S. M.; KURAMAE, E. E. Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* isolates. **Summa phytopathol**, Botucatu, v. 34, n. 3, p. 228-231, 2008. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010054052008000300004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em Fevereiro de 2019.

OTSUBO, A. A.; MERCANTE, O. R.; OTSUBO, F. M.; GONÇALVES, V. H. N., M. A.; TELLES, T. S. Desempenho de cultivares elites de mandioca industrial em área de cerrado do Mato Grosso do Sul Performance of elite cultivars of industrial cassava in savannah area of Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 30, n. suplemento 1, p. 1155-1162, 2009.

PEREIRA, A. L. G.; ZAGATTO, A. G. Etiology of angular leaf spot of cassava (*Manihot utilissima*). **Archivos do Instituto Biológico**, v. 34, p.153-160, 1967.

RADEMAKER, J. L.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L. and DE BRUIJN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 665-677, 2000.

RESTREPO S; VELEZ, C.M; VERDIER, V. Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. **Phytopathology**, v. 90, n. 7, p. 683-690, 2000b.

RESTREPO, S.; DUQUE, M.; TOHME, J.; VERDIER, V. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 107-114, 1999.

RESTREPO, S; DUQUE, M.C; VERDIER, V. Characterization of pathotypes among isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. **Plant Pathology**, v. 49, n. 6, p. 680-687, 2000a.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. D. F.; RUAS, P. M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. A. L. É. R. I. A. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* DC). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 15-22, 2002.

SANTIAGO, C. H.; SANTANA, M. P.; JUNIOR, C., RODRIGUEZ, L.; OLIVEIRA, S. A. S. D.; OLIVEIRA, E. J. D. Methodologies for selecting cassava with resistance to dry and black root rot under controlled conditions. **Bragantia**, n. AHEAD, 2018.

SILVA, D. D. C. S. D.; MARTINS, M. L. L.; SANTOS, A. S.; SANTOS, V. D. S.; ALVES, A. A. C.; LEDO, C. A. D. S. Obtaining hybrids of cultivars and wild subspecies of cassava. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 2, p. 182-188, 2018

TRUJILLO, C. A.; ARIAS-ROJAS, N.; POULIN, L.; MEDINA, C. A.; TAPIERO, A.; RESTREPO, S.; BERNAL, A. J. Population typing of the causal agent of cassava bacterial blight in the Eastern Plains of Colombia using two types of molecular markers. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 161, 2014.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.

VERDIER, V.; MOSQUERA, G.; ASSIGBÉTSÉ, K. Detection of the Cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by Polymerase chain reaction. **Plant Disease**, v. 82, n. 1, p. 79-83, 1998.

VERDIER, V.; RESTREPO, S.; MOSQUERA, G.; JORGE, V.; LOPEZ, C. Recent progress in the characterization of molecular determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*–cassava interaction. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 4, p. 573-584, 2004.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823–6831, 1991.

VIEIRA, E. A.; DE FREITAS FIALHO, J.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; DA FONSECA, K. G.; CARVALHO, L. J. C. B.; DA SILVA, K. N. Divergência genética entre acessos açucarados e não açucarados de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1707-1715, 2009.

WURDACK, K. J.; HOFFMANN, P.; CHASE, M. W. Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid *rbcL* and *trnL-F* DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 8, p. 1397-1420, 2005.