



SANDRA VALÉRIA DIAS CARDOSO

**DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES DE *Xanthomonas phaseoli*
pv. *manihotis* DO ESTADO DO PARÁ E REAÇÃO DE
CULTIVARES DE MANDIOCA À BACTERIOSE**

**LAVRAS-MG
2024**

SANDRA VALÉRIA DIAS CARDOSO

**DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES DE *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* DO
ESTADO DO PARÁ E REAÇÃO DE CULTIVARES DE MANDIOCA À
BACTERIOSE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Dr. Ricardo Magela de Souza
Orientador

Dra. Alessandra Keiko Nakasone
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Cardoso, Sandra Valéria Dias.

Diversidade de populações de *Xanthomonas phaseoli* pv.
manihotis do Estado do Pará e reação de cultivares de mandioca à
bacteriose / Sandra Valéria Dias Cardoso. - 2024.

106 p.

Orientador(a): Ricardo Magela de Souza.

Coorientador(a): Alessandra Keiko Nakasone.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Bacteriose da mandioca. 2. Variabilidade patogênica. 3.
Resistência de cultivar. I. Souza, Ricardo Magela de. II. Nakasone,
Alessandra Keiko. III. Título.

SANDRA VALÉRIA DIAS CARDOSO

**DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES DE *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* DO
ESTADO DO PARÁ E REAÇÃO DE CULTIVARES DE MANDIOCA À
BACTERIOSE**

**DIVERSITY OF POPULATIONS OF *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* FROM
THE STATE OF PARÁ AND REACTION OF CASSAVA CULTIVARS TO
BACTERIOSIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de março de 2024.

Prof. Dr. Ricardo Magela De Souza	UFLA
Prof ^a . Dra. Antonia dos Reis Figueira	UFLA
Prof ^a . Dra. Carolina da Silva Siqueira	UFLA
Dra. Alessandra Keiko Nakasone	EMBRAPA
Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira	EMBRAPA

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

Documento assinado digitalmente



RICARDO MAGELA DE SOUZA
Data: 01/07/2024 18:14:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador

Dra. Alessandra Keiko Nakasone
Coorientadora

LAVRAS-MG

2024

A Deus, por ter me dado força, saúde e sabedoria para chegar até aqui, administrando as adversidades e superando os obstáculos sem nunca perder a fé.

À minha amada mãe, Maria Olanda Cardoso, por ser o meu alicerce e maior exemplo de amor incondicional, de caráter, dedicação, persistência e, sobretudo, de fé.

Ao meu amado pai, Valfredo Soares (in memoriam), meu anjo, por todo seu amor e cuidado.

Ao meu irmão, Paulo Victor, por sua bondade e proteção.

Ao meu marido, Aluísio Jr., por estar ao meu lado em todos os momentos, com seu amor, bondade, paciência e com seu apoio e incentivo.

À minha filha, Aurora Sofia, por ser meu amor, meu raio de sol, luz da minha vida e maior motivação para chegar até aqui.

Com todo amor e carinho

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido sabedoria, força, saúde, paz de espírito e equilíbrio emocional, os obstáculos foram muitos, mas o Senhor Jesus com a sua benignidade e a minha fé inabalável transformaram momentos difíceis em benções. Sou grata a Ele por cada oportunidade e conquista alcançada.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade concedida.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos. Pois, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À coordenação do Departamento de Fitopatologia, por toda atenção e assistência sempre que necessário. Em especial à colaboradora Ariane, que exerce sua atividade com muita eficiência, comprometimento e, além disso, com muita boa vontade, que é o mais especial.

Aos professores, funcionários e colegas de turma do Departamento de Fitopatologia, obrigada pelos ensinamentos repassados, dedicação, assistência, convivência e pelos momentos de alegria.

Ao meu orientador Prof. Ricardo Magela, pela confiança, compreensão, assistência na elaboração deste trabalho e por ser para mim uma inspiração de docente, com suas ministrações de aulas ricas em informações que certamente fazem a diferença aos seus alunos.

À Dra. Alessandra Nakasone, pela co-orientação, conhecimentos transmitidos, confiança, paciência e carinho durante todos esses anos de trabalho e, principalmente, por me conceder a oportunidade de elaborar o projeto para ser executado na íntegra no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. Só tenho a pedir gratidão, a senhora é muito mãezona mesmo!

À Professora Nilvanira Tebaldi da Universidade Federal de Uberlândia, ao Professor Maurício Rossato da Universidade de Brasília e ao Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Saulo de Oliveira pelos isolados cedidos para o presente estudo.

Ao Analista Helton Fleck da Silveira da Embrapa Mandioca e Fruticultura e ao Pesquisador Eduardo Alano Vieira da Embrapa Cerrados pelo fornecimento do material vegetal concedido para a pesquisa.

Aos pesquisadores, técnicos e estagiários do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, pelos vários momentos de alegria e aprendizado.

À Técnica Leonária, do laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental, pela ajuda nos ensaios de molecular, ensinando, auxiliando e compartilhando histórias da vida. Obrigada por ser essa profissional incrível e uma amiga maravilhosa.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia da UFLA, em especial à Ana Maria, por toda ajuda nas práticas laboratoriais e pela harmoniosa vivência que tivemos dentro e fora do laboratório. Obrigada por ser essa pessoa acolhedora e de uma alegria contagiante.

À Dra. Sarah Costa, pela paciência, assistência e ensinamentos transmitidos ao longo do doutorado.

À minha amada mãe, Maria Olanda Dias Cardoso, minha eterna gratidão, a senhora é a minha fortaleza, sem o seu apoio e amor incondicional comigo e com a minha filha seria mais difícil suportar cada dificuldade. Obrigada pelas suas orações direcionadas a mim, elas fazem toda diferença em minha vida.

À minha filha, Aurora Sofia, por você existir e tornar a minha vida mais leve, mais feliz, pela reciprocidade do seu amor e por ser o meu maior incentivo para lutar todos os dias para alcançar os meus sonhos.

Ao Aluísio de Lima Jr., por seu amor, sua amizade e companheirismo em todos os momentos, mesmo nos dias mais “nublados” de sua vida. Por você acreditar em mim, fez o possível e o impossível para que eu não desistisse dos meus propósitos, pois você sabe o quanto foi difícil chegar até aqui.

Aos meus irmãos, Paulo Soares, Waldecy Soares, Lílían Soares e Sandro Soares pelo apoio e incentivo.

Aos meus sogros, Olgarina de Lima e Aluísio de Lima, pelo amor e cuidado com a minha filha e por terem feito parte da minha rede de apoio, sem vocês tenho absoluta certeza que a minha produtividade não seria a mesma.

À Fabiana Barros, uma amiga que considero como uma irmã, pois guardarei em minha memória todos os momentos que você se mostrou ser a melhor amiga que eu poderia ter. Mesmo na distância você se faz presente em minha vida.

A todos aqueles que, embora não nomeados, de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Muito obrigada!

“Quanto mais eu estudo a natureza, mais me maravilho com a obra do Criador.”

(Louis Pasteur)

RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura de importância alimentar e industrial. Entretanto, a bacteriose causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), pode representar limitação para esta cultura, sendo responsável por perdas de rendimento que variam de 30 a 80%. Assim, a seleção de cultivares resistentes é conhecida como a melhor estratégia de controle contra esta doença. Porém, a intensidade da doença pode variar conforme a agressividade da cepa e não há informações disponíveis sobre a diversidade genética de isolados de *Xpm* da região norte do Brasil. Além disso, o estudo da variabilidade do patógeno é uma ferramenta importante para auxiliar programas de melhoramento genético e estudos epidemiológicos da doença. Com isso, objetiva-se com este trabalho, avaliar a variabilidade genética e patogênica de isolados de *Xpm* do Estado do Pará por meio das técnicas de MLSA, MLVA, rep-PCR e pela agressividade das cepas, e selecionar cultivares de mandioca resistente à bacteriose em casa de vegetação utilizando materiais de mandioca selecionados em programas de melhoramento genético. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental e na casa de vegetação da mesma unidade. A técnica MLSA foi eficiente para identificar e demonstrar que existe variabilidade genética entre isolados de *Xpm* mediante a abertura de vários clados entre os isolados da mesma espécie, enquanto a técnica REP-PCR separou eficientemente apenas as diferentes espécies, mas com pouca inferência sobre informações de variabilidade entre os isolados. A técnica MLVA foi considerado o melhor método para demonstrar a variabilidade entre os isolados e a relação de proximidade com cepas de mesma origem. A similaridade de cada dendograma VNTR variou entre 80 e 100%. Portanto, o presente trabalho torna evidente que os isolados da espécie *Xpm* do Estado do Pará apresentam diversidade genética, mas o polimorfismo dos patógenos não pode ser determinado pelos locais de origem, pois diferentes haplótipos estão presentes de forma dispersa em vários municípios produtores de mandioca. Os isolados testados na cultivar BRS Poti induziram sintomatologia típica da doença e foi demonstrada a existência de variabilidade na agressividade do patógeno. As reações das cultivares de mandioca à *Xpm* exibiram sintomas com níveis de incidência variados. Portanto, os isolados de *Xpm* apresentam uma grande diversidade genética, o que sugere a ocorrência de disseminação desses patógenos para várias regiões produtoras de mandioca do Estado do Pará e a troca de material genético entre eles decorrente de processos de mutações gerando variedade de haplótipos para a espécie em estudo. Diante disso, a técnica de MLVA foi eficiente para demonstrar a distância genética entre os isolados e quantificar os haplótipos presentes. Porém, a severidade da doença não apresentou correlação com a variabilidade genética e nem com as origens geográficas, com exceção para os isolados Xam 17 e Xam 18 que obtiveram alta similaridade genética em todos os testes moleculares, na severidade da doença e também são originários do mesmo município. Mesmo diante de isolados altamente agressivos foram selecionadas 23 cultivares classificadas como resistentes para o Estado do Pará.

Palavras chaves: mlsa; rep-pcr; mlva; resistência; variabilidade.

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a crop of food and industrial importance. However, one of the main diseases that may represent limitations for this crop is bacteriosis caused by the bacteria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), which is responsible for yield losses ranging from 30 to 80%. Therefore, selecting resistant cultivars is considered the best control strategy against this disease. However, the intensity of the disease can vary depending on the aggressiveness of the strain and there is currently no information available on the genetic diversity of *Xpm* isolates from the northern region of Brazil. Furthermore, the study of pathogen variability is an important tool to assist genetic improvement programs and epidemiological studies of the disease. Therefore, the objective of this work is to evaluate the genetic and pathogenic variability of *Xpm* isolates from the State of Pará using MLSA, MLVA, and rep-PCR techniques, as well as to assess the aggressiveness of the strains and select cassava cultivars resistant to bacteriosis in a greenhouse setting, utilizing selected cassava materials through genetic improvement programs. The tests were conducted in the Phytopathology Laboratory and the greenhouse facilities at Embrapa Amazônia Oriental. The results obtained from investigating *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* using the MLSA technique demonstrated that it was efficient in identifying and demonstrating that there is genetic variability through the opening of several clades among isolates of the same species. Conversely, REP-PCR effectively separated different species but provided limited information on the variability among *Xpm* isolates. The MLVA technique was considered the most effective method for demonstrating variability among isolates and the proximity relationships of strains from the same origin. The similarity of each VNTR dendrogram varied between 80 and 100%. Therefore, the present work makes it clear that isolates of the species *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* from the State of Pará present genetic diversity, but the polymorphism of the pathogens cannot be determined based on their places of origin, as different haplotypes are present in a dispersed form in several cassava-producing municipalities. All isolates tested in the BRS Poti cultivar induced the typical symptoms of the disease, demonstrating the existence of variability in the aggressiveness of the pathogen. The cultivar reaction results to *Xpm* demonstrated that all cassava materials exhibited symptoms with varying levels of incidence. Therefore, isolates of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* present a significant genetic diversity, which suggests the occurrence of dissemination of these pathogens to several cassava-producing regions in the State of Pará and the exchange of genetic material between them resulting from mutation processes generating a variety of haplotypes for the species under study. Therefore, the MLVA technique was efficient in demonstrating the genetic distance between the isolates and quantifying the haplotypes present. However, the severity of the disease was not demonstrated by genetic variability or geographic origins, except for isolates Xam 17 and Xam 18, which obtained high genetic similarity in all molecular tests, in terms of disease severity and also originate from same municipality. Even in the face of highly aggressive isolates, 23 particularly resistant cultivars were selected for the State of Pará.

Keywords: mlsa; rep-pcr; mlva; resistance; variability.

INDICADORES DE IMPACTO

A região Norte se destaca na liderança da produção brasileira de mandioca, com destaque para o Estado do Pará onde se concentra a maior produção nacional. Nessa região, o cultivo é predominante de mão de obra familiar, bem como seus derivados, o que a torna uma cultura importante, pois desempenha forte influência socioeconômica na região. A mandioca é considerada um produto de segurança alimentar, pois, o aumento da sua produção, pode ajudar a resolver o problema da fome em regiões tropicais pobres onde pode ser cultivada. Porém, os cultivos de mandioca sofrem perdas significativas na sua produtividade e consequentemente na lucratividade devido a problemas fitossanitários, como por exemplo, a bacteriose causada pela bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), sendo responsável por perdas de rendimento que variam de 30 a 80%. Assim, a seleção de cultivares resistentes é conhecida como a melhor estratégia de controle contra esta doença. Porém, a intensidade da doença pode variar conforme a agressividade da cepa e não há informações disponíveis sobre a diversidade genética de isolados de *Xpm* da região norte do Brasil. Nessa perspectiva, o conhecimento de diferentes populações de *Xpm* existentes no Estado do Pará pode contribuir para o controle da doença, ou até mesmo, amenizar a disseminação da mesma ao evitar a introdução de populações mais agressivas, em áreas de cultivo isentas do patógeno ou que apresentem isolados menos agressivos; bem como a seleção de materiais visando à resistência a *Xpm*. Tais estudos são importantes para subsidiar programas de melhoramento genético da mandioca e de estratégias de controle da doença. Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho comprovam a existência de uma grande diversidade genética de isolados de *Xpm*, o que sugere a ocorrência de disseminação desses patógenos para diversas regiões produtoras de mandioca do Estado do Pará, provavelmente em decorrência da troca de material de propagação vegetativa entre produtores. No entanto, a severidade da doença não apresentou correlação com a variabilidade genética ou as origens geográficas. Mesmo diante de isolados altamente agressivos foram selecionadas 23 cultivares classificadas como resistentes para o Estado do Pará.

IMPACT INDICATORS

The North region is the leader in Brazilian cassava production, emphasizing the State of Pará, where the largest national production is concentrated. In this region, cultivation is predominantly carried out by family labor, as well as its derivatives, which makes it an important crop, as it has a strong socioeconomic influence in the region. Cassava is considered a food security product, as increasing its production can help solve the problem of hunger in poor tropical regions where it can be cultivated. However, cassava crops suffer significant losses in productivity and consequently in profitability due to phytosanitary problems, such as bacteriosis caused by the bacteria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), being responsible for yield losses ranging from 30 to 80%. Therefore, the selection of resistant cultivars is known as the best control strategy against this disease. However, the intensity of the disease can vary depending on the aggressiveness of the strain and there is no information available on the genetic diversity of *Xpm* isolates from the northern region of Brazil. From this perspective, knowledge of different populations of *Xpm* existing in the State of Pará can contribute to the control of the disease, or even mitigate its spread by avoiding the introduction of more aggressive populations, in cultivation areas that are free of the pathogen or that present less aggressive isolates; as well as the selection of materials aimed at resistance to *Xpm*. Such studies are important to support cassava genetic improvement programs and disease control strategies. Therefore, the results obtained in the present work prove the existence of a great genetic diversity of *Xpm* isolates, which suggests the occurrence of dissemination of these pathogens to several cassava producing regions in the State of Pará, probably as a result of the exchange material of vegetative propagation between producers. However, the severity of the disease did not reflect genetic variability or geographic origins. Even in the face of highly aggressive isolates, 23 particularly resistant cultivars were selected for the State of Pará.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 A cultura da mandioca.....	16
2.2 A bacteriose da mandioca.....	17
2.3 A bactéria <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	19
2.4 Variabilidade dos isolados.....	20
2.4.1 Métodos utilizados para verificar a variabilidade dos isolados.....	21
2.5 Resistência de cultivares.....	24
REFERÊNCIAS	27

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1: VARIABILIDADE GENÉTICA E PATOGÊNICA DE <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i> NO ESTADO DO PARÁ.	33
1 INTRODUÇÃO.....	35
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.1 Origem dos isolados preservados de <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	38
2.2 Reativação e teste de patogenicidade dos isolados de <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	38
2.3 Extração de DNA.....	39
2.4 Análise de sequência Multilocus	39
2.5 Rep-PCR.....	43
2.6 VNTR	43
2.7 Análise dos dados	44
2.8 Correlação de matrizes de dissimilaridade	45
2.9 Avaliação da agressividade dos isolados de <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	45
2.9.1 Material Vegetal	45
2.9.2 Inoculação.....	45
2.9.3 Avaliação	46
2.9.4 Delineamento experimental e análises	47
3 RESULTADOS	48
3.1 Origem e teste de patogenicidade dos isolados bacterianos	48
3.2 Análises filogenéticas	49
3.3 Caracterização genotípica por Rep-PCR.....	53
3.4 Caracterização genotípica por VNTR.....	59
3.5 Teste de mantel.....	68
3.6 Seleção de isolados de <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i> por teste de agressividade da doença.....	69

4 DISCUSSÃO	72
5 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	77
MATERIAL SUPLEMENTAR 1:	82
MATERIAL SUPLEMENTAR 2:	85
ARTIGO 2: SELEÇÃO DE MATERIAIS DE MANDIOCA (<i>Manihot esculenta</i> CRANTZ) COM RESISTÊNCIA À BACTERIOSE.	86
1 INTRODUÇÃO.....	88
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
2.1 Teste de cultivar.....	89
2.1.1 Material vegetal	89
2.1.2 Inoculação.....	92
2.1.3 Avaliações	92
2.1.3 Delineamento experimental e análises	93
3 RESULTADOS	94
3.1 Reação de cultivares de mandioca a <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	94
4 DISCUSSÃO	100
5 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS	103
TERCEIRA PARTE	
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106

1 INTRODUÇÃO GERAL

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura de importância alimentar e industrial. O seu uso pode ser de diferentes formas, sendo que a farinha, seu principal produto, pode ser utilizada no preparo de pães, biscoitos, confeitaria, massas, produtos similares e na produção de adesivos (CARDOSO et al., 2017). Segundo a FAO, a mandioca é considerada um produto de segurança alimentar, pois, o aumento da sua produção, pode ajudar a resolver o problema da fome em regiões tropicais pobres onde pode ser cultivada.

Entretanto, as doenças podem representar limitações para esta cultura e, entre elas, a bacteriose, vulgarmente conhecida como manchas, água quente,urchadeira, dormideira e murcha bacteriana, é uma das principais, sendo responsável por perdas de rendimento que variam de 30 a 80% (LOZANO, 1986; FIALHO; PEREIRA, 1999). A doença é causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), uma bactéria vascular que penetra na planta hospedeira pelos estômatos e / ou ferimentos, causando manchas angulares nos folíolos, de cor de palha na face superior e azulada na face inferior, aparência aquosa, murcha das folhas e pecíolos, morte descendente e exsudação de goma nas hastes, além de necrose dos feixes vasculares e morte da planta (MARAITE, 1993). A planta infectada murcha e morre, sendo a doença disseminada principalmente pelo plantio de manivas infectadas (ROMEIRO; FERRAZ, 2012). A bacteriose tem ocorrido principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (FUKUDA; GOMES, 2005; PORTZ et al., 2006).

O Estado do Pará é atualmente o principal produtor de mandioca do país, com 4,0 milhões de toneladas ao ano, o que corresponde a 18% da produção nacional de mandioca. Entretanto, a produtividade da mandioca no Estado ainda é de subsistência, em torno de 15 t/ha, o que está relacionado principalmente à baixa adoção de tecnologias pelos agricultores. A bacteriose já foi detectada nas mesorregiões do Nordeste Paraense e na região metropolitana de Belém segundo dados de Ishida et al. (2016).

O estudo da variabilidade genética e patogênica de *X. phaseoli* pv. *manihotis* em países da Colômbia, Costa do Marfim e Brasil demonstram que a variabilidade do patógeno associada às diferentes variedades de mandioca resulta na variação na agressividade dos isolados em decorrência aos diferentes níveis de tolerância ao patógeno (RESTREPO et al., 2000; MARTIN et al., 2017; AQUILES et al., 2021). Nesse sentido, compreender os mecanismos pelos quais as populações bacterianas evoluem para suplantam a resistência do hospedeiro é fundamental para o desenvolvimento de estratégias visando melhorar a durabilidade da resistência (RESTREPO et al., 2004).

A resistência do hospedeiro é o método mais eficiente de controle da doença. Algumas variedades adaptadas às condições ambientais, como a Formosa recomendada pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, possuem resistência considerável à doença e permanecem resistentes durante muitos anos (ALMEIDA et al. 2009; VERDIER, 2002). Nessa perspectiva, o conhecimento de diferentes populações de *X. phaseoli* pv. *manihotis* existentes no Estado do Pará pode contribuir para o controle da doença, ou até mesmo, amenizar a disseminação da mesma ao evitar a introdução de populações mais agressivas, em áreas de cultivo isentas do patógeno ou que apresentem isolados menos agressivos; bem como a seleção de materiais visando à resistência a *X. phaseoli* pv. *manihotis*. Tais estudos são importantes para subsidiar programas de melhoramento genético da mandioca e de estratégias de controle da doença.

Os objetivos com o presente trabalho foram avaliar a variabilidade genética e patogênica de isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* por meio das técnicas de MLSA (Análise de sequência multilocus), rep-PCR (PCR baseado em sequência de elementos repetitivos), VNTR (Repetição em tandem de número variável) e pela agressividade das cepas, e selecionar cultivares de mandioca resistentes à bacteriose.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), um arbusto perene pertencente à família Euphorbiaceae e ao gênero *Manihot*, é amplamente cultivada em países tropicais da América Latina e da África onde representa o alimento básico como fonte de energia para grande parte da população (ALVES, 1990; ALMEIDA, 2005).

As raízes da mandioca, ricas em carboidratos, podem ser consumidas frescas após o cozimento, processadas em produtos alimentícios ou dadas como ração aos animais. O amido da mandioca pode ser usado numa ampla gama de indústrias, desde a fabricação de alimentos e produtos farmacêuticos até a produção de madeira compensada, papel e bioetanol. As folhas da mandioca contêm até 25% de proteínas e são mais consumidas na África e no Brasil. Principalmente, na região amazônica do Brasil no preparo da maniçoba, prato típico à base de folha de mandioca (UFUAN-ACHIDI et al., 2005; FAO, 2013).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) a mandioca é cultivada por pequenos agricultores em mais de 100 países tropicais e subtropicais. No último levantamento do IBGE o Brasil ocupou o 6º lugar na produção

mundial com aproximadamente 18 milhões de toneladas na safra de 2022, ficando atrás da Nigéria, República Democrática do Congo, Tailândia, Gana, e Cambodia (FAO, 2024).

Segundo os dados do IBGE de 2024, a região Norte se destaca na liderança da produção brasileira de mandioca, com destaque para o Estado do Pará onde se concentra a maior produção nacional. Nessa região, o cultivo é predominante de mão de obra familiar, bem como seus derivados, o que a torna uma cultura importante, pois desempenha forte influência socioeconômica na região (DERAL, 2020).

Outro estado que tem grande contribuição na produção de mandioca é o Paraná que garante à região Sul ocupar a segunda colocação na produção da raiz (IBGE, 2024). Dados do Departamento de Economia Rural (Deral) apontam que em 2019 o Brasil produziu 509 mil toneladas de fécula de mandioca, sendo 70% proveniente do Paraná. Tal fator se deve ao Estado do Paraná deter o maior e mais moderno parque industrial de fécula e de farinha de *mandioca* (AEN, 2020).

A Região Nordeste já foi a principal produtora Nacional de mandioca, porém, atualmente é considerada a terceira região de maior produção (IBGE, 2024). Esta mudança ocorreu em consequência do fenômeno das secas que se repetem com muita frequência nos seus principais estados produtores. A região Sudeste tem uma participação menor no volume da produção agrícola, porém é de grande importância na organização da cadeia produtiva da mandioca. Enquanto que a Região Centro-Oeste é a menor produtora e a mais recente na exploração da mandioca (DERAL, 2019).

2.2 A bacteriose da mandioca

O cultivo de mandioca é conduzido em diversas regiões, em geral, sem uso de insumos, sob manejo inadequado e empregando cultivares suscetíveis a doenças. Além disso, por se tratar de um cultivo de ciclo longo, as plantas são expostas às flutuantes condições climáticas e edáficas e aos diversos ataques de pragas e doenças que imperam em cada região (LOZANO et al., 1983; MATTOS; GOMES, 2000).

Entre as principais doenças responsáveis pela queda de produção e de produtividade da cultura da mandioca está a bacteriose, causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (CONSTANTIN et al., 2016). Este patógeno está presente em várias regiões do país. A doença foi relatada pela primeira vez em 1912 por Bondar, no Estado de São Paulo e, atualmente, pode ser encontrada em quase todo o território nacional (LOZANO, 1975; CABI, 2021).

A bactéria reside no xilema, porém pode sobreviver na área de ocorrência de restos culturais/solo por cerca de seis meses (SILVA et al., 2008), e a doença manifesta-se através de duas formas de sintomas. Os sintomas primários, resultantes do plantio de material contaminado, consistem em acentuadas falhas de germinação, murcha das folhas novas, seguida de morte descendente das plantas ainda na fase inicial de desenvolvimento. Os sintomas secundários caracterizam-se inicialmente pela presença de manchas foliares pequenas, de formas angulares e de aparência aquosa. À medida que a doença se desenvolve, estas manchas vão se unindo e aumentando em tamanho, ocupando toda a lâmina foliar, resultando em coloração parda. Em curto espaço de tempo, as folhas atacadas secam, os pecíolos murcham e se soltam da planta (FUKUDA; GOMES, 2005). Segundo Ceballos e Domínguez, (1980) a produção é mais afetada quando a infestação se manifesta entre o primeiro e sexto mês de idade da planta.

Os prejuízos causados pela bacteriose variam com as condições climáticas, suscetibilidade ou tolerância dos genótipos, práticas culturais empregadas, épocas de plantio e nível de contaminação do material de plantio. Segundo Umemura e Kawano (1983) as condições climáticas, a variação brusca de temperatura entre o período diurno e noturno é o fator mais importante para a manifestação severa da doença. Considera-se a amplitude diária de temperatura superior a 10 °C, mantida por um período constante acima de 5 dias, condição ideal para o pleno desenvolvimento da doença.

Devido ao hábito sistêmico do patógeno são inexistentes medidas de controle curativo, porém, alguns métodos integrados de controle devem ser utilizados como: controle cultural, sanitização da cultura, utilização de cultivares tolerantes e medidas quarentenárias visando prevenir a entrada de estipes de alta virulência em áreas de baixa ou nenhuma infestação (HILLOCKS; WYDRA, 2002).

Algumas das cultivares de mandioca com níveis de resistência à bacteriose indicadas pela Embrapa são: BRS Japonesa, BRS Moura, BRS Sacura (regiões de Cerrado e mata de transição); as BRS 417, 418 e 419 (região do Cerrado do Brasil Central) e a BRS Formosa (região semiárida do Nordeste) (EMBRAPA, 2018). Para os Estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal a cultivar BRS 399 é a mais indicada por sua característica nutritiva e por apresentar moderada resistência à doença (EMBRAPA, 2018). Para o Estado do Pará ainda não há indicação de cultivar tolerante à bacteriose.

2.3 A bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*

Xanthomonas phaseoli pv. *manihotis* (Berthet and Bondar 1915) Constantin et al. 2016 (*Xpm*) (sin. *Xanthomonas manihotis*, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*), recentemente reavaliada taxonomicamente por Constantin (2016), sendo atualmente esta a nomenclatura aceita, é uma Gammaproteobacteria pertencente à família Xanthomonadaceae, Gram-negativa, com flagelo polar, colônias brilhantes, viscosas, convexas e circulares com margens inteiras quando glicose ou sacarose estão presentes no meio, sem qualquer pigmentação (LOZANO; SEQUEIRA, 1974; VAN DEN MOOTER et al., 1987). A cor branca característica se deve à ausência do pigmento xantomonadina, uma característica rara também observada em *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* e *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (MIDHA; PATIL, 2014).

Há duas décadas, aproximadamente, foram desenhados a partir de cepas patogênicas conhecidas os *primers* XV/XK, para a detecção específica de *Xpm* (VERDIER et al. 1998). Os *primers* XK e XV foram desenhados para amplificar uma região do plasmídeo p44, que contém uma cópia extracromossômica do gene TALE1_{Xam} (VERDIER et al. 1998; BERNAL-GALEANO et al., 2018). Dessa forma, algumas variantes de *Xpm* podem não serem detectadas, embora ainda patogênicas em várias cultivares de mandioca (BERNAL-GALEANO et al., 2018), devido à ausência do plasmídeo inteiro ou porções dele em alguns grupos da população bacteriana presente no campo, pois foi determinada uma relação entre a presença de TALE1_{Xam} e a patogenicidade de *Xpm* (CASTIBLANCO et al., 2013).

Ainda para a detecção da espécie, recentemente, três métodos baseados em PCR foram relatados. O primeiro teve por objetivo melhorar a sensibilidade de detecção através de duas *nested*-PCR com os conjuntos de *primers nested* (CtermNest e RpoBNest), desenhados com base nas sequências dos produtos de PCR previamente obtidos da PCR multiplex. Este método inclui um fragmento amplamente conservado de genes efetores do tipo ativador de transcrição *Xpm* (TAL) e uma região semiespecífica de *rpoB*, resultando em um potencial de detecção mais amplo de cepas *Xpm* e capaz de detectar até mesmo a partir de plantas assintomáticas infectadas (BERNAL-GALEANO et al., 2018). Outra abordagem é a modificação no *primer* reverso descrito por Verdier et al. (1998) utilizando a mesma região *pthB* estudada por ele. Entretanto, segundo Melo et al. (2019), apesar da especificidade os *primers* XV/XK não foram capazes de amplificar o fragmento específico correspondente a *Xpm* nos diferentes ensaios realizados no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, necessitando de uma versão

otimizada do ensaio elaborado por Verdier et al. (1998) (MELO et al., 2019). A terceira estratégia comprovadamente seletiva e sensível consiste em um duplex PCR, com a utilização dos pares de *primers* *Xpm1* F/R e *Xc1* F/R que amplificam regiões cromossômicas altamente conservadas em *Xpm* e possibilitam detectar e distinguir a bactéria de *Xanthomonas cassavae*, agente da necrose bacteriana da mandioca (FLORES et al., 2019).

2.4 Variabilidade dos isolados

As bactérias apresentam eficientes mecanismos de geração de variabilidade. Arber (2000) descreveu três mecanismos de geração de variabilidade: a) pequenas mudanças pontuais nas sequências de nucleotídeos do genoma, b) rearranjo intragenômico de regiões do genoma e c) aquisição de sequências de DNA de outro organismo.

A primeira estratégia traz mudanças locais na sequência do DNA em decorrência de mutações que alteram em um, ou no máximo, dois pares de base (ROMEIRO, 2005). A segunda é um rearranjo segmento a segmento das sequências de DNA genômico por rearranjo recombinatório que também é resultante de mutações que afetam muitos pares de base. Podem ser dos tipos: deleções, duplicações, inversões, transposições e inserções. A terceira estratégia é baseada na transferência horizontal de genes e resulta na aquisição de sequências estranhas de DNA que podem ser adquiridas por transformação, transdução ou por conjugação (ARBER, 2000; ROMEIRO, 2005).

Os mecanismos citados dão origem, aleatoriamente, a alterações no material genético, as quais, por força da seleção natural, resultam em populações de organismos mais adaptadas às flutuáveis condições do ambiente, sejam elas climáticas, estádios fenológicos do hospedeiro e, ou, desenvolvendo resistência a defensivos usados em seu controle (ROMEIRO, 2005). No entanto, em decorrência das bactérias fitopatogênicas e todas as outras serem células haploides com reprodução por fissão binária (uma célula que se divide gerando duas outras células idênticas) o acúmulo de alterações do material genético pode afetar genes essenciais e levar ao comprometimento da viabilidade celular resultando na morte da célula (MARQUES, 2012).

Nesse sentido, a importância da bacteriose da mandioca está relacionada às diferentes intensidades da doença nos campos de produção, à variedade de mandioca utilizada, bem como ao próprio patógeno que apresenta variações quanto à agressividade de isolados, o que já foi identificado com maior número de ocorrência nos países da América do Sul, centro de origem da cultura e do patógeno (ELANGO; LOZANO, 1981; ALVES; TAKATSU, 1984;

VERDIER et al., 1993; RESTREPO et al 2000; MAMBA-MBAYI et al., 2014; AQUILES et al., 2021; ZÁRATE-CHAVES et al., 2021).

Os estudos de diversidade genética realizados mundialmente com *X. phaseoli* pv. *manihotis* destacam a importância do monitoramento contínuo da variabilidade populacional deste patógeno. Uma melhor compreensão da dinâmica espaço temporal das populações bacterianas em pequenas escalas é necessária para avaliar ou propor estratégias adaptadas para o controle da doença (OGUNJOBI et al. 2010; TRUJILLO et al. 2014). Além disso, o estudo da diversidade genética de uma população de patógeno é necessário para agrupá-los em linhagens genéticas, realizar estudos de distribuição geográfica e dinâmica populacional na área, estudar a estrutura populacional, gerando assim, informações importantes para o manejo do patógeno (MUNHOZ, 2011).

Estudos baseados na análise da diversidade fenotípica e genotípica do patógeno causador da bacteriose da mandioca apresentaram diferenças na virulência entre os isolados, com diferentes velocidades no surgimento de sintomas da bacteriose, devido à variação na agressividade entre os isolados (RESTREPO et al., 1999). Alves e Takatsu (1984) detectaram cinco níveis de virulência, não associados à distribuição geográfica, distinguidos entre trinta e dois isolados de diferentes áreas do Brasil e da Colômbia através de inoculações em duas cultivares de mandioca diferindo em resistência. Também observaram que a produção de amilase variou muito, mas não pôde ser correlacionada à virulência ou distribuição geográfica.

O primeiro relato sobre a diversidade entre isolados brasileiros de *Xpm* foi realizado por um grupo colombiano (RESTREPO et al., (1999), utilizando técnicas moleculares (AFLP e RFLP), e os resultados evidenciaram a existência de alta diversidade da população. No Oeste do Paraná, PORTZ et al. (2006) verificaram variabilidade de *Xpm* pelos agrupamentos da bactéria com relação à capacidade amilolítica, agressividade e isoenzimas da esterase.

No Pará, o levantamento das áreas de incidência da bacteriose foi realizado por Ishida et al. (2016), porém ainda não se têm informações sobre a diversidade desses isolados e nem ao comparativo com isolados de outras regiões.

2.4.1 Métodos utilizados para verificar a variabilidade dos isolados

Estudos de diversidade genética de *X. phaseoli* pv. *manihotis* têm sido realizados usando diferentes métodos durante as últimas décadas, incluindo polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLPs) (BERTHIER et al., 1993 ; RESTREPO et

al., 2004 ; RESTREPO e VERDIER, 1997 ; VERDIER et al., 1993 , 1994), DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) (OGUNJOBI et al., 2006 , 2007), polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado (AFLPs) (GONZALEZ et al., 2002 ; OGUNJOBI et al., 2010; TRUJILLO et al., 2014). Além disso, há marcadores rep-PCR, baseados na amplificação seletiva de regiões genômicas localizadas entre as sequências repetitivas presentes no genoma bacteriano, como a sequência REP (sequência repetitiva extragênica palindrômica) de 35-40 pb, sequência ERIC (sequência consenso intergênica repetitiva enterobacteriana) de 124-127 pb e o elemento BOX de 154 pb (VERSALOVIC et al., 1998).

Os *primers* complementares às sequências de DNA repetitivas altamente conservadas, REP, ERIC e BOX, e presentes em múltiplas cópias no genoma bacteriano, geram fragmentos de DNA com tamanhos diferentes estabelecendo *fingerprints* específicos para cepas bacterianas individuais e são extremamente confiáveis, rápidos e altamente discriminativos, bem como reprodutíveis (VERSALOVIC et al.1998; CHEGE et al., 2017).

A rep-PCR é uma ferramenta confiável em estudos epidemiológicos, para a detecção de patógenos e permite que sejam realizadas análises comparativas. Estudo realizado na Colômbia baseado nos perfis de rep-PCR evidenciou que ambos os *primers* REP e ERIC apresentaram alto nível de polimorfismo entre linhagens de *Xpm* originárias de diferentes zonas edafoclimáticas (RESTREPO et al., 2000). Esta alta variabilidade genética provavelmente ocorre em decorrência ao resultado da seleção por hospedeiros com características genéticas diferentes (RESTREPO et al., 2000).

Asgarani et al. (2015) sugerem que o ERIC-PCR seja uma ferramenta útil para a correlação entre a região geográfica e a produção de xantana, um polissacarídeo natural produzido por *Xanthomonas campestris* (GARCIA-OCHOA et al., 2000). A técnica de rep-PCR também foi considerada eficaz no Brasil para a caracterização de isolados de *Xpm* (OLIVEIRA, 2018).

Outro método que está sendo utilizado é a análise de múltiplos locos do número variável de repetições em tandem (MLVA) que se baseia na identificação do polimorfismo pelo tamanho dos fragmentos amplificados, como resultados dos eventos de inserção e deleção dentro do número variável de repetições em tandem (VNTR) (VERGNAUD; POURCEL, 2006). Os VNTRs são sequências de DNA repetidas que variam em número de cópias e estão amplamente dispersas em genomas bacterianos e são utilizados como marcador molecular para identificação das diferenças genéticas entre bactérias (VERGNAUD; DENOEU, 2000).

Estudos dos VNTRs são realizados pelo método MLVA baseado em PCR, para cada locus VNTR, o número de repetições pode ser determinado por amplificação por PCR usando *primers* complementares às sequências conservadas que flanqueiam as repetições em tandem. O tamanho do fragmento varia em relação ao tamanho e número de unidades repetidas, e os padrões de bandas podem ser analisados usando *software* para revelar o genótipo e inferir as relações filogenéticas (LI et al., 2009). Esta técnica é utilizada como uma ferramenta para estudos epidemiológicos, especialmente por identificar polimorfismo no genoma de espécies bacterianas que são geneticamente homogêneas quando analisadas por outras técnicas moleculares (LINDSTEDT, 2005).

A técnica apresenta um poder discriminatório ligeiramente superior comparado às outras. Trujillo et al. (2014) apresentam as vantagens dos VNTRs sobre os AFLPs na vigilância de populações de patógenos e sugerem a implementação de VNTRs em estudos que envolvam grande número de isolados de *Xpm* a fim de obter uma visão mais detalhada do patógeno para melhorar as estratégias de controle da doença (ARRIETA-ORTIZ et al. 2013; TRUJILLO et al. 2014). Oliveira (2018) utilizou a técnica de VNTR a fim de caracterizar os isolados de *Xpm* das principais áreas produtoras de mandioca da Bahia. Rache et al. (2019) desenvolveram esquema de MLVA com 15 repetições em tandem de número variável (VNTRs) amplificado por PCR multiplex para avaliar a diversidade de *Xpm* em escala local na costa norte da Colômbia. O método apresentou várias vantagens, pode ser amplificado a partir de DNA genômico ou de uma colônia bacteriana fresca, sem a necessidade de extração de DNA, pode ser facilmente formatado para configurações de alto rendimento, a amplificação de até quatro loci é realizada em paralelo em um PCR único e as saídas mostram alta reprodutibilidade e portabilidade (RACHE et al., 2019).

Os métodos genotípicos estão desempenhando um papel fundamental na classificação e identificação filogenética em vários níveis taxonômicos, bem como quanto às análises de diversidade de táxons procarióticos (GLAESER; KÄMPFER, 2015). Porém, para estudo de diversidade, um gene não é suficiente (MAIDEN et al., 2006), o ideal é que sejam incluídos no esquema de análise de sequências multilocus (MLSA) de seis a dez genes e, entre eles, devem conter genes relacionados à patogenicidade ou virulência, pois esses genes estão frequentemente ligados a uma seleção positiva de cepas e, portanto, na maioria das vezes exibem uma maior diversidade genética.

A técnica MLSA consiste no sequenciamento e análise das sequências de genes codificadores de proteínas funcionais (genes *housekeeping*). Esses genes são mais

conservados e essenciais para a manutenção de funções celulares básicas encontrados em qualquer organismo, por consequência, são mais estáveis em relação à mutação genética (MAIDEN et al., 2006; MARCELLETTI et al., 2010). Os genes *rpoB* (fator sigma da RNA polimerase), *dnaK* (proteína de choque térmico, Hsp70), *fyuA* (receptor dependente de tonB) e *gyrB* (subunidade β da girase do DNA), nas últimas décadas têm sido os mais utilizados para o sequenciamento e análise pela técnica da MLSA visando a caracterização e classificação de espécies do gênero *Xanthomonas* (PARKINSON et al., 2007; YOUNG et al., 2008; PARKINSON et al., 2009; AH-YOU et al., 2009; CONSTANTIN et al., 2016). Além disso, também são os mesmos genes mais utilizados para caracterização da diversidade de espécies de *Xanthomonas* (YOUNG et al., 2010; ROCKEY et al., 2015; NTAMBO et al., 2019; FERREIRA et al., 2019).

O conhecimento da diversidade genotípica de uma espécie de patógeno é um importante pré-requisito para o desenvolvimento de métodos para sua identificação e detecção. Assim, a utilização dos métodos MLSA, rep-PCR e VNTR na caracterização genotípica e sua relação com a distribuição geográfica proporcionará informações a respeito das diferentes populações de *Xpm*, contribuindo para verificação do padrão de disseminação das linhagens genéticas, ou mesmo, a introdução de uma linhagem genética mais agressiva em uma área de cultivo isenta do patógeno ou que apresente isolados de linhagem genética menos agressiva.

2.5 Resistência de cultivares

A mandioca se destina principalmente ao sustento de agricultores de baixa renda, portanto o uso de variedades tolerantes ou resistentes é considerado a principal solução para o controle da mancha bacteriana já que não existe tratamento curativo para a doença (TEIXEIRA et al., 2021).

A resistência da mandioca à *Xpm* é caracterizada principalmente por hipersensibilidade na escala vascular, não sendo observada nas folhas, configurando uma resposta mais defensiva do que uma verdadeira hipersensibilidade segundo Verdier et al. (2002). Dessa forma, a resistência ao patógeno é expressa como um desenvolvimento gradual da doença nas folhas e caules o qual o mecanismo de defesa limita a colonização bacteriana no xilema, o que inclui o reforço de barreiras constitutivas (lignificação, deposição calose e suberização), acúmulo de compostos fenólicos e oclusão de vasos (tilose) (KPÉMOUA et al., 1996).

No geral, as mesmas reações são apresentadas nos tecidos de variedades suscetíveis e resistentes. A diferença é que, nas variedades resistentes, as reações ocorrem mais cedo e com maior intensidade, de modo que a resposta defensiva diminui a extensão da doença (KPÉMOUA et al., 1996). Por isso, a resistência é considerada quantitativa (KPÉMOUA et al. 1996). Estudos realizados na Colômbia (LOZANO; LABERRY, 1982) e na Nigéria (LAMPTEY et al., 1998) abordaram o desempenho de variedades de mandioca contra a bacteriose. No Brasil, Nery-Silva et al. (2007) ao avaliar níveis de resistência de cultivares de mandioca à *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* no Estado de Minas Gerais encontraram as variedades Vassoura, Amarela, Vermelha e Castelinho e o clone CPAC88-11 que apresentaram resistência.

As variedades de mandioca são divididas em mandioca-brava, que dá origem a produtos como farinha, tucupi, goma, entre outros, e mandioca-mansa ou macaxeira ou aipim, que é usada para consumo *in natura*. Os agricultores têm conhecimento que essa divisão é feita em função do sabor amargo da mandioca-brava, que contém maior quantidade do chamado “veneno” da mandioca, capaz de levar até à morte se consumido em altas doses. Esse “veneno” na verdade corresponde aos compostos cianogênicos, que existem na mandioca e são liberados durante a mastigação. Os povos antigos que atuaram na domesticação da mandioca selecionavam materiais com maior teor desses compostos cianogênicos por verificarem que a mandioca ficava mais protegida do ataque de animais, insetos e doenças (CUNHA; FARIAS-NETO, 2016).

Há uma grande diversidade de variedades de mandioca. Essa diversidade é visível na cor, na forma e na textura da raiz, na forma e na cor da folha, na cor da rama e na arquitetura da planta (FUKUDA; GUEVARA, 1998). Além da variação visível, existe a variação que faz com que a planta produza mais ou menos, seja mais resistente ou suscetível às doenças, adapte-se melhor a uma localidade ou a outra. As variações ambientais influenciam na produção de raízes e na adaptação a locais, mas há também muita variação genética na mandioca (CUNHA; FARIAS-NETO, 2016).

O uso de variedades de mandioca resistentes a patógenos é desejável, mas a resistência vegetal pode ser suplantada devido ao aparecimento de novas variantes dentro da população de patógenos (LOZANO, 1986; TEIXEIRA et al., 2021). Essas variantes podem causar mudanças nas populações de patógenos que podem resultar, por exemplo, da perda de reconhecimento por variedades resistentes, proporcionando assim uma vantagem adaptativa (VERA-CRUZ et al., 2000).

Em geral, as perdas de produção ocasionadas pela bacteriose podem ser estimadas em 30%, mas em cultivos implantados com variedades suscetíveis e em locais com condições favoráveis para o desenvolvimento da doença, os prejuízos podem ser totais. Por sua vez, em genótipos resistentes, mesmo com a ocorrência de condições favoráveis, as perdas de produção não costumam ultrapassar os 30% (UMEMURA; KAWANO, 1983).

Portanto, a avaliação contínua da diversidade genética de *X. phaseoli* pv. *manitotis* e a utilização de representantes de diferentes linhagens genéticas em testes de resistência contribuirá para a triagem de variedades resistentes de mandioca direcionadas para a doença, sob as condições ideais para a efetiva patogenicidade (RESTREPO et al., 2000; VERA-CRUZ et al. 2000; ZINSOU et al., 2006).

REFERÊNCIAS

- AEN – Agência de notícias do Paraná. Disponível em: <www.aen.pr.gov.br>. **Acesso em:** 01 de outubro de 2021.
- AH-YOU, Nathalie et al. Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 306-318, 2009.
- ALMEIDA, C. O. et al. Avaliação preliminar de impacto social de cultivar de mandioca resistente à bacteriose: o caso da formosa no Estado da Bahia. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 5, p. 1020-1025, 2009.
- ALMEIDA, J.; FERREIRA FILHO, J. R. **Mandioca: uma boa alternativa para alimentação animal**. 2005.
- ALVES, A. A. C. et al. Fisiologia da mandioca. EMBRAPA-CNPMF, 1990.
- ALVES, M. L. B.; TAKATSU, A. Variability in *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 485-494, 1984.
- AQUILES, K. R. et al. Reaction of Sweet Cassava Genotypes to *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* From Three Regions of Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 13, n. 4, 2021.
- ARBER, W. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 2000.
- ARRIETA-ORTIZ, M. L. et al. 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.
- ASGARANI, E. et al. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR based genetic diversity of *Xanthomonas* spp. and its relation to xanthan production. **Iranian journal of microbiology**, v. 7, n. 1, p. 38, 2015.
- BERNAL-GALEANO, V. et al. Development of a multiplex nested PCR method for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Cassava. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 4, p. 341-350, 2018.
- BERTHIER, Y. et al. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 851-859, 1993.
- BONDAR G. Una nova molestia bacteriana das hastas da mandioca. **Chacaras e Quintaes**, Sao Paulo, v. 5, p. 15-18, 1912.
- CABI, 2021. Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. **Disponível em:** <www.cabi.org/isc>.
- CASTIBLANCO, L. F. et al. TALE 1 from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* acts as a transcriptional activator in plant cells and is important for pathogenicity in cassava plants. **Molecular plant pathology**, v. 14, n. 1, p. 84-95, 2013.

CEBALLOS, L. F.; DOMÍNGUES, O. C. **Descrição das Doenças da Mandioca**. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 23p, 1980.

CHEGE, M. N. et al. Phenotypic and genotypic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing bacterial blight disease of cassava in Kenya. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 5, n. 02, p. 038-044, 2017.

CONSTANTIN, E. C. et al. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology**, v. 65, n. 5, p. 792-806, 2016.

CUNHA, E. F. M.; DE FARIAS NETO, J. T. Melhoramento genético da mandioca para o estado do Pará. **Embrapa Amazônia Oriental-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2016.

DERAL - Departamento de Economia Rural - Prognóstico Cultura da mandioca novembro de 2020. **Disponível em:** <

http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2019-12/Mandioca%202020.pdf>. **Acesso em:** 28 de setembro de 2021.

ELANGO, F.; LOZANO, J. C. Pathogenic variability of *Xanthomonas manihotis*, the causal agent of cassava bacterial blight. **Fitopatol. Bras**, v. 6, p. 57-63, 1981.

EMBRAPA. Principais variedades de mandioca recomendadas para o Norte, Nordeste e Centro-sul do Brasil. **Disponível em:** <

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/173763/1/folder-Variedades-Mandioca-Ainfo.pdf>>. **Acesso em:** 21 de setembro de 2018.

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. **Disponível em:** <
<http://www.fao.org/faostat/pt/>>. **Acesso em:** 11 de março de 2024.

FAO. **Produzir mais com menos: Mandioca—Um guia para a intensificação sustentável da produção**. (Informe de Política), Rome, 2013.

FERREIRA, M. A. S. V. et al. *Xanthomonas citri* pv. *viticola* affecting grapevine in Brazil: Emergence of a successful monomorphic pathogen. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 489, 2019.

FIALHO, J. de F.; PEREIRA, A. V. Importância do controle da bacteriose na cultura da mandioca. **Embrapa Cerrados-Séries anteriores (INFOTECA-E)**, 1999.

FLORES, C. et al. Development of a duplex-PCR for differential diagnosis of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* and *Xanthomonas cassavae* in cassava (*Manihot esculenta*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 105, p. 34-46, 2019.

FUKUDA, C.; GOMES, J. C. **Bacteriose da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2005.

FUKUDA, W. M. G.; GUEVARA, C. L. **Descritores morfológicos e agronômicos para a caracterização de mandioca** (*Manihot esculenta* Crantz). Cruz das Almas, BA: Embrapa/CNPMF, 1998. 38 p. (Documentos; 78).

GARCIA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 7, p. 549-579, 2000.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and applied microbiology**, v. 38, n. 4, p. 237-245, 2015.

GONZALEZ, C. et al. Characterization of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by PCR-based DNA fingerprinting techniques. **FEMS microbiology letters**, v. 215, n. 1, p. 23-31, 2002.

HILLOCKS, R. J.; WYDRA, K. Bacterial, Fungal and Nematode disease. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. C. (Ed.). **Cassava: Biology, Production and Utilization**. New York/USA: CAB International, p.261-280, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Disponível em:** <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. **Acesso em:** 28 de setembro de 2021.

ISHIDA, A. K. N. et al. Incidência da bacteriose da mandioca (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) no Estado do Pará. **Embrapa Amazônia Oriental-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2016.

KPÉMOUA, K. et al. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 1131-1143, 1996.

LAMPTEY, J. N. L et al. Incidence and severity of African cassava mosaic disease (ACMD) and cassava bacterial blight (CBB) on some local and exotic cassava varieties in different ecological zones of Ghana. **Ghana Journal of Agricultural Science**, v. 31, n. 1, p. 35-43, 1998.

LI, W. et al. Bacterial strain typing in the genomic era. **FEMS microbiology reviews**, v. 33, n. 5, p. 892-916, 2009.

LINDSTEDT, B. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. **Electrophoresis**, v. 26, n. 13, p. 2567-2582, 2005.

LOZANO, J. C. Bacterial blight of cassava. **PANS Pest Articles & News Summaries**, v. 21, n. 1, p. 38-43, 1975.

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

LOZANO, J. C. et al. **Problemas no cultivo da mandioca**. 1983.

LOZANO, J. C.; LABERRY, R. Screening for resistance to cassava bacterial blight. **Plant disease**, v. 66, n. 4, p. 316-318, 1982.

LOZANO, J. C.; SEQUEIRA, L. Bacterial blight of cassava in Colombia: epidemiology and control. **Phytopathology**, v. 64, n. 1, p. 83-88, 1974.

MAIDEN, M. C. J. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 561-588, 2006.

MAMBA-MBAYI, G. et al. Characterization of Congolese Strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* associated with Cassava Bacterial Blight. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2014.

MARAITE, H. *Xanthomonas campestris* pathovars on cassava: cause of bacterial blight and bacterial necrosis. *Xanthomonas*, p. 18-25, 1993.

MARCELLETTI, S. et al. Multilocus sequence typing reveals relevant genetic variation and different evolutionary dynamics among strains of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. **Diversity**, v. 2, n. 11, p. 1205-1222, 2010.

MARQUES, M. do V. **Biologia molecular e genética bacteriana**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, v. 348, 2012.

MARTIN, A. A. et al. Geographical distribution and incidence of cassava bacterial blight (*Manihot esculenta* Crantz) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in two agro-ecological zones of Côte d'Ivoire. **Plant Pathology Journal**, v 16, n. 1, p. 1-11, 2017.

MATTOS, P.L.P.; GOMES, D.C. (Eds.) **O cultivo de mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2000.

MELO, R. de C. C. et al. Improvement of the specific detection of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* based on the *pthB* gene. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 41, 2019.

MIDHA, S.; PATIL, P. B. Genomic insights into the evolutionary origin of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and its ecological relatives. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 20, p. 6266-6279, 2014.

MUNHOZ, C. F. et al. Genetic diversity and a PCR-based method for *Xanthomonas axonopodis* detection in passion fruit. **Phytopathology**, v. 101, n. 4, p. 416-424, 2011.

NERY-SILVA, F. A. et al. Reação de germoplasma de mandioca a *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 3-10, 2007.

NTAMBO, M. S. et al. Identification and characterization of *Xanthomonas albilineans* causing sugarcane leaf scald in China using multilocus sequence analysis. **Plant Pathology**, v. 68, n. 2, p. 269-277, 2019.

OGUNJOBI, A. A. et al. Comparative analysis of genetic variation among *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* isolated from the western states of Nigeria using RAPD and AFLP. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 132-138, 2010.

OGUNJOBI, A. A. et al. Molecular Genetic study of Cassava Bacterial Blight Casual agent in Nigeria Using Random Amplified Polymorphic DNA. **Electron J Environ Agr Food Chem**, v. 6, p. 2364-2376, 2007.

OGUNJOBI, A. A. Molecular variation in population structure of *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* in the south eastern Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 20, 2006.

OLIVEIRA, L. B. Comparação entre marcadores eric, box e vntrs visando estudos populacionais de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, agente causal da bacteriose da mandioca. Dissertação. 51p. 2018.

PARKINSON, N. et al. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 2881-2887, 2007.

- PARKINSON, N. et al. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 264-274, 2009.
- PORTZ, R. L. et al. Caracterização de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 3, p. 413-419, 2006.
- RACHE, L. et al. An optimized microsatellite scheme for assessing populations of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*. **Phytopathology**, v. 109, n. 5, p. 859-869, 2019.
- RESTREPO, S. et al. 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. et al. 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. et al. Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. **Phytopathology**, v. 90, n. 7, p. 683-690, 2000.
- 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.
- ROCKEY, W. et al. Multilocus sequence analysis reveals genetic diversity in xanthomonads associated with Poinsettia production. **Plant Disease**, v. 99, n. 6, p. 874-882, 2015.
- ROMEIRO, R. da S.; FERRAZ, H. G. M. **O essencial da Fitopatologia: agentes causais: Volume 2. Bactéria como patógenos de plantas – Viçosa, MG: UFV, DFP, 2012.**
- ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2 ed. Editora UFV, 2005.
- SILVA, M. S. et al. Caracterização de Acessos de mandiocas coloridas e açúcaradas quanto a resistência à Bacteriose na Embrapa Cerrados. **In: IX Simpósio Nacional do Cerrado e II Simpósio Internacional Savanas Tropicais**, 2008, Brasília. Anais do IX Simpósio Nacional do Cerrado e II Simpósio Internacional Savanas Tropicais. Planaltina: Embrapa Cerrados, v. 1, 2008.
- TEIXEIRA, J. H. S. et al. Evaluation of resistance to bacterial blight in Brazilian cassava germoplasm and disease-yield relationships. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, p. 324-335, 2021.
- TRUJILLO, C. A. et al. A complex population structure of the cassava pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in recent years in the Caribbean Region of Colombia. **Microbial ecology**, v. 68, n. 1, p. 155-167, 2014.
- UFUAN-ACHIDI, A. et al. The use of cassava leaves as food in Africa. **Ecology of Food and Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 423-435, 2005.
- UMEMURA, Y.; KAWANO, K. Field assessment and inheritance of resistance to cassava bacterial blight 1. **Crop science**, v. 23, n. 6, p. 1127-1132, 1983.

- VAN DEN MOOTER, M. et al. Comparison between *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (ISPP List 1980) and *X. campestris* pv. *cassavae* (ISPP List 1980) by means of phenotypic, protein electrophoretic, DNA hybridization and phytopathological techniques. **Microbiology**, v. 133, n. 1, p. 57-71, 1987.
- VERA-CRUZ, C. M. et al. Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 25, p. 13500-13505, 2000.
- VERDIER, V. et al. Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Microbiology**, v. 139, n. 11, p. 2591-2601, 1993.
- VERDIER, V. et al. Molecular characterization of the incitant of cowpea bacterial blight and pustule, *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*. **European journal of plant pathology**, v. 104, n. 6, p. 595-602, 1998.
- VERDIER, V. et al. Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4478-4486, 1994.
- VERDIER, V. Bacteriose vascular (o añublo bacteriano) de la yuca causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. En CIAT eds **La yuca en el Tercer Milenio Sistemas modernos de producción procesamiento utilización y comercialización**, p. 148-159, 2002.
- VERGNAUD, G.; DENOEUDE, F. Minisatellites: mutability and genome architecture. **Genome Research**, v. 10, n. 7, p. 899-907, 2000.
- VERGNAUD, G.; POURCEL, C. Multiple locus VNTR (variable number of tandem repeat) analysis. **Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes**, p. 83-104, 2006.
- VERSALOVIC, J. et al. Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In: Bacterial genomes. **Springer**, Boston, MA, p. 437-454, 1998.
- YOUNG, J. M. et al. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and applied microbiology**, v. 31, n. 5, p. 366-377, 2008.
- YOUNG, J. M. et al. New Zealand strains of plant pathogenic bacteria classified by multi-locus sequence analysis; proposal of *Xanthomonas dyei* sp. nov. **Plant pathology**, v. 59, n. 2, p. 270-281, 2010.
- ZÁRATE-CHAVES, C. A. et al. Cassava diseases caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* and *Xanthomonas cassavae*. **Molecular Plant Pathology**, 2021.
- ZINSOU, V. et al. Leaf waxes of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in relation to ecozone and resistance to *Xanthomonas* blight. **Euphytica**, v. 149, n. 1, p. 189-198, 2006.

ARTIGO 1: VARIABILIDADE GENÉTICA E PATOGÊNICA DE *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* NO ESTADO DO PARÁ.

Sandra Valéria Dias Cardoso¹; Alessandra Keiko Nakasone²; Ricardos Magela de Souza¹

¹ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras 37200-900, Brasil

² Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Dr. Enéas Pinheiro s/n, Belém 66095-903, Brasil

RESUMO

A bacteriose, causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), é a doença de maior importância econômica na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na maioria das regiões produtoras do Brasil, sendo especialmente problemática nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país. O estudo da variabilidade do patógeno é uma ferramenta importante para auxiliar programas de melhoramento genético e estudos epidemiológicos da doença, principalmente onde não há informações disponíveis sobre a diversidade da bactéria, como é o caso da região norte. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética e patogênica dos isolados de *Xpm* do Estado do Pará por meio das técnicas de MLSA (Análise de sequência multilocus), rep-PCR (PCR baseado em sequência de elementos repetitivos), pela análise multilocus VNTR (MLVA) e através do teste de agressividade. Com base nos resultados obtidos a técnica MLSA foi eficiente para identificar e demonstrar que existe variabilidade genética mediante a abertura de vários clados entre os isolados da mesma espécie, enquanto que a REP-PCR somente separou eficientemente as diferentes espécies, mas com pouca inferência sobre informações de variabilidade entre os isolados de *Xpm*. O melhor método considerado para demonstrar a variabilidade entre os isolados e a relação de proximidade com cepas de mesma origem foi através da técnica MLVA. Porém, o polimorfismo dos patógenos não pode ser determinado pelos locais de origem, pois diferentes haplótipos estão presentes de forma dispersa em vários municípios produtores de mandioca. A similaridade de cada dendograma VNTR variou entre 80 e 100%. No teste de agressividade, todos isolados testados na cultivar BRS Poti induziram sintomatologia típica da doença sendo demonstrada a existência de variabilidade, porém com poucos dados relacionados à variabilidade genética. Portanto, o presente trabalho torna evidente que a diversidade genética encontrada entre os isolados de *Xpm* originários do Estado do Pará não está correlacionada à origem geográfica e nem à patogenicidade.

Palavras-chave: severidade da doença; diversidade genética; rep-pcr; mlsa; vntr.

ABSTRACT

Bacteriosis, caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), is the disease of greatest economic importance in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivation in most producing regions of Brazil, being especially problematic in the Central-West, Southeast and South regions of the country. The study of pathogen variability is an crucial tool to assist genetic improvement programs and epidemiological studies of the disease, especially where there is no information available on the diversity of the bacteria, as is the case in the northern region. The present work aimed to evaluate the genetic and pathogenic variability of *Xpm* from the State of Pará using the techniques of MLSA (Multilocus Sequence Analysis), rep-PCR (PCR based on sequence of repetitive elements), VNTR multilocus analysis (MLVA) and the aggressiveness test. The results obtained for the investigation of *Xpm* by the MLSA technique demonstrated that the technique was efficient in identifying and demonstrating that there is genetic variability through the opening of several clades among isolates of the same species, while by REP-PCR it only efficiently separated the different species but provided limited information on the variability among *Xpm* isolates. The best method considered to demonstrate the variability between isolates and the proximity relationship with strains of the same origin was through the MLVA technique. However, the polymorphism of the pathogens cannot be determined by the places of origin, as different haplotypes are present in a dispersed form in several cassava-producing municipalities. The similarity of each VNTR dendrogram varied between 80 and 100%. In the aggressiveness test, all isolates tested in the BRS Poti cultivar induced symptoms typical of the disease, demonstrating the existence of variability, but with little data related to genetic variability. Therefore, the present work makes it clear that the genetic diversity found among *Xpm* isolates originating in the State of Pará is not correlated with geographic origin or pathogenicity.

Keywords: severity of the disease. genetical diversity. Rep-PCR. MLSA. VNTR.

1 INTRODUÇÃO

Originária da América do Sul, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) constitui um dos principais alimentos energéticos para mais de 700 milhões de pessoas no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento (EMBRAPA, 2022). A cultura está amplamente difundida em países tropicais dos continentes americano, africano e asiático e representa uma das maiores contribuições da América para a erradicação da fome em regiões pobres do mundo (SIVIERO et al., 2019).

A mandioca é a mais antiga planta cultivada no Brasil, hoje o quarto maior produtor mundial de acordo com o Levantamento Sistemático da Produção (LSPA) de fevereiro/2022, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, com produção de aproximadamente 18 milhões de toneladas, cerca de 10% da produção mundial (DERAL, 2022; IBGE, 2024').

A mandioca, por ser uma cultura de fácil adaptação, é cultivada em todas as regiões e municípios brasileiros, porém a maior produção se concentra nas regiões Norte e Sul do País. Na safra de janeiro de 2024, a Região Norte representou 35,7%; o Sul, 21,7%; Nordeste, 19,7%; Sudeste, 13,5% e Centro-Oeste com 8% (IBGE, 2024).

Um dos fatores limitantes à cultura é a ocorrência de doenças. Entre elas a murcha bacteriana ou bacteriose da mandioca, causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Berthet and Bondar 1915) Constantin et al. 2016 (*Xpm*), é considerada a mais destrutiva e economicamente importante na maioria das regiões produtoras do Brasil, sendo especialmente problemática nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país (FIALHO et al., 2017).

Em variedades suscetíveis, cultivadas em climas favoráveis ao desenvolvimento da bacteriose, os prejuízos causados à produção das raízes podem variar de 30% a 100%, podendo, portanto, inviabilizar o cultivo da cultura (FIALHO et al., 2017).

As folhas são infectadas através de estômatos ou ferimentos nos tecidos epidérmicos e os sintomas da bacteriose podem ser descritos como um complexo de lesões que envolvem manchas foliares, murcha, exsudação de látex, necrose do sistema vascular e morte descendente dos ramos (LOZANO; SEQUEIRA, 1974; MASSOLA; BEDENDO, 2005). Os sintomas iniciais nas folhas se manifestam na forma de pequenas lesões encharcadas e poligonais, que evoluem para manchas irregulares, podendo cobrir grandes extensões da folha, provocando seu secamento. A bactéria, ao colonizar sistemicamente a planta, agrava os sintomas pela exsudação de látex nas hastes infectadas, murcha e morte descendente. Os sintomas sistêmicos também podem ser verificados por cortes transversais ou longitudinais das hastes, que revelam necrose dos feixes vasculares. Em casos mais graves, as raízes são

afetadas, exibindo descolorações dos feixes vasculares e apodrecimento (PERUCH et al., 2013).

A disseminação da bactéria pode ocorrer a curtas distâncias por meio dos respingos da água da chuva, e a longa distância, pelo intercâmbio de material de propagação doente, principalmente pelos produtores (PERUCH et al., 2013). Segundo Portz et al., (2006) a bacteriose pode ocorrer com diferentes intensidades dependendo da variedade de mandioca, bem como do próprio patógeno que apresenta variações quanto à agressividade de isolados, o que já foi identificado com maior número de ocorrência nos países da América do Sul, centro de origem da cultura e do patógeno (ELANGO; LOZANO, 1981; ALVES; TAKATSU, 1984; VERDIER et al., 1993).

O estudo da diversidade genética de uma população de patógeno é necessário para agrupá-los em linhagens genéticas, realizar estudos de distribuição geográfica e dinâmica populacional na área, estudar a estrutura populacional, gerando assim, informações importantes para o manejo do patógeno (MUNHOZ, 2011).

Para a bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, a diversidade tem sido avaliada com diferentes técnicas moleculares, como polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) (RESTREPO; VERDIER, 1997); amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) (OGUNJOBI et al., 2006, 2007); polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) (RESTREPO et al., 2000); e também pela Rep-PCR que é uma técnica baseada na amplificação seletiva de regiões genômicas localizadas entre as sequências repetitivas altamente conservadas presentes no genoma bacteriano e são extremamente confiáveis, rápidos e altamente discriminativos, bem como reprodutíveis (VERSALOVIC et al.1998; CHEGE et al., 2017).

A análise de sequências multilocus (MLSA) é uma abordagem baseada em sequências de nucleotídeos que utiliza marcadores conservados, estáveis e com taxas de evolução relativamente baixas (RACHE et al, 2023). Permite a comparação de isolados e da epidemiologia global, para estudos de diversidade genética de espécies de *Xanthomonas* são utilizados em maior frequência os genes *rpoB* (fator sigma da RNA polimerase), *dnaK* (proteína de choque térmico, Hsp70), *fyuA* (receptor dependente de tonB) e *gyrB* (subunidade β da girase do DNA) (YOUNG et al., 2010; ROCKEY et al., 2015; NTAMBO et al., 2019; FERREIRA et al., 2019). No entanto, algumas bactérias são consideradas geneticamente monomórficas, pois não exibem variabilidade suficiente em seus genes de manutenção

essenciais para a manutenção da função celular básica, tornando esta abordagem insuficientemente resolutive (ACHTMAN, 2008).

Mais recentemente a técnica de número variável de marcadores de repetição em tandem (VNTR) está sendo utilizada para estudo de diversidade genética (RACHE et al., 2019). Os loci de repetição em tandem (TR) são abundantes em genomas tanto em procarióticos como em eucarióticos e podem ser polimórficos no número de repetições entre cepas. Os loci polimórficos, referidos como loci TR de número variável (VNTR), podem ter de duas a dezenas de alelos em uma população. Assim, múltiplos VNTRs combinados podem, teoricamente, gerar um grande número de genótipos (CHIOU, 2010).

A taxa de mutação dos VNTRs também varia entre os organismos. A ampla gama de taxas de mutação entre VNTRs produz uma ampla diversidade alélica, tornando estes marcadores úteis para avaliar a relação genética entre cepas evoluídas ao longo de várias escalas de tempo (KEIM et al., 2004; RACHE et al., 2023). Consequentemente, a análise multilocus VNTR (MLVA) é uma ferramenta molecular apropriada para a vigilância epidemiológica global e análise filogenética de patógenos bacterianos (RACHE et al., 2023).

Alguns trabalhos evidenciaram variabilidade e mudanças na população bacteriana de *Xpm* ao longo do tempo enquanto outros demonstraram um forte agrupamento por origem geográfica (RESTREPO; VERDIER, 1997; RESTREPO et al., 2000; BART et al., 2012; RACHE et al., 2019). Isto indica a influência significativa das condições ambientais na estrutura da população de patógenos que resulta em diferentes cepas dominantes em diferentes regiões geográficas (AN et al., 2020).

Grandes variações na agressividade têm sido relatadas entre isolados de vários países e de diferentes áreas dentro de um determinado país (GROUSSON et al., 1990; MARAITÉ, 1993; MAMBA-MBAYI et al., 2014; ZÁRATE-CHAVES et al., 2021). A variabilidade patogênica também já foi detectada no Brasil em cepas originárias de diferentes regiões geográficas, em escala regional, no Estado do Pará foi observada variabilidade de agressividade do patógeno para os isolados de originário de diferentes municípios. (CARDOSO et al., 2015; AQUILES et al., 2021). No entanto, não há definição clara sobre todas as interações estabelecidas entre cultivares de mandioca e isolados que resultam na variação dos sintomas, porém, estudos sobre efetores TAL sugerem moderada relação de cópias de gene *tal* com a severidade da doença (BART et al., 2012).

Diante de estudos realizados no Brasil, os quais evidenciaram haver variabilidade genética entre os isolados da bactéria presentes nos diferentes municípios amostrados

(PORTZ, 2003; OLIVEIRA et al., 2023). No entanto, ainda não se têm informações sobre a caracterização genotípica de isolados *Xpm* pertencentes aos municípios produtores de mandioca do Estado do Pará.

Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a variabilidade genética e patogênica de isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* do Estado do Pará por meio das técnicas de MLSA, MLVA, rep-PCR e pelo teste de agressividade.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Origem dos isolados preservados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*

Foram utilizados isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* pertencentes à coleção bacteriana do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental (Tabela 1), com a identificação confirmada por PCR utilizando os *primers* específicos XV/XK (ISHIDA et al., 2016). Os isolados foram coletados entre os anos de 2011 e 2017, em municípios de regiões produtoras de mandioca do Estado do Pará, e preservados em tubos plásticos de criogenia (2,0 mL), contendo 1,0 mL de água de torneira esterilizada, em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

2.2 Reativação e teste de patogenicidade dos isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*

Para a reativação os isolados foram repicados para placas de Petri contendo o meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970), pelo método de estrias paralelas e incubados a 28°C por 48 horas. A seguir foram submetidos ao teste de patogenicidade por inoculação via pulverização da face inferior das folhas com suspensão bacteriana na concentração de 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL ($A_{600} = 0,3$). O teste foi realizado com plantas da variedade Chifre de boi, as quais foram mantidas por 24 horas depois da inoculação em câmara úmida em casa-de-vegetação.

Após o aparecimento dos sintomas, o patógeno foi reisolado dos frangmentos foliares retirados dos bordos das lesões. Após o corte, foi realizada a desinfestação com álcool 70%, solução de hipoclorito de sódio a 1% seguida de lavagem com água destilada (ADE). Posteriormente, foi adicionada uma gota de ADE em placa de Petri juntamente com os fragmentos do tecido infectado, em seguida, macerados com bastão de vidro flambado (MARIANO; SOUZA, 2016). E por fim, foi realizada a repicagem para placas de Petri contendo o meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) para uso nos ensaios.

2.3 Extração de DNA

Para a extração de DNA, alíquotas de 1,5 mL de cultura bacteriana crescida em meio líquido foram centrifugadas e os sedimentados ressuspensos com 567 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM), 30 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20% e 3 µL de proteinase K 20 mg/mL. A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C. Em seguida, foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) 10% e a mistura incubada a 65°C. Após a extração com clorofórmio e isopropanol, o DNA foi ressuspendido em 90 µL de TE e 10 µL de RNase (AUSUBEL et al., 1992). A quantificação do DNA foi realizada utilizando-se o padrão de peso molecular Low DNA *mass ladder* (Invitrogen) e o programa LabImage 1D L340 (Loccus Biotecnologia).

2.4 Análise de sequência Multilocus

Utilizou-se quatro regiões gênicas para a análise de sequência multilocus (*dnaK*, *gyrB*, *rpoD*, *fyuA*) selecionadas com base em estudos anteriores (CUBERO e GRAHAM, 2004; FARGIER et al., 2011; HAMZA et al., 2012). Foram utilizados os *primers* do gene *dnaK* (XdnaK1F 5' GGTGGAAGACCTGGTCAAGA 3' e XdnaK1R 5' TCCTTGACYTCGGTGAAGTC 3'), *gyrB* (XgyrB1F 5' ACGAGTACAACCCGGACAA 3' e XgyrB1R 5' CCCATCARGGTGCTGAAGAT 3'), *rpoD* (XrpoD1F 5' TGGAACAGGGCTATCTGACC 3') e (XrpoD1R 5' CATTCYAGGTTGGTCTGRTT 3') e *fyuA* (XfyuA1F 5' AGCTACGAYGTGCGYTACGA 3') e (XfyuA1R 5' GTTCACGCCRAACTGGTAG 3'), respectivamente.

A reação foi realizada em volume de 40 µL, contendo 5 µL 5X Taq buffer; 3mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 0,1 mM de cada *primer*; 0,025 U de enzima Taq DNA polimerase, 1 µL de modelo de DNA (25 ng µL⁻¹) e completada com o volume de 20,2 µL de água livre de nuclease. A amplificação foi realizada em termociclador Therm 1000 Axigen Maxigene, utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 94°C, por 3 min.; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C, por 30", anelamento por 30" a 54 °C para todos os *primers* e extensão a 72°C por 1 min., com um ciclo final de extensão a 72°C por 10 min. (YOUNG et al., 2008). Os produtos amplificados (*dnaK* – 940pb, *gyrB* – 865pb, *rpoD* – 875pb e *fyuA* – 698bp), foram analisados em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 1X corados com *Gel Red Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium®). O marcador utilizado foi de 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Os produtos da PCR foram purificados utilizando-se o Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acordo com as indicações do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados pela empresa ACTGene Análise Moleculares.

Alinhamentos múltiplos de sequências de nucleotídeos foram construídos, utilizando a ferramenta CLUSTAL W (THOMPSON et al 1994) e as análises filogenéticas foram realizadas pelo método de máxima parcimônia (MP) utilizando o programa MEGA 10.2.6. A confiabilidade dos ramos foi verificada pela análise *bootstrap*, utilizando 1000 repetições (KUMAR et al., 2008). A estimativa da diversidade evolutiva média dos isolados e distância genética entre eles foram calculadas usando o modelo de substituição de distância *p* com 1000 replicações de *bootstrap* no mesmo programa (TAMURA et al., 2013).

Tabela 1- Isolados bacterianos, planta hospedeira e localidade de origem, patogenicidade e *primers* utilizados.

Identificação	Espécies	Hospedeiro	Procedência	Teste de patogenicidade ^d	Primer específico XV/XK ^c
Xam ^a 1	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i> ^b	<i>Manihot esculenta</i>	Acará - PA	+	+
Xam 2	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Castanhal-PA	+	+
Xam 3	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Castanhal-PA	+	+
Xam 4	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Castanhal-PA	+	+
Xam 5	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Castanhal-PA	+	+
Xam 6	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Castanhal-PA	+	+
Xam 8	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Castanhal-PA	+	+
Xam 10	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Castanhal-PA	+	+
Xam 11	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Moju – PA	+	+
Xam 12	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Castanhal-PA	+	+
Xam 13	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Acará - PA	+	+
Xam 14	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Capitão Poço - PA	+	+
Xam 15	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Acará - PA	+	+
Xam 16	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Acará - PA	+	+
Xam 17	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Acará - PA	+	+
Xam 18	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Acará - PA	+	+
Xam 19	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Acará - PA	+	+
Xam 20	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Acará - PA	+	+
Xam 21	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Ananindeua - PA	+	+
Xam 22	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Santa Izabel - PA	+	+
Xam 23	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Santa Izabel - PA	+	+
Xam 24	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Capanema - PA	+	+
Xam 25	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Tracuateua - PA	+	+
Xam 26	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Tracuateua - PA	+	+
Xam 27	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Igarapé Açu - PA	+	+
Xam 28	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Igarapé Açu - PA	+	+
Xam 29	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Igarapé Açu - PA	+	+

Xam 30	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	São Francisco do Pará - PA	+	+
Xam 31	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Bragança - PA	+	+
Xam 32	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Castanhal-PA	+	+
Xam 35	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Igarapé Açu - PA	+	+
Xam 36	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Tailândia - PA	+	+
Xam 37	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Belém - PA	+	+
Xam 38	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Castanhal-PA	+	+
UFU 13 ^f	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Centralina - MG	+	+
1163 ^f	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Brasília	+	+
Tomate ^e	<i>Xanthomonas perforans</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	PA	NA	-
Hort. 9 ^e	<i>Xanthomonas perforans</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Altamira- PA	NA	-
PA-1 ^e	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	<i>Passiflora</i> sp.	PA	NA	-
Xcc ^e	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> <i>Cichorium intybus</i>	PA	NA	-
PMH1 ^e	<i>Klebsiella variicola</i>	subsp. <i>intybus</i>	Altamira- PA	+	-
UFU 152 ^e	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lagamar - MG	-	-
UFU 122 ^e	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Lagamar - MG	-	-
Prog. 125 ^e	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	MG	+	-
UFLA 2 ^e	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	MG	+	-
UFLA 4 ^e	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	MG	+	-

a Isolados da Coleção Bacteriológica da Embrapa Amazônia Oriental.

b Identificação baseada na PCR específica para *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*.

c PCR específica para *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*

d Teste de patogenicidade em plantas hospedeiras.

e Isolados usados como controle negativo.

f Controles positivos.

NA: Teste não aplicado.

2.5 Rep-PCR

Para a técnica rep-PCR foram utilizados os pares de *primers* correspondentes às regiões: REP - REPIR-I (5' IIICGICGICATCIGGC 3') e REP-2I (5' ICGICTTATGIGGCCTAC 3'), (LOUWS et al., 1994; OPGENORTH et al., 1996); ERIC - ERIC1R (5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3') e ERIC2 (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3') (LOUWS et al., 1994; OPGENORTH et al., 1996); e BOX - BOXAIR (5' CTAC GGCAAGGCGACGCTGACG 3') (LOUWS et al., 1994; OPGENORTH et al., 1996). Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen Brasil LTDA. As reações foram realizadas em volume de 25 µL, contendo 2,5 µL 10X Taq buffer; 2,0 µL de MgCl₂ (25 mM); 1 µL de dNTP (10 mM); 2 µL de cada *primer* (10 µM); 0,5 µL de enzima Taq DNA polimerase (5U/ µL) (Invitrogen), 10 µL de DNA (10 ng/µL) e 7,5,0 µL de água livre de nucleasse.

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler, utilizando-se os ciclos: desnaturação inicial a 95°C por 6 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento por 1 min a 44°C e extensão a 65°C por 1 min, com um ciclo final de extensão a 65°C por 16 min para REP; desnaturação inicial a 95°C por 7 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento por 1 min a 52°C e extensão a 65°C por 8 min, com um ciclo final de extensão a 65°C por 16 min para ERIC; e desnaturação inicial a 95°C por 2 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento por 1 min a 52°C e extensão a 72°C por 5 min, com um ciclo final de extensão a 72°C, por 5 min para BOX.

Os produtos amplificados da rep-PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X corados com *Gel Red Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium®). Os marcadores utilizados foram de 1 Kb e 100 pb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

2.6 VNTR

Os marcadores VNTR's foram selecionados com base nos maiores escores do índice discriminatório (HGDI) avaliados por ARRIETA-ORTIZ et al. (2013). Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µl e continha 10–50 ng de DNA genômico, 2,5 mM de MgCl₂, 40 nM do *primer*, 2 mM de dNTP e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Promega). Todas as reações serão realizadas por 35 ciclos, cada um consistindo em 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 52-58°C (dependendo do par de iniciadores) (Tabela 2) e 30-60 segundos a 72°C, com uma etapa de desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C e uma etapa de extensão

final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram separados em géis de agarose a 2% (ARRIETA-ORTIZ et al., 2013).

Tabela 2 - Primers, condições de PCR e características de VNTRs.

VNTR locus	Condições do PRC ¹		Tamanho de banda (bp) ²	
	Primers (5'-3')	Temp (°C)	Tempo	Xpm
XaG1_02	GCTGGTGCGCATGCTGAC	55	60	362
	TTCGCGGAAGGTCATGGG			
XaG1_29	CTACGAGGCACCTGCGCA	52	60	251
	CATGGCATCGCGCTGAAG			
XaG1_67	GTCGGCGCGATCGTCATG	53	30	446
	GTTGCGGCACGCCAACCT			

¹ PCR condições (Temp = temperatura de anelamento; Tempo = tempo de anelamento).

² Tamanho de banda (em bp) para *Xanthomonas phaseoli* pv *manihotis*.
Adaptado de Arrieta-Ortiz et al. (2013).

2.7 Análise dos dados

Os perfis eletroforéticos obtidos por rep-PCR e VNTR foram analisados por sistema binário (bandas presentes 1 ou ausentes 0, para cada isolado). A matriz de similaridade foi construída utilizando-se o coeficiente de Jaccard. Os dendrogramas foram obtidos utilizando-se o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*) através do software PAST vers. 2.17 (HAMMER et al., 2001). Para dados do VNTR as matrizes de dados binários concatenadas dos três VNTR foram convertidas em uma matriz de distância pela análise multivariada usando o PAST vers. 2.17 (HAMMER et al., 2001). No mesmo *software* uma árvore geradora mínima (*Minimum Spanning Tree* - MST) foi gerada. Esta ferramenta cria uma árvore que conecta todas as deformações de forma que a distância somada de todos os ramos seja minimizada. Os isolados mais próximos e mais distantes foram identificados pelas medidas de dissimilaridade de Jaccard no programa R V.4.3.2. (AZEVEDO, 2021).

2.8 Correlação de matrizes de dissimilaridade

Todas as matrizes de distância foram submetidas ao teste de Mantel (1967) para serem obtidas as correlações (R) entre os marcadores VNTR's, BOX-PCR, ERIC-PCR e matriz de distância gerada a partir na análise multilocus (MLSA). Estes testes foram realizados no programa PAST vers. 2.17 (HAMMER et al., 2001) utilizando-se 9999 permutações.

2.9 Avaliação da agressividade dos isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*

2.9.1 Material Vegetal

A avaliação da agressividade pelo teste de patogenicidade em manivas de mandioca da cultivar BRS Mari foi a partir de plantas com aproximadamente um ano de idade, as estacas foram cortadas de 10 a 15 centímetros contendo 3 gemas em cada e foram plantadas 2 em cada vaso (3 kg) contendo solo.

2.9.2 Inoculação

A inoculação dos vinte e cinco isolados bacterianos pertencentes à coleção de fitobactérias da Embrapa Amazônia Oriental, apresentados na tabela 3, foi realizada quando as plantas apresentaram dois a três pares de folhas verdadeiras, através de pulverização da face inferior das folhas com suspensão bacteriana na concentração de 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL ($A_{600} = 0,3$). As plantas foram mantidas em câmara úmida em casa-de-vegetação por 24 h após a inoculação.

O ensaio foi conduzido no período mais chuvoso no mês de abril de 2023. As médias das temperaturas mínimas e máximas do mês ficaram em 23,3°C e 32,7°C, respectivamente, consultado (Inmet, 2024).

Tabela 3 - Municípios do Estado do Pará de origem dos isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* utilizados nos estudos de agressividade.

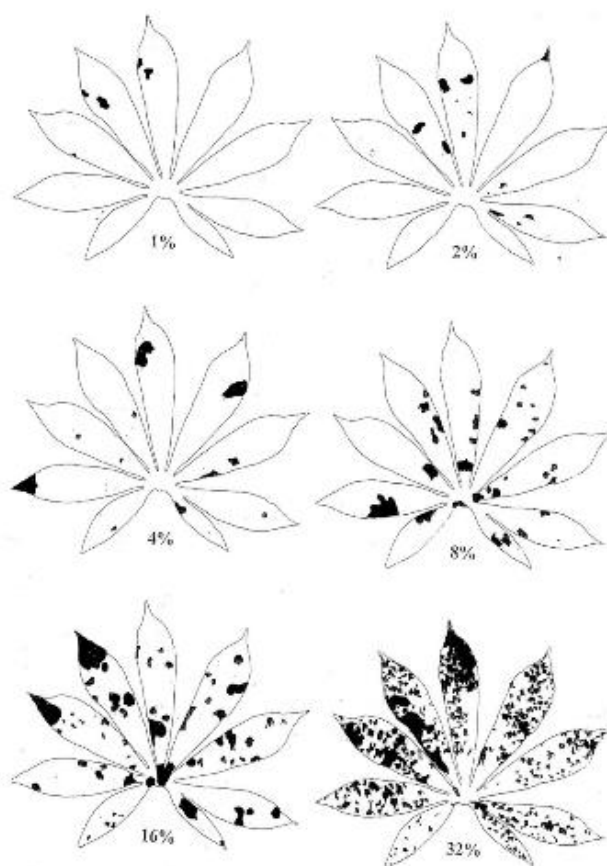
Isolados	Municípios
Xam 1.1	Acará
Xam 1.2	Acará
Xam 3	Castanhal
Xam 4	Castanhal
Xam 5	Castanhal
Xam 8	Castanhal
Xam 12	Castanhal
Xam 13	Acará

Xam 15	Acará
Xam 17	Acará
Xam 18	Acará
Xam 19	Acará
Xam 20	Acará
Xam 22	St ^a . Izabel
Xam 23	St ^a . Izabel
Xam 25	Tracuateua
Xam 26 CA	Tracuateua
Xam 26 CB	Tracuateua
Xam 27	Igarapé-Açu
Xam 29	Igarapé-Açu
Xam 30	São Francisco do Pará
Xam 32	Castanhal
Xam 35	Igarapé-Açu
Xam 36	Tailândia
Xam 37	Belém

2.9.3 Avaliação

As avaliações foram realizadas a cada dois dias após o aparecimento dos sintomas, utilizando-se a escala de notas de Kublik et al. (2020), a qual é baseada em níveis de severidade crescentes (1%, 2%, 4%, 8%, 16% e 32 %) conforme apresentado na figura 1.

Figura 1 - Escala diagramática para quantificação da severidade de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* em folhas de mandioca.



Fonte: Kublik et al. (2020).

2.9.4 Delineamento experimental e análises

O experimento foi montado em delineamento em blocos casualizados com vinte e seis tratamentos e três repetições. Com os valores de avaliação obtidos foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), proposta por Shaner e Finney (1977). Os dados foram submetidos a teste estatístico utilizando o *software* Sisvar, onde as médias foram comparadas pelo teste *Scott-Knott* a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

3.1 Origem e teste de patogenicidade dos isolados bacterianos

Todos os isolados bacterianos reativados causaram os sintomas típicos da doença, em aproximadamente, uma semana após a inoculação. Os sintomas apresentados foram lesões angulares encharcadas em todo o limbo foliar (Figura 2A) e necrose das lesões (Figura 2B), com posterior seca e queda foliar.

Figura 2 - Sintomas em folhas de mandioca aos 7 dias (1A) e 10 dias (1B) após a inoculação de *Xpm*.



A patogenicidade dos isolados de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Tabela 1), utilizados como controle negativo na caracterização genotípica, também foi testada e apresentaram sintomas característicos do cretamento bacteriano do feijoeiro como lesões necróticas com halo clorótico. Estes isolados são provenientes da Coleção do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA 2, UFLA 4 e Prog. 125) e da Universidade Federal de Uberlândia (UFU 122 e UFU 152).

3.2 Análises filogenéticas

As sequências obtidas por meio da PCR apresentaram bandas de aproximadamente 940 pb para a região *dnaK*, 698 pb para *fyuA*, 865 pb para *gyrB* e 875 pb para *rpoD*. Dos trinta e quatro isolados de *Xpm* deste estudo, somente doze amplificaram para as quatro regiões gênicas, como pode ser observado na Tabela 4 com marcação em cinza. Para a realização da MLSA do maior número de isolados foram considerados somente os que amplificaram para os genes *fyuA*, *gyrB* e *rpoD*. Dessa forma, possibilitou-se avaliar também os controles negativos, Tomate e PA-1. Os isolados da espécie *fuscans* subsp. *fuscans* e da patovar *phaseoli* também não amplificaram para todas as regiões analisadas.

A árvore filogenética de Máxima parcimônia (Figura 3) mostrou que os isolados agruparam com a espécie *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, confirmando assim a identificação com suporte dos ramos de 75% de *bootstrap*. As sequências dos isolados Tomate e PA-1 agruparam com as espécies *Xanthomonas perforans* (100% de *bootstrap*) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (87 % de *bootstrap*), respectivamente.

As espécies não pertencentes ao complexo *Xanthomonas axonopodis* se distanciaram filogeneticamente da espécie com suporte de *bootstrap* abaixo de 70%, com exceção do isolado Tomate e dos isolados obtidos do *GenBank*, *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, *Xanthomonas perforans* e *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. Sendo um indicativo de necessidade de mais estudos para compreender esta relação taxonômica.

O alinhamento das 63 sequências combinadas de *fyuA*, *gyrB* e *rpoD* (Tabela S1) apresentou um total de 2309 caracteres. Para o índice de consistência (CI) que mede os eventos homoplásticos foi obtido o valor de 0,58, tal índice se identifica como o conjunto de características morfológicas ou funcionais semelhantes em espécies que não são geneticamente próximas, como resultado de uma evolução por adaptação ao ambiente. Enquanto para o índice de retenção (RI) foi obtido 0,72, que mede o total de sinapomorfias presentes na árvore, que são indícios de ancestralidade comum exclusiva.

Tabela 4 - Resultado da amplificação da PCR para os genes *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* e *rpoD*.

Identificação	MLSA			
	<i>dnaK</i>	<i>fyuA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
Xam ^a 1	- ^b	+ ^c	+	+
Xam 2	-	-	-	+
Xam 3	+	+	+	+
Xam 4	-	+	+	+

Xam 5	+	+	-	+
Xam 6	-	+	+	+
Xam 8	-	+	+	+
Xam 10	+	+	+	+
Xam 11	-	+	-	+
Xam 12	+	+	+	-
Xam 13	+	-	+	+
Xam 14	+	+	+	+
Xam 15	-	+	+	+
Xam 16	+	+	+	+
Xam 17	-	+	+	+
Xam 18	-	+	+	+
Xam 19	+	+	+	+
Xam 20	-	+	+	+
Xam 21	-	+	+	+
Xam 22	-	+	-	-
Xam 23	+	+	+	+
Xam 24	+	+	-	+
Xam 25	+	+	+	+
Xam 26	+	+	+	+
Xam 27	+	+	+	+
Xam 28	+	+	+	+
Xam 29	+	+	+	+
Xam 30	+	+	+	+
Xam 31	-	+	+	+
Xam 32	-	+	-	+
Xam 35	-	+	+	+
Xam 36	-	+	+	+
Xam 37	-	+	+	+
Xam 38	-	+	+	+
UFU 13 ^d	-	+	+	-
1163 ^d	-	+	+	-
UFU 122 ^e	-	-	-	-
UFLA 2 ^e	-	+	+	-
UFLA 4 ^e	-	+	+	-
Prog 125 ^e	-	-	-	-
Tomate ^e	-	+	+	+
PA-1 ^e	-	+	+	+

a Isolados da Coleção Bacteriológica da Embrapa Amazônia Oriental.

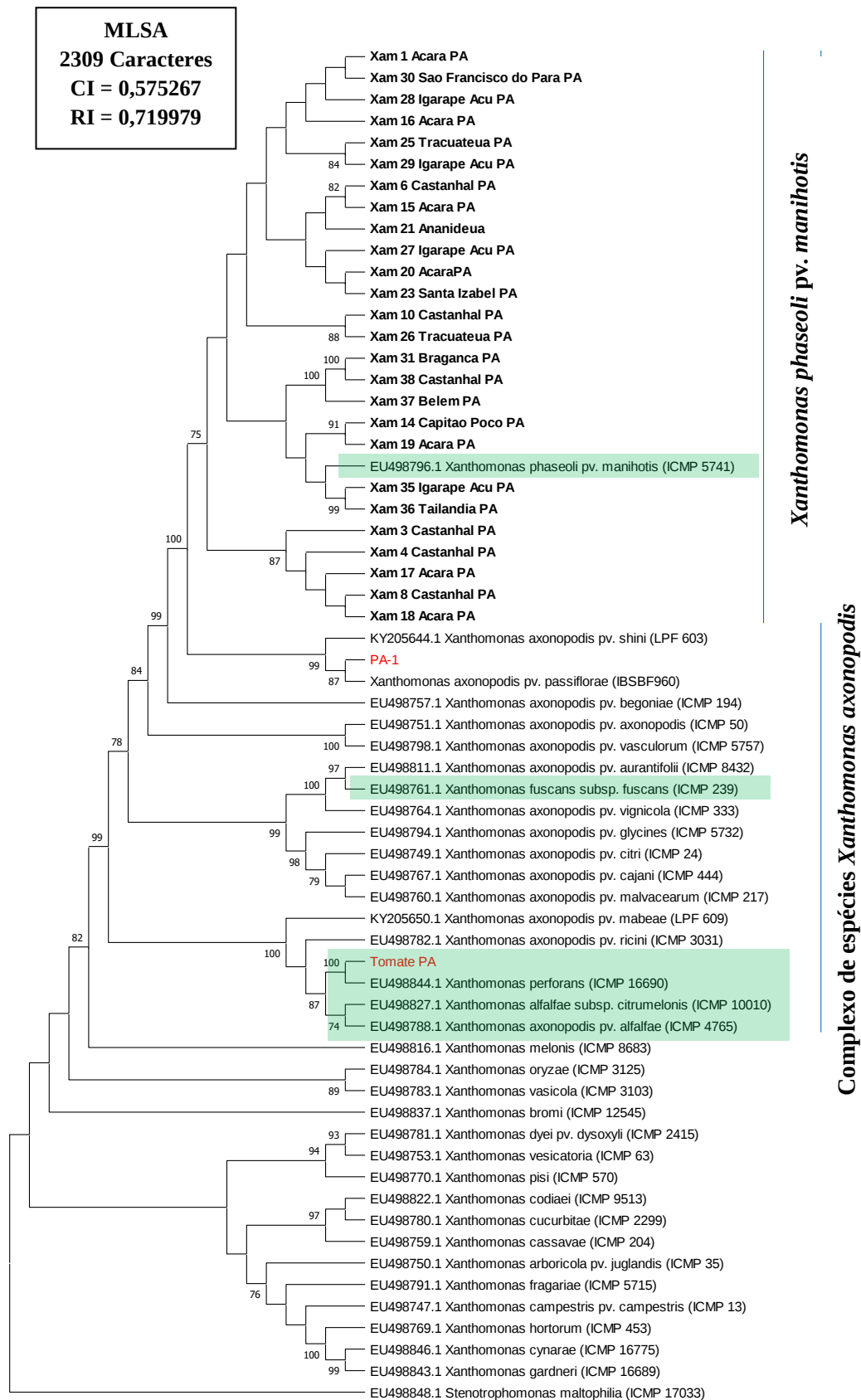
b Ausência de amplificação da PCR.

c Amplificação da PCR.

d Controles positivos.

e Controles negativos.

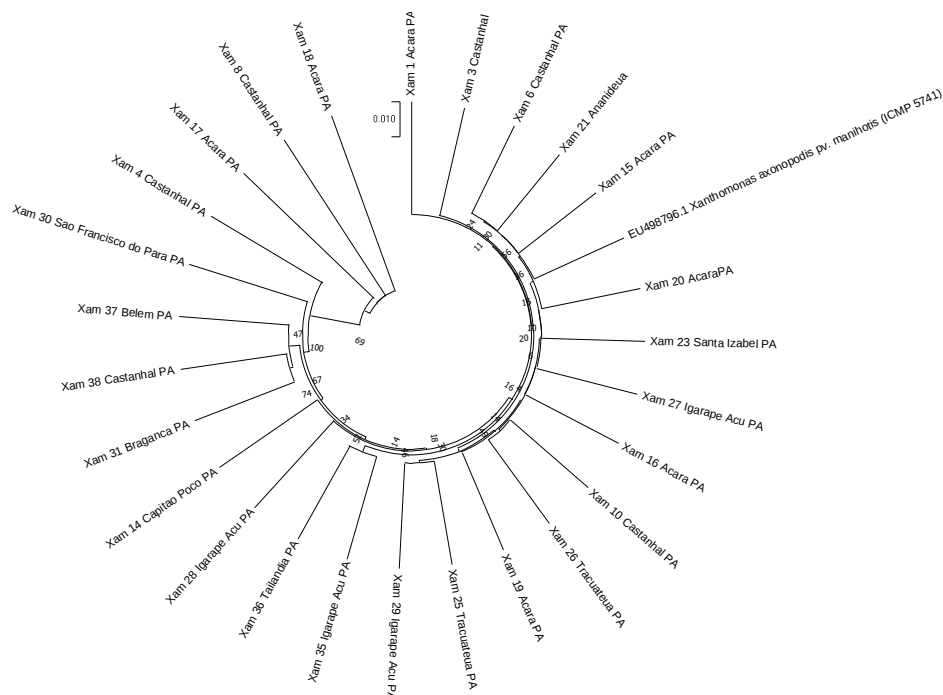
Figura 3 - Árvore de máxima parcimônia baseada nas sequências das regiões *fyuA*, *gyrB* e *rpoD* apresentando as relações filogenéticas dos membros da família Xanthomonadaceae.



Legenda: A árvore foi enraizada com sequências de *Stenotrophomonas maltophilia*, espécie também pertencente à família Xanthomonadaceae. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore e os valores de *bootstrap* (1.000 replicações) $\geq 70\%$ são indicados nos internódios. Códigos dos isolados avaliados estão sinalizados em **negrito** e os controles negativos em **vermelho**. CI = Índice de consistência; RI = Índice de retenção.

Baseado na distância genética calculada para a população de isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* foi obtido 2% de variabilidade genética, enquanto para a distância genética entre os isolados do mesmo grupo variou entre 0,00 e 0,10 conforme dados apresentados na tabela S2. Baseado nos valores de *p-distance* foi inferido a história evolutiva dos isolados usando o método UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1973). As distâncias evolutivas foram usadas para inferir as variações genéticas. O isolado Xam 18 apresentou maiores valores de diferença genética entre os isolados de *Xpm*, variando de 0,04 a 0,10, seguido dos isolados Xam 8 e Xam 17 (Fig. 4). Os altos valores podem ser indicativos de ocorrência de mutações em maior frequência no genoma dessas estirpes. Enquanto que os outros 24 isolados, incluindo o acesso do *GenBank*, apresentaram menores valores dessa diferença mas com algumas inserções e deleções observadas em cada sequência.

Figura 4 - A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética.



Legenda: As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método *p-distance* e estão nas unidades do número de diferenças de base por local. Esta análise envolveu 27 sequências de nucleotídeos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de exclusão aos pares). Houve um total de 2.309 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no MEGA X.

3.3 Caracterização genotípica por Rep-PCR

Das três técnicas de padrões de *fingerprinting* (REP, ERIC e BOX-PCR) utilizadas, somente houve amplificações de bandas para o ERIC e o BOX-PCR. Os padrões de banda para o Eric-PCR de todas as cepas de *Xpm* consistiam de 5 a 7 fragmentos variando em tamanho de 450 pb a 5,0 kb, enquanto que para o Box-PCR, foi composto de 1 a 3 fragmentos que variou de 350 pb a 1,0 kb. As duas técnicas demonstraram que a maioria das estirpes de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, independente das datas de coleta e dos locais de origem, apresentaram perfis genético semelhantes, não sendo possível agrupar as doze populações conforme os seus respectivos locais de coleta, portanto, conforme pode ser observado nos dendogramas, há baixa variabilidade entre os isolados de *Xpm* considerando as técnicas aplicadas (Figuras 5 a 8; Tabela 5). Na REP os isolados não apresentaram amplificação, não sendo possível a sua análise (Tabela 5).

A partir dos isolados de *Xpm* do Estado do Pará analisados, observou-se que no BOX-PCR trinta e dois isolados formaram quatro agrupamentos com similaridade de 100% independente do município e estado de origem, enquanto aos que não agruparam, tal como Xam 4 por não ter obtido amplificação de banda, Xam 26 a qual apresentou padrão de banda diferente dos outros isolados e Xam 25 que agrupou com o isolado PA-1 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) com similaridade abaixo de 50% (FIGURAS 5 e 6). No ERIC-PCR a maioria dos isolados de *Xpm* (32) formaram dois agrupamentos com 100% de similaridade, um dos grupos concentrou a maioria dos isolados demonstrando um baixo polimorfismo intraespecífico, mas foram eficientemente distinguidas de outras espécies usadas em estudo, incluindo os isolados de *Xpm* que não formaram grupos. Dessa forma, a técnica demonstrou possibilidade para ser usada apenas em nível de espécie o isolado Xam 19 não agrupou com os isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* por não ter amplificado na PCR.

As técnicas ERIC e BOX-PCR foram analisadas pelos métodos de Dice (dados não apresentados) e Jaccar, porém, houve melhor representatividade pelo método Jaccar em ambas as técnicas. Para os isolados de referência utilizados nas análises, observou-se que os isolados UFU 152 e UFU 122 pertencentes à espécie *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

originárias de Lagamar - MG apresentaram similaridade de 100% no BOX-PCR, mas não agruparam com o isolado UFLA4 de Minas Gerais, com município não informado, de mesma espécie. A localização pode ser um fator determinante para o agrupamento desta espécie. Os isolados Prog. 125 e UFLA2 pertencentes a espécie *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, e os isolados Hort. 9 e Tomate pertencentes a espécie *Xanthomonas perforans* apresentaram similaridade acima de 100% com formação de agrupamento para as suas respectivas espécies. (Figura 5 e 8). No ERIC-PCR estes mesmos isolados apresentaram menor polimorfismo em relação ao BOX.

Portanto, o BOX-PCR foi mais polimórfico que o ERIC para isolados de *Xpm*, porém, os dois não forneceram informações sobre a variabilidade genética para que os isolados pudessem ser separados por populações. Os resultados obtidos corroboram para o uso da técnica de ERIC-PCR para diferenciação entre espécies.

Tabela 5 - Resultado de amplificação da Rep-PCR.

Identificação	REP-PCR		
	BOX	ERIC	REP
Xam ^a 1	+	+ ^c	-
Xam 2	- ^b	+	-
Xam 3	+	+	-
Xam 4	-	+	-
Xam 5	+	+	-
Xam 6	+	+	-
Xam 8	+	+	-
Xam 10	+	+	-
Xam 11	+	+	-
Xam 12	+	+	-
Xam 13	+	+	-
Xam 14	+	+	-
Xam 15	+	+	-
Xam 16	+	+	-
Xam 17	+	+	-
Xam 18	+	+	-
Xam 19	+	-	-
Xam 20	+	+	-
Xam 21	+	+	-
Xam 22	+	+	-
Xam 23	+	+	-
Xam 24	+	+	-
Xam 25	+	+	-
Xam 26	+	+	-
Xam 27	+	+	-

Xam 28	+	+	-
Xam 29	+	+	-
Xam 30	+	+	-
Xam 31	+	+	-
Xam 32	+	+	-
Xam 35	+	+	-
Xam 36	+	+	-
Xam 37	+	+	-
Xam 38	+	+	-
PA-1 ^e	+	+	-
Tomate ^e	+	+	-
UFU 13 ^f	+	+	-
UFU 152 ^e	+	+	-
UFU 122 ^e	+	+	-
Prog. 125 ^e	+	+	-
UFLA 2 ^e	+	+	-
UFLA 4 ^e	+	+	-
Hort. 9 ^e	+	+	-
XCC ^e	+	+	-
PMH1 ^e	+	+	-

a Isolados da Coleção Bacteriológica da Embrapa Amazônia Oriental.

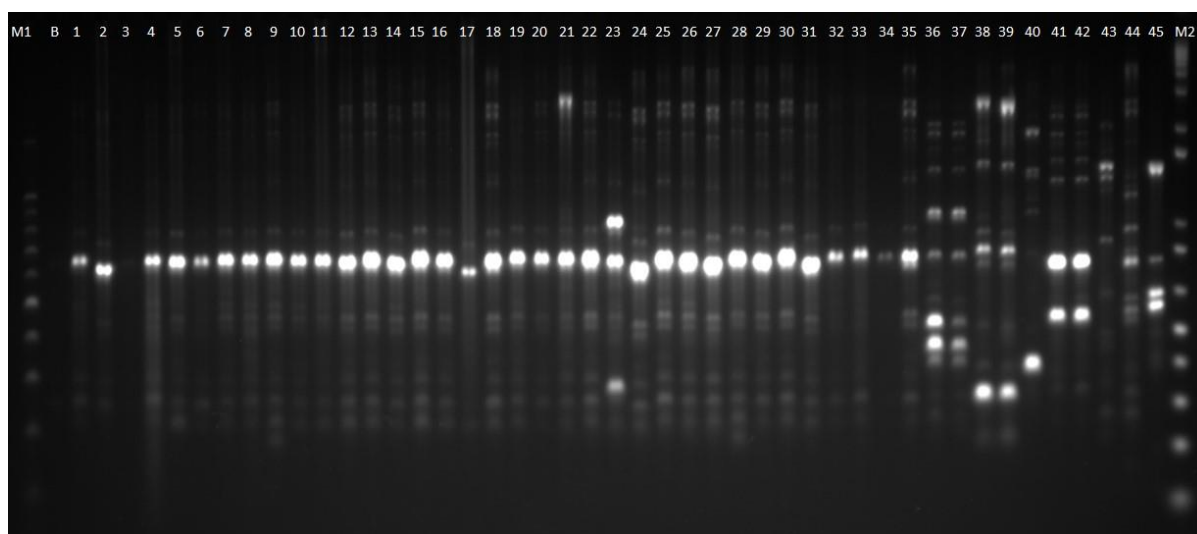
b Ausência de amplificação da PCR.

c Amplificação da PCR.

e Isolados usados como controle negativo.

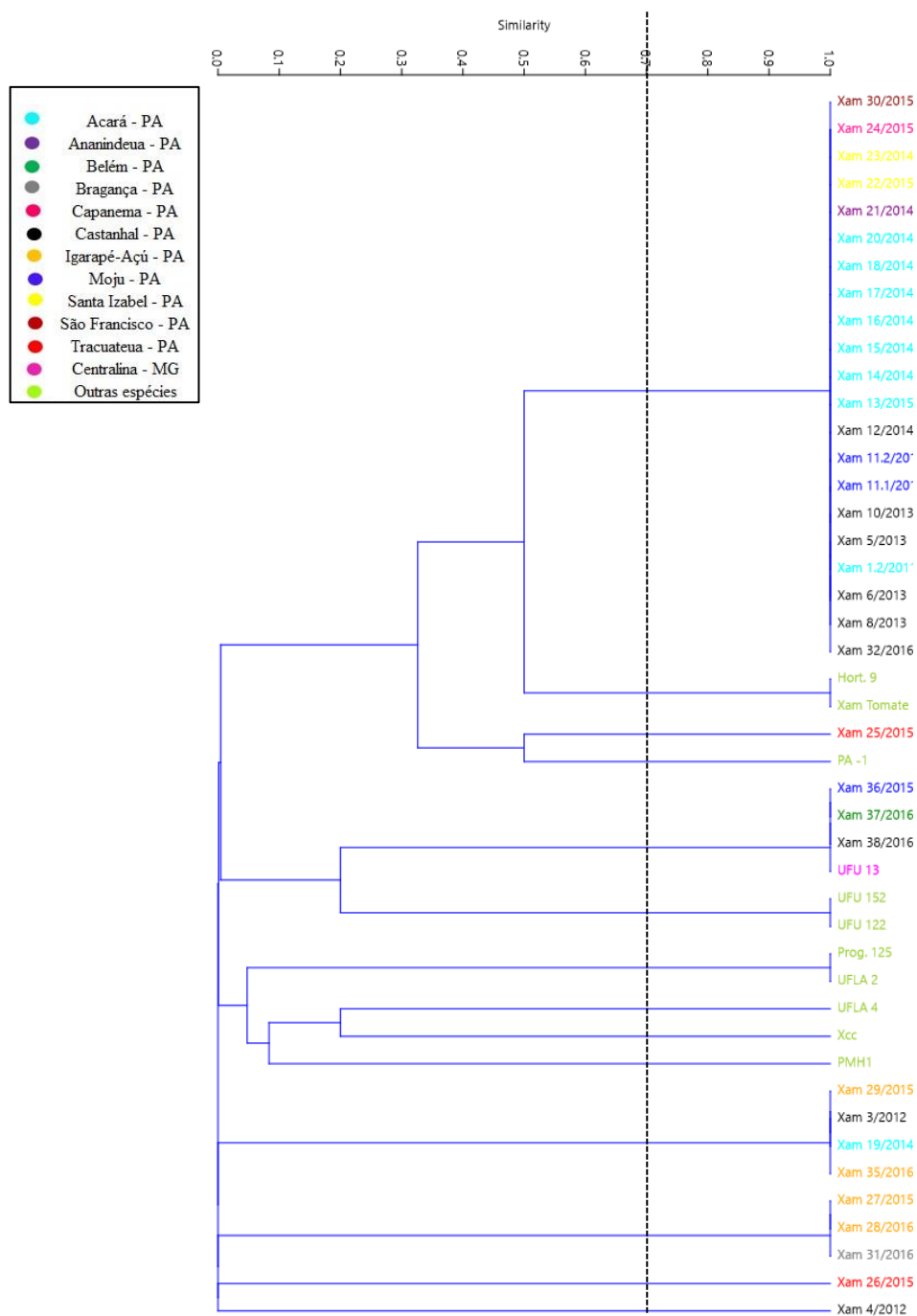
f Controle positivo.

Figura 5 - Análise dos produtos da PCR em géis de agarose, utilizando o *primer* BOX1AR, comparando perfis genéticos de isolados bacterianos de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* com os controles negativos e positivos em estudo.



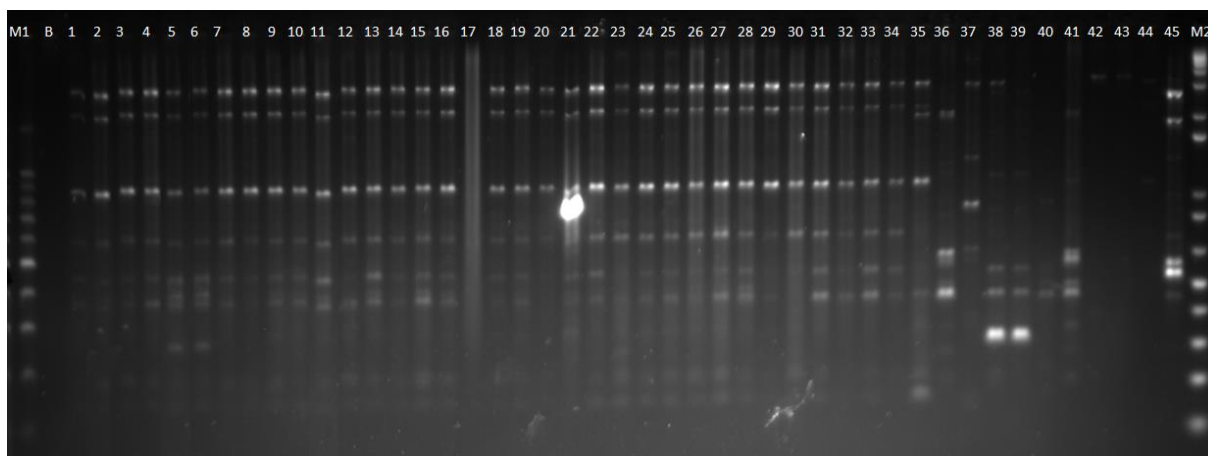
Legenda: **M1** (Marcador de peso molecular 100 pb), **1** (Xam 1), **2** (Xam 3), **3** (Xam 4), **4** (Xam 5), **5** (Xam 6), **6** (Xam 8), **7** (Xam 10), **8** (Xam 11.1), **9** (Xam 11.2), **10** (Xam 12), **11** (Xam 13), **12** (Xam 14), **13** (Xam 15), **14** (Xam 16), **15** (Xam 17), **16** (Xam 18), **17** (Xam 19), **18** (Xam 20), **19** (Xam 21), **20** (Xam 22), **21** (Xam 23), **22** (Xam 24), **23** (Xam 25), **24** (Xam 26), **25** (Xam 27), **26** (Xam 28), **27** (Xam 29), **28** (Xam 30), **29** (Xam 31), **30** (Xam 32), **31** (Xam 35), **32** (Xam 36), **33** (Xam 37), **34** (Xam 38), **35** (UFU 13), **36** (UFU 152), **37** (UFU 122), **38** (Prog. 125), **39** (UFLA 2), **40** (UFLA 4), **41** (Hort. 9), **42** (Tomate), **43** (Xcc), **44** (PA-1), **45** (PMH1), **M2** (Marcador de peso molecular 1Kb).

Figura 6 - Dendograma de similaridade gerado de acordo com perfis de amplificação a partir do *primer* BOX1AR.



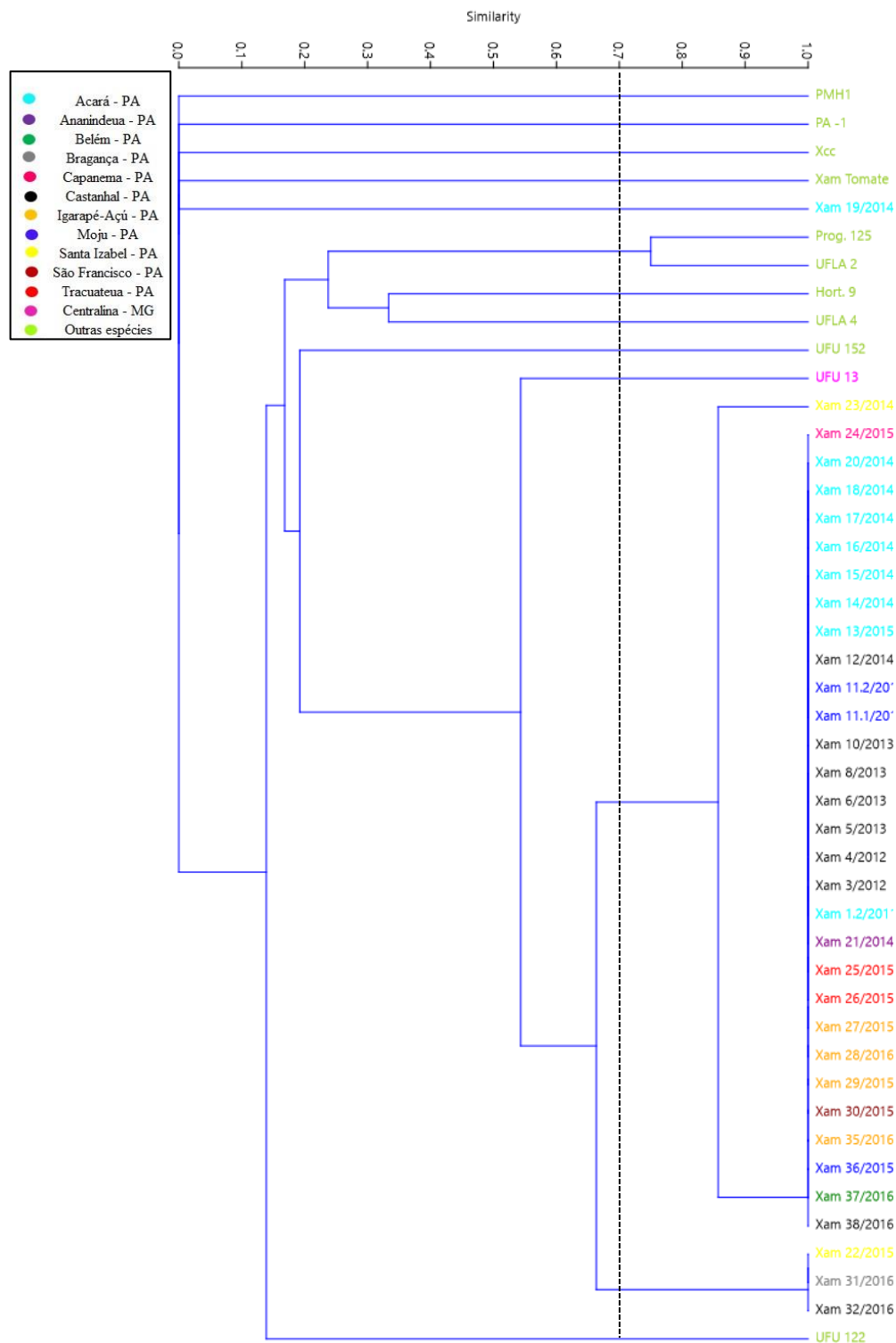
Legenda: Baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard, por meio do Programa Past dos 44 isolados bacterianos sendo, 33 Xam do Estado do Pará, UFU 13 como controle positivo e os isolados UFU 152, UFU 122, Prog. 125, UFLA 2, UFLA 4, Hort. 9, Tomate, Xcc, PA-1 e PMH1 como controle negativo. *Cophenetic correlation coefficient* = 0,99. Linha tracejada demarca o valor de 70% de similaridade.

Figura 7 - Análise dos produtos da PCR em géis de agarose, utilizando o par de *primers* ERIC1R e ERIC2, comparando perfis genéticos de isolados bacterianos de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* com os controles negativos e positivos em estudo.



Legenda: **M1** (Marcador de peso molecular 100 pb), **1** (Xam 1), **2** (Xam 3), **3** (Xam 4), **4** (Xam 5), **5** (Xam 6), **6** (Xam 8), **7** (Xam 10), **8** (Xam 11.1), **9** (Xam 11.2), **10** (Xam 12), **11** (Xam 13), **12** (Xam 14), **13** (Xam 15), **14** (Xam 16), **15** (Xam 17), **16** (Xam 18), **17** (Xam 19), **18** (Xam 20), **19** (Xam 21), **20** (Xam 22), **21** (Xam 23), **22** (Xam 24), **23** (Xam 25), **24** (Xam 26), **25** (Xam 27), **26** (Xam 28), **27** (Xam 29), **28** (Xam 30), **29** (Xam 31), **30** (Xam 32), **31** (Xam 35), **32** (Xam 36), **33** (Xam 37), **34** (Xam 38), **35** (UFU 13), **36** (UFU 152), **37** (UFU 122), **38** (Prog. 125), **39** (UFLA 2), **40** (UFLA 4), **41** (Hort. 9), **42** (Tomate), **43** (Xcc), **44** (PA-1), **45** (PMH1), **M2** (Marcador de peso molecular 1Kb).

Figura 8 - Dendograma de similaridade gerado de acordo com perfis de amplificação utilizando o par de *primers* ERIC1R e ERIC2.



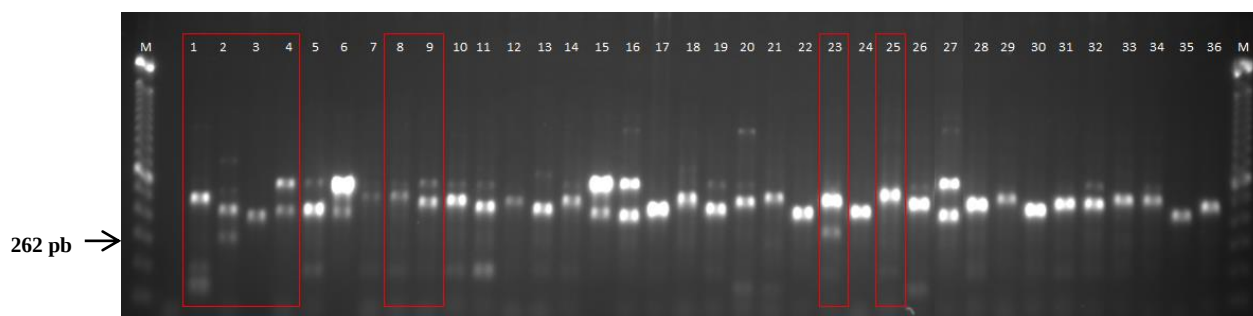
Legenda: Baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard, por meio do Programa Past dos 44 isolados bacterianos sendo, 34 Xam do Estado do Pará, UFU 13 como controle positivo e os isolados UFU 152, UFU 122, Prog. 125, UFLA 2, UFLA 4, Hort. 9, Tomate, Xcc, PA-1 e PMH1 como controle negativo. *Cophenetic correlation coefficient* = 0,99. Linha tracejada demarca o valor de 70% de similaridade.

3.4 Caracterização genotípica por VNTR

Todas as trinta e seis cepas amplificaram para os três loci VNTR analisados e geraram oito, nove e sete haplótipos correspondentes aos marcadores XaG1_02, XaG1_29 e XaG1_67, respectivamente. Não foi observado variação no tamanho dos fragmentos ao longo do experimento. Assim, todos os três marcadores apresentaram reprodutibilidade (amplicons de mesmo tamanho produzidos em diferentes ensaios de PCR).

O produto da PCR realizada com o marcador XaG1_02 não gerou padrão de banda de 262 pb indicado pela literatura (ARRIETA-ORTIZ et al., 2013). Conforme pode observado na figura 9, foram geradas bandas simples e duplas que variaram entre 250 pb e 500 pb.

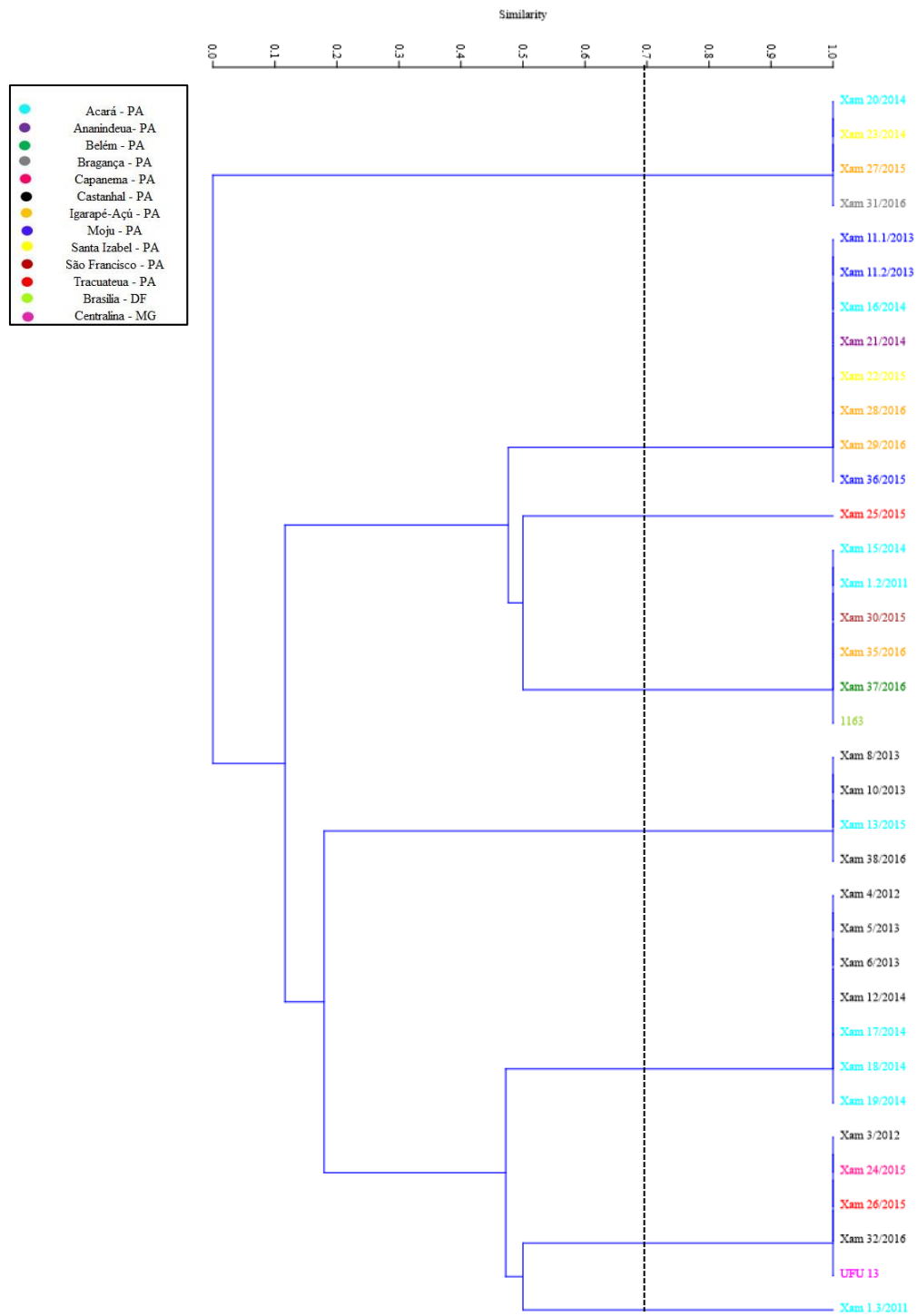
Figura 9 - Análise dos produtos da PCR em géis de agarose, utilizando o par de *primers* XaG1_02F e XaG1_02R, comparando perfis genéticos de isolados bacterianos de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* de diferentes municípios de origem.



Legenda: **M** (Marcador de peso molecular 100 pb), **1** (Xam 1.2), **2** (Xam 1.3), **3** (Xam 3), **4** (Xam 4), **5** (Xam 5), **6** (Xam 6), **7** (Xam 8), **8** (Xam 10), **9** (Xam 11.1), **10** (Xam 11.2), **11** (Xam 12), **12** (Xam 13), **13** (Xam 15), **14** (Xam 16), **15** (Xam 17), **16** (Xam 18), **17** (Xam 19), **18** (Xam 20), **19** (Xam 21), **20** (Xam 22), **21** (Xam 23), **22** (Xam 24), **23** (Xam 25), **24** (Xam 26), **25** (Xam 27), **26** (Xam 28), **27** (Xam 29), **28** (Xam 30), **29** (Xam 31), **30** (Xam 32), **31** (Xam 35), **32** (Xam 36), **33** (Xam 37), **34** (Xam 38), **35** (UFU 13), **36** (1163). Os dados marcados em vermelho indicam os oito haplótipos determinados para a região em estudo.

O dendograma da figura 10 informa o polimorfismo presente entre os isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* para a região XaG1_02. Foram gerados agrupamentos com subdivisões em alguns agrupamentos e foi observado grupos de populações de mesmo local de origem e ano de coleta similar ou aproximado. Os isolados Xam 1.3 (Acará – PA) e Xam 25 (Tracuateua – PA) são haplótipos com alelos únicos. Enquanto as cepas da população do município de Mojú, mesmo coletadas em diferentes anos, apresentam o mesmo perfil genético e foram agrupadas com isolados de outras populações. Isto pode ser explicado pela disseminação do patógeno para outras regiões ao longo dos anos. Já entre a população do município de Castanhal estão presentes três haplótipos, porém, a região com maior variabilidade genética foi a do município de Acará.

Figura 10 - Dendograma de similaridade gerado de acordo com perfis de amplificação VNTR utilizando o par de *primers* XaG1_02F e XaG1_02R.

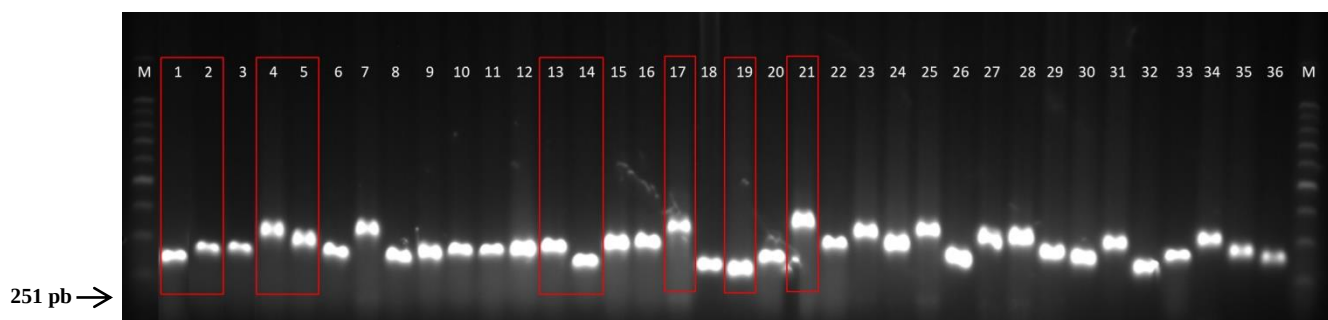


Legenda: Baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard, por meio do Programa Past dos 36 isolados bacterianos sendo, 34 Xam do Estado do Pará, UFU 13 com

procedência do estado de Minas Gerais e o isolado 1163 do Distrito Federal. *Cophenetic correlation coefficient* = 0,94. Linha tracejada demarca o valor de 70% de similaridade.

A região VNTR XaG1_29 apresentou oito isolados com padrão de banda correspondente ao da literatura de 251 pb, incluiu cepas do Acará, Castanhal, Mojú e a de Minas Gerais (Figura 11). Com relação ao gradograma da figura 12, foram formados agrupamentos bactérias de diferentes municípios não sendo possível a separação por região. No entanto, o polimorfismo da região com oito haplótipos demonstra a variabilidade genética entre os isolados (Figura 11).

Figura 11 - Análise dos produtos da PCR em géis de agarose, utilizando o par de *primers* XaG1_29F e XaG1_29R, comparando perfis genéticos de isolados bacterianos de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* de diferentes municípios de origem.



M (Marcador de peso molecular 100 pb), **1** (Xam 1.2), **2** (Xam 1.3), **3** (Xam 3), **4** (Xam 4), **5** (Xam 5), **6** (Xam 6), **7** (Xam 8), **8** (Xam 10), **9** (Xam 11.1), **10** (Xam 11.2), **11** (Xam 12), **12** (Xam 13), **13** (Xam 15), **14** (Xam 16), **15** (Xam 17), **16** (Xam 18), **17** (Xam 19), **18** (Xam 20), **19** (Xam 21), **20** (Xam 22), **21** (Xam 23), **22** (Xam 24), **23** (Xam 25), **24** (Xam 26), **25** (Xam 27), **26** (Xam 28), **27** (Xam 29), **28** (Xam 30), **29** (Xam 31), **30** (Xam 32), **31** (Xam 35), **32** (Xam 36), **33** (Xam 37), **34** (Xam 38), **35** (UFU 13), **36** (1163). Os dados na figura marcados em vermelho indicam os nove haplótipos determinados para a região em estudo. As identificações grifadas em vermelho indicam os isolados com altura de banda de 251 pb.

Figura 12 - Dendograma de similaridade gerado de acordo com perfis de amplificação VNTR utilizando o par de *primers* XaG1_29F e XaG1_29R.

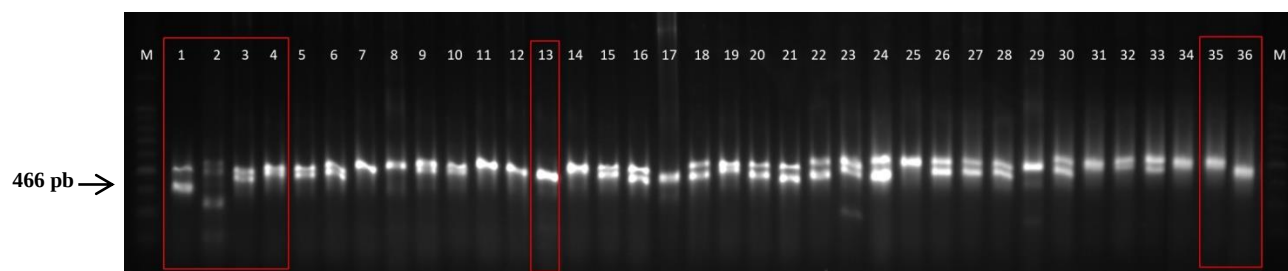


Legenda: Baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard, por meio do Programa Past dos 36 isolados bacterianos sendo, 34 Xam do Estado do Pará, UFU 13 com procedência do estado de Minas Gerais e o isolado 1163 do Distrito Federal. *Cophenetic correlation coefficient* = 1. Linha tracejada demarca o valor de 70% de similaridade.

Para a região VNTR XaG1_67, dezesseis estirpes apresentaram banda específica de 466 pb, no entanto, dentre elas quatorze possuem banda dupla com outra adicional de 500 pb (Figura 13). Conforme apresentado no dendograma da Figura 14, formaram quatro agrupamentos com 100% de similaridade onde a população do município de Mojú e de Santa Izabel se agrupou em clados correspondentes. Porém, observou-se que há grande variabilidade dentro das populações diante da dispersão dos isolados de diferentes localidades agrupados em direntes grupos, mas o polimorfismo da região não foi suficiente para agrupar as populações.

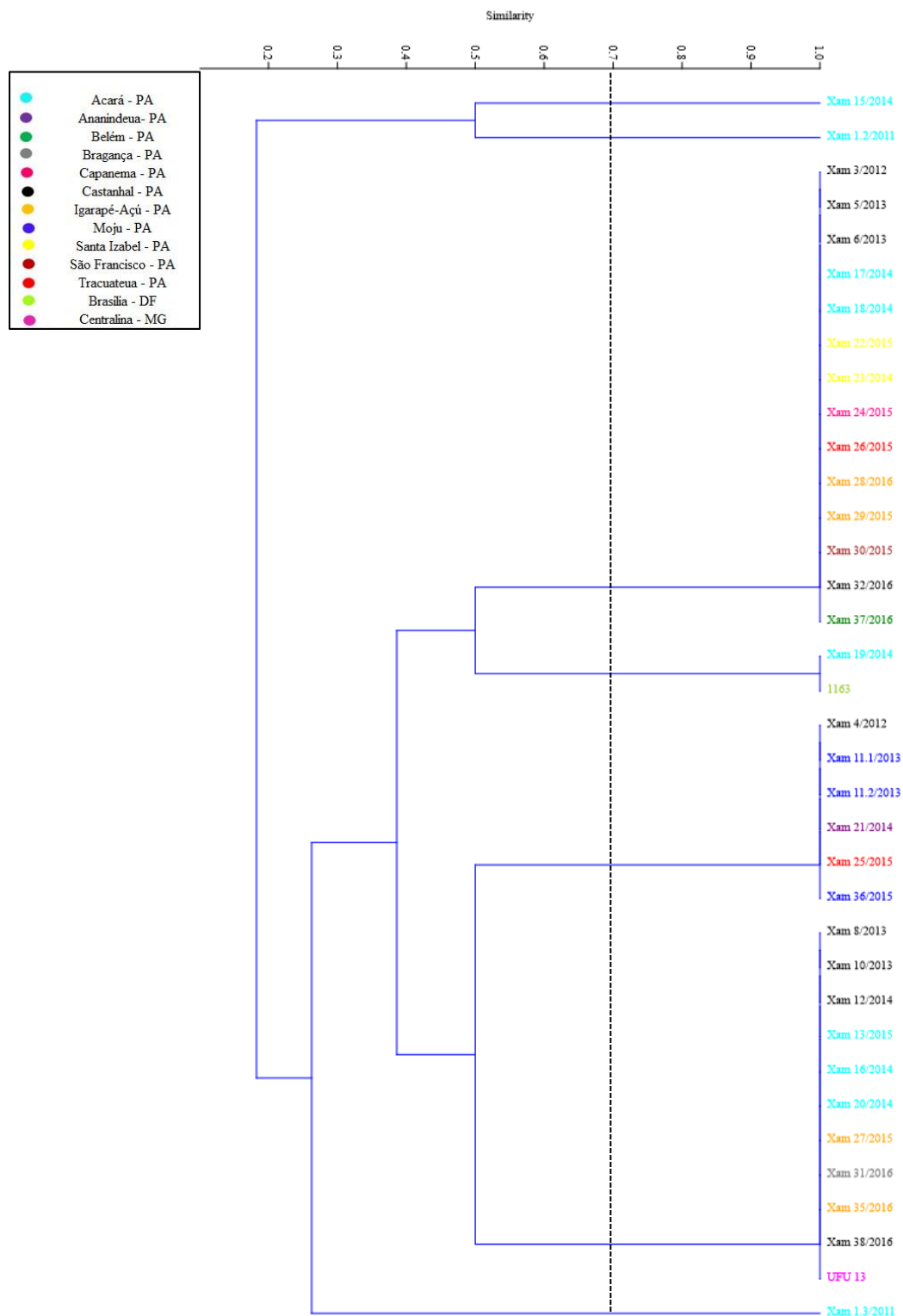
Os dados binários das três regiões VNTR foram concatenados e avaliados em pelo método de Jaccard por análise multivariada e gerou dendograma com coeficiente de correlação cofenética de 0,80 (Figura 15).

Figura 13 - Análise dos produtos da PCR em géis de agarose, utilizando o par de *primers* XaG1_67F e XaG1_67R, comparando perfis genéticos de isolados bacterianos de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* de diferentes municípios de origem.



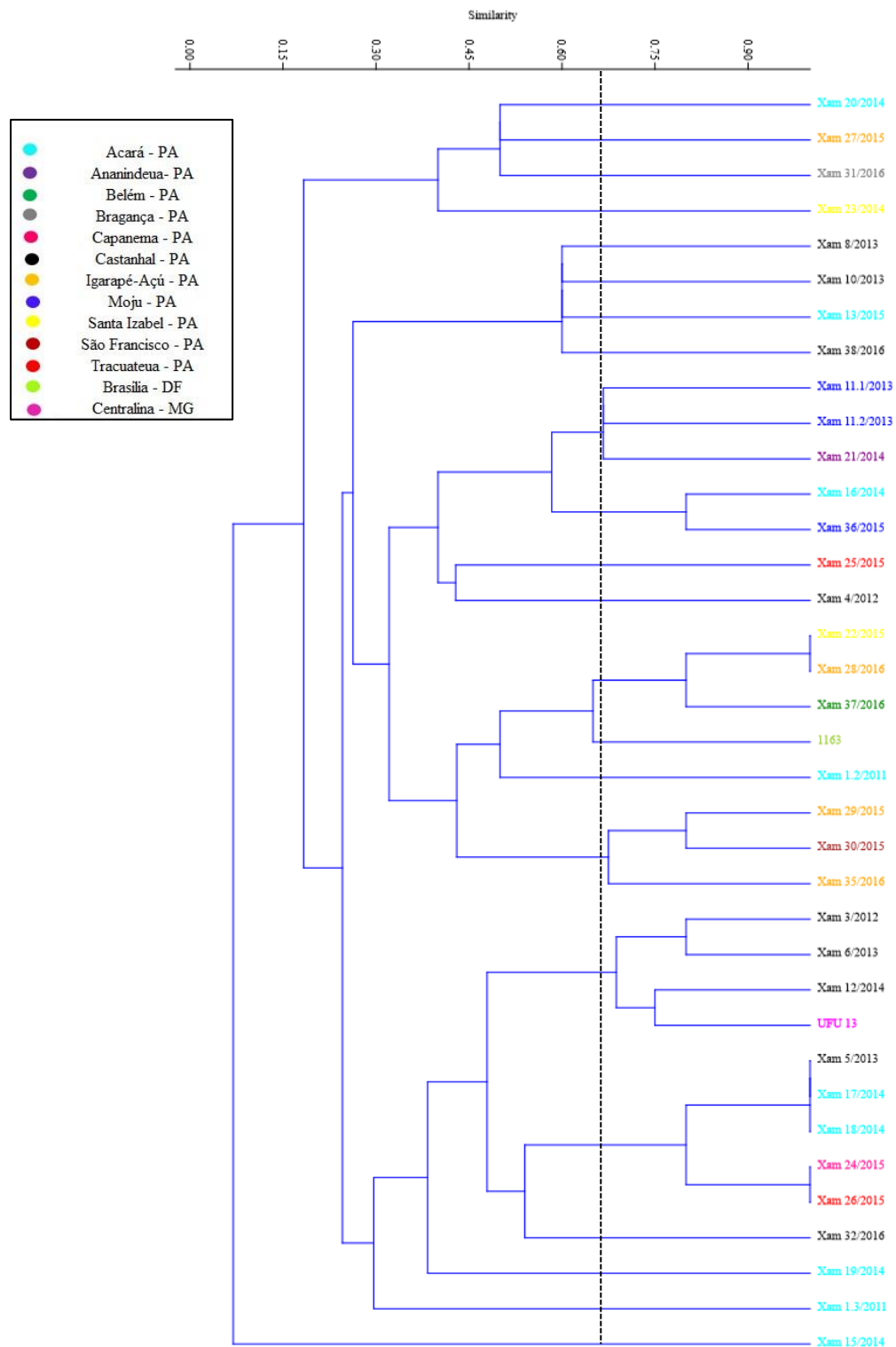
M (Marcador de peso molecular 100 pb), **1** (Xam 1.2), **2** (Xam 1.3), **3** (Xam 3), **4** (Xam 4), **5** (Xam 5), **6** (Xam 6), **7** (Xam 8), **8** (Xam 10), **9** (Xam 11.1), **10** (Xam 11.2), **11** (Xam 12), **12** (Xam 13), **13** (Xam 15), **14** (Xam 16), **15** (Xam 17), **16** (Xam 18), **17** (Xam 19), **18** (Xam 20), **19** (Xam 21), **20** (Xam 22), **21** (Xam 23), **22** (Xam 24), **23** (Xam 25), **24** (Xam 26), **25** (Xam 27), **26** (Xam 28), **27** (Xam 29), **28** (Xam 30), **29** (Xam 31), **30** (Xam 32), **31** (Xam 35), **32** (Xam 36), **33** (Xam 37), **34** (Xam 38), **35** (UFU 13), **36** (1163). Os dados na figura marcados em vermelho indicam os sete haplótipos determinados para a região em estudo. As identificações grifadas em vermelho indicam os isolados com altura de banda de 466 pb.

Figura 14 - Dendograma de similaridade gerado de acordo com perfis de amplificação VNTR utilizando o par de *primers* XaG1_67F e XaG1_67R.



Legenda: Baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard, por meio do Programa Past dos 36 isolados bacterianos sendo, 34 Xam do Estado do Pará, UFU 13 com procedência do estado de Minas Gerais e o isolado 1163 do Distrito Federal. *Cophenetic correlation coefficient* = 0,91. Linha tracejada demarca o valor de 70% de similaridade.

Figura 15 - Dendrograma de similaridade gerado a partir dos dados binários de acordo com perfis de amplificação das regiões VNTR's XaG1_02, XaG1_29 e XaG1_67 concatenadas.



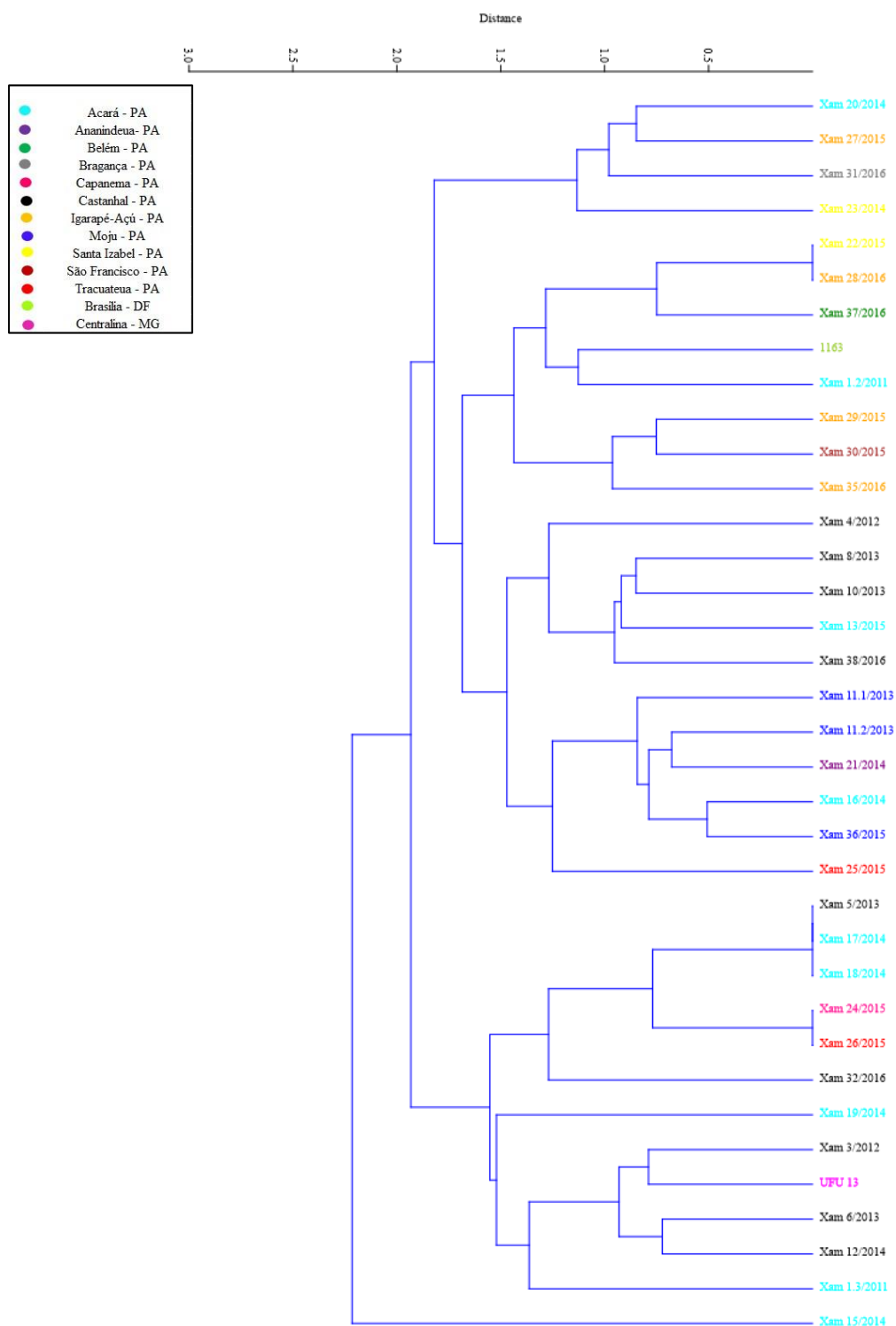
Legenda: Baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard, por meio do Programa Past dos 36 isolados bacterianos sendo, 34 Xam do Estado do Pará, UFU 13 com procedência do estado de Minas Gerais e o isolado 1163 do Distrito Federal. *Cophenetic correlation coefficient* = 0,81. Linha tracejada demarca o valor de 70% de similaridade.

Para estimar a distância mínima entre os isolados, os dados binários de VNTR foram concatenados e transformados em matriz de similaridade e dissimilaridade calculada pela distância de Jaccard por análise multivariada pelo método Euclidiano. Através dessa análise, foi gerado o dendograma de distância entre os isolados que apresentou estimativa de correlação cofenética de 0,81 conforme mostra a figura 16.

Um MST baseado em matriz de distância mostra as relações entre trinta e seis cepas em relação aos locais de coleta e ao ano de isolamento (Gráfico 1). Um esquema com três marcadores VNTR (MLVA – 3) separou trinta haplótipos de cepas do estado do Pará e duas de outros estados usados para comparativo, por esta análise foi possível demonstrar que houve proximidade entre os isolados da população do município de Castanhal, Mojú e Igarapé-Açú. E também, pode-se observar que há grande dispersão entre os isolados da população do município de Acará.

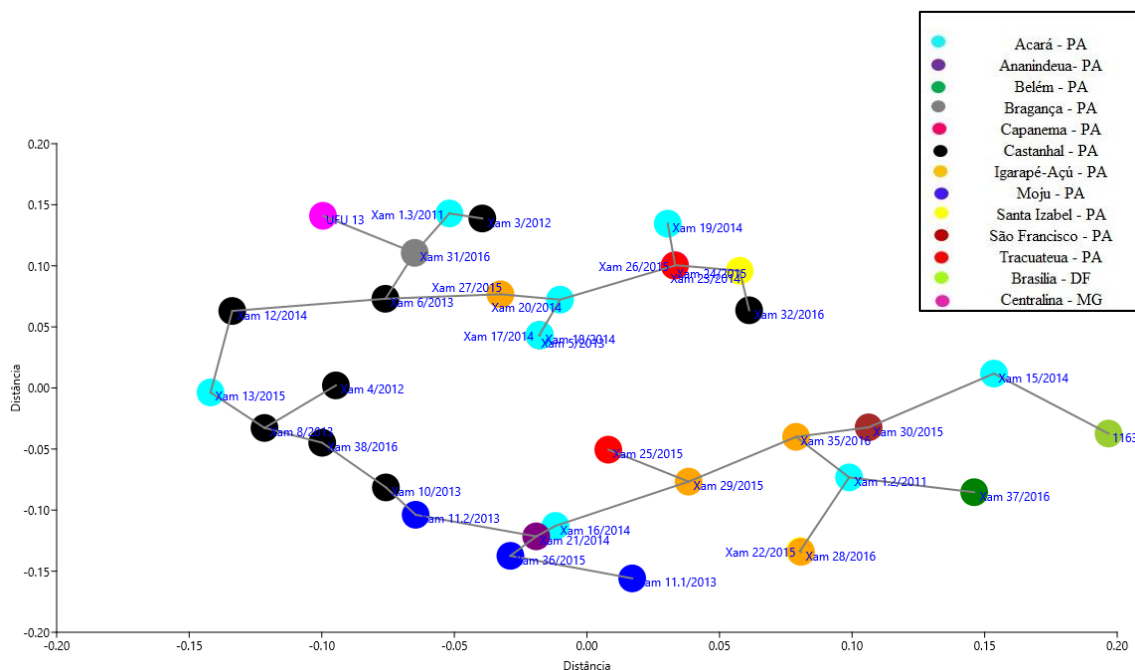
Os dois isolados mais distantes foram Xam 1.3 coletado no município do Acará no ano de 2011 e o isolado Xam 11.1 de Mojú coletado em 2013. Pois, enquanto o isolado Xam 1.3 possui alelos únicos para dois dos três marcadores testados, o Xam 11.1 foi o qual obteve mais alelos comuns aos dos outros isolados, possivelmente em consequência a processos de recombinação genica realizado pela bactéria Xam 11.1. Com relação a menor distância apresentada, os isolados Xam 17 e Xam 18, ambos coletados em 2014 no município do Acará, e o isolado Xam 5 de Castanhal coletado em 2013 foram os que apresentaram o mesmo número de repetição que tandem para todos os marcadores VNTR testados. Porém, somente o Xam 17 e Xam 18 foram os isolados que também se agruparam na filogenia em mesmo clado com valor de *bootstrap* acima de 70% e obtiveram altos valores de variabilidade genética. Tais resultados levam a compreensão que esses dois isolados são geneticamente idênticos e mais distantes geneticamente dos outros isolados.

Figura 16 - Dendrograma a partir da transformação dos dados binários transformados em matriz de similaridade e dissimilaridade dos VNTR's XaG1_02, XaG1_29 e XaG1_67 concatenadas.



Legenda: Baseado no método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard, por meio do Programa Past dos 36 isolados bacterianos sendo, 34 Xam do Estado do Pará, UFU 13 com procedência do estado de Minas Gerais e o isolado 1163 do Distrito Federal. *Cophenetic correlation coefficient* = 0,79.

Gráfico 1 - *Minimal spanning tree* (MST) de 36 isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* analisados por matriz de dissimilaridade de Jaccard de acordo com número variável de repetições em tandem (VNTR) para demonstrar a distância entre as populações e entre isolados.



3.5 Teste de mantel

Os negativos e baixos valores de correlação obtidos pelo teste de Mantel (Tabela 6) sugeriu a maioria das matrizes de distância testadas não apresentaram significância, logo não apresentaram dados correlacionados. Porém, os dados derivados do VNTR e Eric-PCR atestaram correlação de 0,27 ($P < 0,05$) e foram considerados satisfatoriamente congruentes.

Também foi verificada a correlação da matriz de cada marcador VNTR com a matriz dos VNTR's concatenados (MLVA) e os marcadores XaG1_29 e XaG1_67, foram os quais evidenciaram alta correlação de 0,143 e 0,966, respectivamente. Além disso, ambos os marcadores foram considerados altamente correlacionados (0,165).

Tabela 6. Mostra as correlações entre matrizes de dissimilaridade calculadas pelo teste de Mantel.

	MLSA	MLVA	Eric-PCR	Box-PCR	XaG1_02	XaG1_29	XaG1_67
MLSA							
MLVA	0,006 ¹						
Eric-PCR	-0,039	0,27*					
Box-PCR	-0,071	-0,089	0,113				
XaG1_02	-0,054	0,080	-0,097	-0,010			
XaG1_29	0,043	0,143*	0,114	-0,102	0,004		
XaG1_67	0,013	0,966***	0,446	-0,066	-0,031	0,165**	

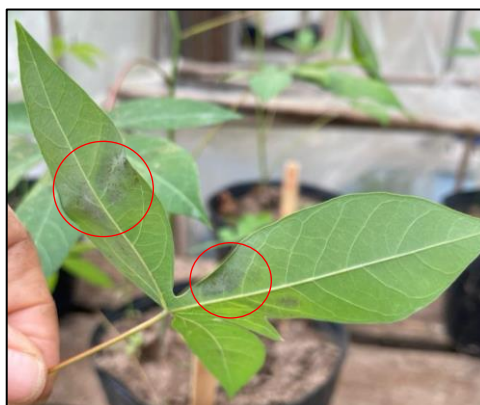
* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$

¹Valor de correlação - R

3.6 Seleção de isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* por teste de agressividade da doença

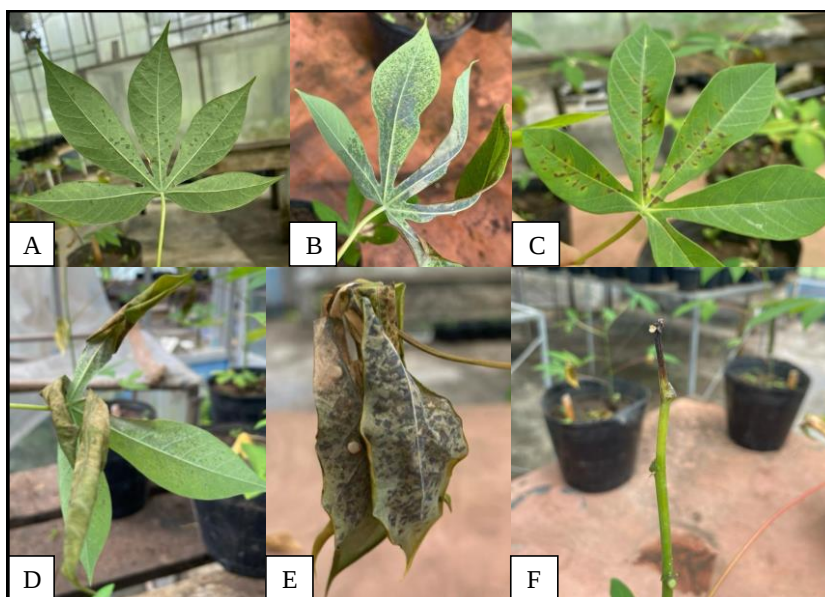
Os sintomas começaram a ser observados a partir do segundo dia em algumas plantas inoculadas com os isolados Xam 4, Xam 17 e Xam 36 (Figura 17). Todos isolados induziram sintomatologia típica de bacteriose conforme apresentado na figura 18, folhas com manchas angulares com aspecto encharcado, limitadas por nervuras e distribuídas irregularmente na lâmina foliar (Figura 18 - A). Com o tempo, as manchas se estenderam e se aglutinaram ao longo das nervuras da folha (Figura 18 - B); em algumas plantas não houve muita expansão dos sintomas, porém as porções centrais das manchas tornaram-se marrom e as partes encharcadas geralmente ficaram rodeadas por um halo clorótico (Figura 18 - C).

Figura 17 - Pequenas manchas encharcadas após dois dias de inoculação em folhas de mandioca.



Em estágios finais dos sintomas, partes circundantes das lâminas tornaram-se castanha clara (Figura 5 - D) e dentro de 2-3 dias extensas áreas dos folíolos ficaram murchas não apenas na ponta ou borda do folíolo, mas também na base (Figura 18 - E). Apenas O isolado Xam 4 causou o sintoma de “vela”, o qual o caule murcha e morre ficando com aparência de um pavio na extremidade (Figura 18 - F).

Figura 18 - Progressão dos sintomas causados pela bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* ao longo dos 14 dias de avaliação após a inoculação.



Legenda: Sintomas primários observados com 5 dias após a inoculação (A) aos 7 (B) e 9 (C). Sintomas secundários em folhas da cultivar BRS Mari com a doença em plena progressão resultando em coloração parda das folhas após 12 (D) e 14 (E) dias após a inoculação. Sintoma de “vela” do caule.

Os resultados obtidos da análise dos dados da área abaixo da curva do progresso mostraram que os isolados Xam 3, Xam 4 e Xam 35 foram os que apresentaram maior severidade da doença conforme exposto na tabela 7. Além disso, dez isolados não apresentaram diferença significativa com a testemunha (Tabela 7).

Diante desses resultados, observou-se que alguns isolados de mesmo local de coleta apresentaram médias sem diferença significativa entre si, isto significa uma possível relação da variabilidade genética com a patogenicidade dos isolados de *Xpm* do Estado do Pará. A maioria dos isolados com menores médias para severidade, no total cinco cepas, foram do município de Acará. Apenas os isolados Xam 17 e Xam 18 também provenientes do Acará

apresentaram altos valores para a severidade da doença. E das três bactérias com maior severidade, duas são do município de Castanhal.

Tabela 7 - Médias do teste de severidade para diferentes isolados causadores da bacteriose da mandioca no Pará.

Tratamentos	Procedência	Médias
Testemunha		0,00 ¹ a ²
Xam 15	Acará - PA	0,57 a
Xam 27	Igarapé Açu - PA	0,17 a
Xam 20	Acará - PA	1,22 a
Xam 36	Tailândia - PA	1,70 a
Xam 26 CA	Tracuateua - PA	2,53 a
Xam 25	Tracuateua - PA	2,75 a
Xam 19	Acará - PA	3,28 a
Xam 22	Santa Izabel - PA	4,08 a
Xam 1.1	Acará - PA	4,55 a
Xam 1.2	Acará - PA	13,42 a
Xam 37	Belém - PA	28,61 b
Xam 29	Igarapé Açu - PA	28,92 b
Xam 13	Castanhal - PA	46,89 b
Xam 23	Santa Izabel - PA	71,83 b
Xam 8	Castanhal - PA	86,39 c
Xam 26 CB	Tracuateua - PA	92,91 c
Xam 5	Castanhal - PA	96,87 c
Xam 17	Acará - PA	117,92 d
Xam 18	Acará - PA	127,08 d
Xam 12	Castanhal - PA	128,33 d
Xam 30	São Francisco do Pará - PA	139,30 d
Xam 32	Castanhal-PA	140,97 d
Xam 35	Igarapé Açu - PA	161,72 e
Xam 3	Castanhal - PA	191,25 e
Xam 4	Castanhal - PA	213,25 e

¹Médias do teste de severidade de isolados de *Xpm*. ²Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna pelo teste de *Scott Knott* a nível de 5% de probabilidade.

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho torna evidente que os isolados da espécie *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* do Estado do Pará apresentam grande diversidade genética. A análise filogenética das regiões *gyrB*, *rpoD*, *fyuA* (Figura 3) corrobora com a identificação dos isolados feita com o par de *primers* específicos XV/XK. Esta identificação dos isolados em estudo foi publicada por Ishida et al. (2016). No entanto, recentemente houve a necessidade de modificar um dos *primers* utilizados para identificação de *Xpm* com o objetivo de aumentar o grau de especificidade para detectar o patógeno e aumentar a confiabilidade quando comparado com XV/XK. Nos trabalhos mais recentes, os *primers* XV e XKmod são os mais usuais na identificação da espécie (MELO et al. 2019).

A identificação como *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* está de acordo com a nova reclassificação proposta por Constantin et al. (2016), que alterou a espécie *X. axonopodis* pv. *manihotis* através de análises MLSA, hibridação de DNA–DNA e sequenciamento genômico. Entretanto, como destacado na árvore filogenética, pode se observar a distância filogenética entre isolados do complexo *Xanthomonas axonopodis* dos que não são pertencentes a este grupo, com exceção dos isolados de *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelus* e *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* depositados no *GenBank* e o isolado Tomate, os quais se agruparam entre espécies de *Xanthomonas axonopodis*. A análise de sequência multilocus é uma ferramenta que pode ser utilizada tanto para identificar como também para determinar a diversidade dentro de espécies de bactérias (BULL et al., 2015; NTAMBO et al., 2019; SHI, et al., 2023).

Em estudos mais recentes realizados por Shi et al. (2023), foi demonstrado a eficiência do uso MLSA com cinco genes *housekeeping* (*atpD-dnaK-gyrB-efp-rpoD*) para estudar a diversidade genética de espécies de *Xpm*, porém, o estudo aplicado foi mais abrangente, ou seja, com isolados de diferentes continentes e como resultado, conseguiram separar em grupo de cepas do continente asiático (China e Camboja), da África (Uganda) e da região do Pacífico Central (Micronésia).

Nesse sentido, no presente trabalho, através da análise MLSA além da identificação também foi possível observar a variabilidade dentre os isolados oriundos de várias regiões produtoras de mandioca do Estado do Pará, os quais formaram cinco clados distintos na árvore filogenética. O percentual de 2% de variabilidade genética para os isolados de *Xpm* determinado neste trabalho está de acordo com os parâmetros mencionados por Constantin et al. (2016), que considerou o valor 95% de similaridade o limite para o delineamento de

espécies ao comparar genomas completos de varias espécies de *Xanthomonas axonopodis* por matriz de similaridade gerada pela identidade média de nucleotídeos. Além disso, no mesmo trabalho mencionado anteriormente, foi obtido 99% similaridade entre cepas de *Xpm* originárias de países da América do Sul, resultado coerente com os resultados encontrado neste estudo onde a maioria dos isolados obtiveram distâncias entre 0,00 a 0,02, com excessão de poucos isolados que apresentaram valores superiores. Porém, para a maioria dos isolados do Estado do Pará, a diversidade observada na filogenia não obteve correlação com os dendogramas analisados da rep-PCR e nem com os dados analisados dos marcadores VNTR, também comprovado pelo teste de Mantel na tabela 6.

O ERIC-PCR apresentou menor polimorfismo em relação ao BOX para *Xpm*, diferentemente dos estudos de Restrepo et al. (2000) que mostraram um alto nível de polimorfismo entre linhagens desta espécie originárias de diferentes zonas edafoclimáticas na Colômbia. Trabalho realizado com isolados de diferentes regiões produtoras de mandioca do Brasil demonstrou que ERIC-PCR é o marcador que melhor separou os grupos por população e apresentou maior similaridade entre os isolados de mesma população (OLIVEIRA et al., 2023).

Nessa perspectiva, a falta de correlação entre agrupamentos rep-PCR e origem geográfica das cepas é um indicativo que a bactéria está disseminada entre diferentes regiões produtoras do Estado do Pará. Neste estudo, o ERIC-PCR foi capaz de distinguir espécies de *Xpm* de outras espécies de mesmo gênero, isto indica que o padrão de *fingerprinting* (ERIC-PCR) pode ser considerado uma importante ferramenta para identificar e monitorar a presença deste patógeno em áreas de ocorrência da bacteriose da mandioca, mas não para separar populações de acordo com o local de origem, principalmente em regiões de intenso fluxo gênico. Diferentemente do que foi relatado no presente trabalho, Oliveira et al. (2023) consideraram o ERIC-PCR como melhor marcador para separar os grupos por população e apresentou maior similaridade entre os isolados de uma mesma população.

Importantes pesquisas têm comprovado a alta discriminação das cepas de *Xpm* com marcadores VNTR polimórficos em um esquema de análise VNTR multi-locus para vigilância epidemiológica da bacteriose da mandioca (ARRIETA-ORTIZ et al., 2013; RACHE et al., 2019; RACHE, et al. 2023; OLIVEIRA et al., 2023). Um aspecto bastante importante para compreender foi o uso de vários esquemas VNTRs, com oito, doze e quatorze marcadores e os resultados mostraram que nem sempre esquema VNTRs com alto

quantitativo de marcadores serão os melhores, pois apresentaram resolução discriminatória diferenciada para isolados de diferentes localidades (RACHE, et al. 2023).

Ainda sobre a recente pesquisa de Rache et al. (2023), envolvendo cepas de países da América do Sul, da África, Ásia e Nova Zelândia comprovaram que os isolados do Brasil são bastante polimórficos e ficaram dispersos em agrupamentos com cepas de outros países da América do Sul, demonstrando uma relação de ancestralidade. Essa distribuição dispersa dos isolados pode ser ocasionada por transferência horizontal de genes a qual gera alto grau de similaridade entre as cepas doadoras e receptoras para o caráter em questão. Além disso, como cada evento de transferência envolve a introdução de DNA numa única linhagem, a característica adquirida será limitada aos descendentes da estirpe receptora e ausente de táxons estreitamente relacionados (OCHMAN et al, 2000).

Além disso, tanto em escala global, nacional ou local, a principal causa da dispersão e consequente o alto fluxo gênico do patógeno é em decorrência da propagação da bactéria por materiais vegetativos contaminados. Assim como sugerido por Rache et al. (2019) que ressaltam sobre a migração de patógenos através de material propagativo contaminado. A outra forma de dispersão também pode ser por sementes de plantio contaminado, pois podem estar infectadas sem apresentar sintomas com o patógeno adormecido no embrião, consequentemente, a germinação ocorre normalmente, mas os sintomas serão manifestados no caule e nas folhas (ELANGO et al., 1980; LOZANO, 1986).

Oliveira et al. (2023) recentemente publicaram dados sobre estudo de diversidade genética de isolados coletados em diferentes regiões geográficas do Brasil, esses resultados foram de grande relevância para serem usados de forma comparativa, no entanto, este é o primeiro relato de estudo sobre diversidade genética com isolados de *Xpm* do Estado do Pará.

Com relação à variabilidade na patogenicidade, todos os isolados apresentaram sintomas típicos da doença conforme descritos por Lozano (1986), porém com níveis de agressividade variados. No entanto, é recorrente que os sintomas podem variar na predominância e gravidade de acordo com a localização, estação do ano, agressividade das cepas bacterianas ocorrentes e das cultivares de mandioca (MARAITE, 1993).

Martin et al. (2017) também observaram em seus ensaios que o ambiente é capaz de gerar variação da agressividade entre isolados de *Xpm* ao estudarem a distribuição de isolados de *Xpm* na Costa do Marfim e a sensibilidade de reação de oito cultivares de mandioca ao patógeno. Além disso, este trabalho demonstrou que a severidade da doença foi muito baixa na estação seca, em contrapartida, o período chuvoso contribuiu para a expansão da doença.

Essas diferenças podem ser atribuídas a diferenças na composição genética dos isolados bacteriano (CHEGE et al., 2017). Nessa perspectiva, outros trabalhos também apresentaram velocidades diferentes no aparecimento dos sintomas de bacteriose (NERY -SILVA et al., 2007; BANITO et al., 2010; OGUNJOBI et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2021; AQUILES et al., 2021).

Com base nos diferentes valores de severidade observados no presente trabalho, constatou-se que os diferentes níveis de agressividade apresentados mostraram não haver correlação com a origem geográfica dos patógenos. Restrepo e Verdier (1997) ao estudarem a diversidade em diferentes zonas edafoclimáticas da Colômbia utilizando a técnica RFLP, também não encontraram relação entre a patogenicidade com a origem geográfica e nem com os grupos genéticos encontrados. Segundo os autores, há limitação nos testes de patogenicidade, pois estes foram conduzidos somente em uma variedade de mandioca, assim como neste estudo. Porém, Trujillo et al., (2014) testaram dez isolados representativos da diversidade encontrada na região do Caribe em nove acessos de mandioca e também não obtiveram correlações nos resultados.

Portanto, a técnica MLSA foi eficiente para identificar e dar indícios de diversidade para os isolados de *Xpm* investigados, enquanto a rep-PCR foi importante para obtenção de informações da diversidade da bactéria. Os marcadores VNTRs em esquema multilocus apresentaram os melhores resultados para explicar as relações de variabilidade dos isolados de *Xpm* no Estado do Pará. Esses métodos aplicados também são considerados úteis no estudo da etiologia e epidemiologia de bactérias fitopatogênicas (BULL et al., 2015). Dessa forma, a variabilidade na agressividade do patógeno também pode haver correlação com a variabilidade genética para alguns isolados, como Xam 17 e Xam 18, os quais apresentaram neste estudo alta similaridade genética em todos os testes moleculares e também nas médias de severidade da doença que não diferiram estatisticamente.

5 CONCLUSÕES

- Os isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* provenientes de várias regiões produtoras de mandioca do Estado do Pará apresentam uma grande diversidade genética, o que sugere a ocorrência de disseminação desse patógeno por propagação vegetativa nos municípios amostrados;
- A técnica MLVA foi eficiente para demonstrar a distância genética entre os isolados e quantificar os haplótipos presentes;

- Os isolados Xam 17 e Xam 18 apresentaram maiores valores de variabilidade genética, alta identidade no MLSA e similaridade de 100% em todos os ensaios de marcadores VNTRs, além das médias de severidade da doença não diferirem significativamente;
- Todos os isolados de *Xpm* inoculados incitaram sintomas típicos da bacteriose, porém foi observada variação patogênica entre os isolados;
- Os isolados Xam 3 e Xam 4 originários do município de Castanhal e o Xam 35 do município de Igarapé-Açu foram os que apresentaram maiores médias de severidade da doença sendo considerados os mais agressivos;
- A diversidade genética encontrada entre os isolados de *Xpm* originários do Estado do Pará não está correlacionada com a origem geográfica e nem com a patogenicidade.

REFERÊNCIAS

- ACHTMAN, M. Evolução, estrutura populacional e filogeografia de patógenos bacterianos geneticamente monomórficos. **Anu. Rev. Microbiol.**, v. 62, pág. 53-70, 2008.
- ALVES, M. L. B.; TAKATSU, A. Variability in *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 485-494, 1984.
- AN, S. et al. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. **FEMS microbiology reviews**, v. 44, n. 1, p. 1-32, 2020.
- AQUILES, K. R. et al. Reaction of Sweet Cassava Genotypes to *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* From Three Regions of Brazil. 2021.
- ARRIETA-ORTIZ, M. L. et al. 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.
- AUSUBEL, F.M. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York: Greene Publishing Association; Wiley-Interscience, 1992.
- AZEVEDO, A. Multivariate Analysis: Pacote Para Analise Multivariada. *R* package version 0.4.4, 2021.
- BANITO, A. et al. Screening of cassava genotypes for resistance to bacterial blight using strain× genotype interactions. **Journal of Plant Pathology**, p. 181-186, 2010.
- BART, R. et al. High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 28, p. E1972-E1979, 2012.
- BULL, C. T.; KOIKE, S. T. Practical benefits of knowing the enemy: modern molecular tools for diagnosing the etiology of bacterial diseases and understanding the taxonomy and diversity of plant-pathogenic bacteria. **Annual review of phytopathology**, v. 53, p. 157-180, 2015.
- CARDOSO, S. V. D. et al. Variabilidade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* no Estado do Pará. **In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA**, 48.; CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA PÓS-COLHEITA, 2., 2015, São Pedro. Fitopatologia de precisão: fronteiras da ciência: anais. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2015.
- CHEGE, M. N. et al. Phenotypic and genotypic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing bacterial blight disease of cassava in Kenya. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 038-044, 2017.
- CHIOU, C. 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.
- CONSTANTIN, E. C. et al. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology**, v. 65, n. 5, p. 792-806, 2016.

CUBERO, J.; GRAHAM, J. H. The leucine-responsive regulatory protein (lrp) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 429-437, 2004.

DERAL/SEAB, Previsão de Safras. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/deral/safras>>. **Acesso em:** 10 de setembro de 2024.

ELANGO, F. et al. Transmission of *Xanthomonas manihotis* in seed of cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Dis**, v. 64, p. 784-786, 1980.

ELANGO, F. N.; LOZANO, J. C. Epiphytic survival of *Xanthomonas manihotis* on common weeds in Colombia. **Series 03E (CIAT)**, 1981.

ELANGO, F.; LOZANO, J. C. Pathogenic variability of *Xanthomonas manihotis*, the causal agent of cassava bacterial blight. **Fitopatologia Brasileira**, 1981.

EMBRAPA. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mandioca>>. **Acesso em:** 10 de setembro de 2022.

FARGIER, E.; FISCHER-LE SAUX, M.; MANCEAU, C.. A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 156-165, 2011.

FERREIRA, M. A. S. V. et al. *Xanthomonas citri* pv. *viticola* affecting grapevine in Brazil: Emergence of a successful monomorphic pathogen. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 489, 2019.

FIALHO, J. de F. et al. Cultivo da mandioca para a Região do Cerrado. 2017.

GROUSSON, F. et al. Etude de la variabilité d'un agent pathogène, *Xanthomonas campestris* pv *manihotis*, par l'analyse factorielle multiple. **Agronomie**, v. 10, n. 8, p. 627-640, 1990.

HAMMER, Ø. et al. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HAMZA, A. A. et al. MultiLocus Sequence Analysis-and Amplified Fragment Length Polymorphism-based characterization of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper and their relatedness to *Xanthomonas* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 183-190, 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Disponível em:** <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. **Acesso em:** 11 de março de 2024.

Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: < [https:// portal.inmet.gov.br](https://portal.inmet.gov.br)>. **Acesso em:** 22 de janeiro de 2024.

ISHIDA, A. K. N. et al. Incidência da bacteriose da mandioca (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) no Estado do Pará. 2016.

KADO, C. I.; M. G. HESKETT. Selective media for isolation of agrobacterium, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.

- KEIM, P. et al. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 3, p. 205-213, 2004.
- KUBLIK, G. et al. Desenvolvimento e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da bacteriose em mandioca. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 18, n. 2, p. 75-81, 2020.
- KUMAR, S. et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in bioinformatics**, v. 9, n. 4, p. 299-306, 2008.
- LOUWS, F. J. et al. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2286-2295, 1994.
- LOZANO, J. C. et al. Cassava bacterial blight: a manageable disease. **Plant Dis**, v. 70, n. 12, p. 1989-1993, 1986.
- LOZANO, J.C.; SEQUEIRA, L. Bacterial blight of cassava in Colombia; etiology. **Phytopathology**, 64, 74-82. 1974.
- LSPA - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – Disponível: <[IBGEhttps://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html](https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html)>. **Acesso em:** 11 de março de 2024.
- MAMBA-MBAYI, G. et al. Characterization of Congolese Strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* associated with Cassava Bacterial Blight. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2014.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer research**, v. 27, n. 2_Part_1, p. 209-220, 1967.
- MARAITE, H. *Xanthomonas campestris* pathovars on cassava: cause of bacterial blight and bacterial necrosis. In: **Swings, J.G. and Civerolo, E.L. (Eds.) Xanthomonas**. London, UK: Springer Science + Business Media Dordrecht, pp. 18–25, 1993.
- MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. Manual de práticas em fitobacteriologia. **Recife: UFRPE**, n. 234, 2016.
- MARTIN, A. A. et al. Geographical distribution and incidence of cassava bacterial blight (*Manihot esculenta* Crantz) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in two agro-ecological zones of Cote d'Ivoire. **Plant Pathology Journal** (Faisalabad), v. 16, n. 1, p. 1-11, 2017.
- MASSOLA, N.S. Jr.; BEDENDO, I.P. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 2005.
- MELO, R. C. C. et al. Improvement of the specific detection of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* based on the pthB gene. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 41, 2019.
- MUNHOZ, C. F. et al. Genetic diversity and a PCR-based method for *Xanthomonas axonopodis* detection in passion fruit. **Phytopathology**, v. 101, n. 4, p. 416-424, 2011.

- NERY-SILVA, F. A. et al. Reação de germoplasma de mandioca a *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihots*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 3-10, 2007.
- NTAMBO, M. S. et al. Identification and characterization of *Xanthomonas albilineans* causing sugarcane leaf scald in China using multilocus sequence analysis. **Plant Pathology**, v. 68, n. 2, p. 269-277, 2019.
- OCHMAN, Howard; LAWRENCE, Jeffrey G.; GROISMAN, Eduardo A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **nature**, v. 405, n. 6784, p. 299-304, 2000.
- OGUNJOBI, A. A. et al. Assessment of large population of cassava accessions for resistant to cassava bacterial blight infection in the screen house environment. **Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development**, v. 2, n. 6, p. 87, 2010.
- OGUNJOBI, A. A. et al. Molecular genetic study of cassava bacterial blight casual agent in Nigeria using random amplified polymorphic DNA. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, p. 2364-2376, 2007.
- OGUNJOBI, A. A. Molecular variation in population structure of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in the south eastern Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 20, 2006.
- OLIVEIRA, L. B. et al. Genetic diversity of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* populations using rep-PCR and VNTR molecular markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 58, p. e03299, 2023.
- OPGENORTH, T. J. et al. Pharmacological characterization of A-127722: an orally active and highly potent ETA-selective receptor antagonist. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 276, n. 2, p. 473-481, 1996.
- PERUCH, L. A. M. et al. Sintomas e controle das principais doenças da mandioca em Santa Catarina. **Agropecuária Catarinense**, v. 26, n. 2, p. 52-54, 2013.
- PORTZ, R. L. Caracterização de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* por análise de isoenzimas e agressividade. 2003. 48 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, 2003.
- PORTZ, R. L. et al. Caracterização de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 3, p. 413-419, 2006.
- RACHE, L. et al. A minisatellite-based MLVA for deciphering the global epidemiology of the bacterial cassava pathogen *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*. **Plos one**, v. 18, n. 5, p. e0285491, 2023.
- RACHE, L. et al. An optimized microsatellite scheme for assessing populations of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*. **Phytopathology**, v. 109, n. 5, p. 859-869, 2019.
- RESTREPO, S. et al. Characterization of pathotypes among isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. **Plant Pathology**, v. 49, n. 6, p. 680-687, 2000.
- RESTREPO, S. et al. Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. **Phytopathology**, v. 90, n. 7, p. 683-690, 2000.

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.

ROCKEY, W. et al. Multilocus sequence analysis reveals genetic diversity in xanthomonads associated with Poinsettia production. **Plant Disease**, v. 99, n. 6, p. 874-882, 2015.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 1051- 1056, 1977.

SHI, T. et al. Multilocus Sequence Analysis and Detection of Copper Ion Resistance of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* Causing Bacterial Blight in Cassava. **Current issues in molecular biology**, v. 45, n. 7, p. 5389-5402, 2023.

SIVIERO, A. et al. Variedades de mandioca do Acre. 2019.

SNEATH P.H.A.; SOKAL R.R. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco. 1973.

TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TEIXEIRA, J. H. S. et al. Evaluation of resistance to bacterial blight in Brazilian cassava germoplasm and disease-yield relationships. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, p. 324-335, 2021.

THOMPSON, J. D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRUJILLO, C. A. et al. A complex population structure of the cassava pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in recent years in the Caribbean Region of Colombia. **Microbial ecology**, v. 68, p. 155-167, 2014.

VERDIER, V. et al. Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Microbiology**, v. 139, n. 11, p. 2591-2601, 1993.

VERSALOVIC, J. et al. Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In: **Bacterial genomes: physical structure and analysis**. Boston, MA: Springer US, p. 437-454, 1998.

YOUNG, J. M. et al. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and applied microbiology**, v. 31, n. 5, p. 366-377, 2008.

YOUNG, J. M. et al. New Zealand strains of plant pathogenic bacteria classified by multi-locus sequence analysis; proposal of *Xanthomonas dyei* sp. nov. **Plant pathology**, v. 59, n. 2, p. 270-281, 2010.

ZÁRATE-CHAVES, C. A. et al. Cassava diseases caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* and *Xanthomonas cassavae*. **Molecular plant pathology**, v. 22, n. 12, p. 1520-1537, 2021.

MATERIAL SUPLEMENTAR:

Tabela S1- Sequências de referência de espécies de *Xanthomonas* depositadas no GenBank utilizadas na análise filogenética.

Espécie	Acesso GenBank			
	dnaK	fyuA	gyrB	rpoD
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (ICMP 17033)	EU498848.1		EU499066.1	EU499186.1
<i>Xanthomonas albilineans</i> (ICMP 10041)	EU498833.1		EU499048.1	EU499168.1
<i>Xanthomonas alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i> (ICMP 10010)	EU498827.1	EU498927.1	EU499043.1	EU499163.1
<i>Xanthomonas arboricola</i> (ICMP 16473)	EU498842.1		EU499057.1	EU499177.1
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>celebensis</i> (ICMP 1488)	EU498776.1		EU498984.1	EU499103.1
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> (ICMP 5726)	EU498793.1		EU499002.1	EU499121.1
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> (ICMP 35)	EU498750.1	EU498852.1	EU498951.1	EU499070.1
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>populi</i> (ICMP 8923)	EU498819.1		EU499035.1	EU499155.1
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> (ICMP 51)			EU498953.1	EU499072.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> (ICMP 698)			EU498981.1	EU499100.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>alfalfae</i> (ICMP 4765)	EU498788.1	EU498890.1	EU498997.1	EU499116.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> (ICMP 8432)	EU498811.1	EU498913.1	EU499027.1	EU499146.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i> (ICMP 50)	EU498751.1	EU498853.1	EU498952.1	EU499071.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> (ICMP 194)	EU498757.1	EU498859.1	EU498962.1	EU499081.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>cajani</i> (ICMP 444)	EU498767.1	EU498869.1	EU498973.1	EU499092.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (ICMP 24)	EU498747.1	EU498851.1	EU498950.1	EU499069.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> (ICMP 5732)	EU498794.1	EU498896.1	EU499003.1	EU499122.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>mabeae</i> (LPF 609)	KY205650.1	KY205659.1	KY273421.1	KY273430.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> (ICMP 217)	EU498760.1	EU498862.1	EU498966.1	EU499085.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> (ICMP 5741)	EU498796.1	EU498898.1	EU499006.1	EU499125.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> (IBSBF960)			KX537704.1	KX537726.1

<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> (ICMP 239)	EU498761.1	EU498863.1	EU498967.1	EU499086.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>ricini</i> (ICMP 3031)	EU498782.1	EU498884.1	EU498991.1	EU499110.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>shini</i> (LPF 603)	KY205644.1	KY205653.1	KY273415.1	KY273424.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> (ICMP 5757)	EU498798.1	EU498900.1	EU499011.1	EU499130.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vignicola</i> (ICMP 333)	EU498764.1	EU498866.1	EU498970.1	EU499089.1
<i>Xanthomonas bromi</i> (ICMP 12545)	EU498837.1	EU498937.1	EU499052.1	EU499172.1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (ICMP 13)	EU498747.1	EU498849.1	EU498948.1	EU499067.1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>incanae</i> (ICMP 574)	EU498771.1		EU498977.1	EU499096.1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i> (ICMP 1404)	EU498775.1		EU498982.1	EU499101.1
<i>Xanthomonas cassavae</i> (ICMP 204)	EU498759.1	EU498861.1	EU498965.1	EU499084.1
<i>Xanthomonas codiae</i> (ICMP 9513)	EU498822.1	EU498922.1	EU499038.1	EU499158.1
<i>Xanthomonas cucurbitae</i> (ICMP 2299)	EU498780.1	EU498882.1	EU498989.1	EU499108.1
<i>Xanthomonas cynarae</i> (ICMP 16775)	EU498846.1	EU498946.1	EU499061.1	EU499181.1
<i>Xanthomonas dyei</i> pv. <i>dysoxyli</i> (ICMP 2415)	EU498781.1	EU498883.1	EU498990.1	EU499109.1
<i>Xanthomonas fragariae</i> (ICMP 5715)	EU498791.1	EU498893.1	EU499000.1	EU499119.1
<i>Xanthomonas gardneri</i> (ICMP 16689)	EU498843.1	EU498943.1	EU499058.1	EU499178.1
<i>Xanthomonas hortorum</i> (ICMP 453)	EU498769.1	EU498871.1	EU498975.1	EU499094.1
<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>hederae</i> (ICMP 1661)	EU498778.1		EU498987.1	EU499106.1
<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> (ICMP 4321)	EU498787.1		EU498996.1	EU499115.1
<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>taraxaci</i> (ICMP 579)	EU498772.1		EU498978.1	EU499097.1
<i>Xanthomonas hyacinthi</i> (ICMP 189)			EU498960.1	EU499079.1
<i>Xanthomonas melonis</i> (ICMP 8683)	EU498816.1	EU498916.1	EU499032.1	EU499152.1
<i>Xanthomonas oryzae</i> (ICMP 3125)	EU498784.1	EU498886.1	EU498993.1	EU499112.1
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> (ICMP 5743)	EU498797.1		EU499007.1	EU499126.1
<i>Xanthomonas perforans</i> (ICMP 16690)	EU498844.1	EU498944.1	EU499059.1	EU499179.1
<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i> (CHN01)	CP083575.1		CP083575.1	CP083575.1
<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i> (GX08)	NZ_JADKPW010000017.1		NZ_JADKPW010000019.1	NZ_JADKPW010000024.1
<i>Xanthomonas pisi</i> (ICMP 570)	EU498770.1	EU498872.1	EU498976.1	EU499095.1

<i>Xanthomonas populi</i> (ICMP 5816)	EU498801.1	EU498903.1	EU499014.1	EU499133.1
<i>Xanthomonas sacchari</i> (ICMP 16916)			EU499063.1	EU499183.1
<i>Xanthomonas theicola</i> (ICMP 7291)			EU499021.1	EU499140.1
<i>Xanthomonas translucens</i> (ICMP 5752)			EU499009.1	EU499128.1
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>cerealis</i> (ICMP 1409)			EU498983.1	EU499102.1
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i> (ICMP 5733)			EU499004.1	EU499123.1
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>secalis</i> (ICMP 5749)			EU499008.1	EU499127.1
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i> (ICMP 5755)			EU499010.1	EU499129.1
<i>Xanthomonas vasicola</i> (ICMP 3103)	EU498783.1	EU498885.1	EU498992.1	EU499111.1
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> (ICMP 63)	EU498753.1	EU498855.1	EU498954.1	EU499073.1

FERRAZ, H lvio Gledson Maciel et al. *Xanthomonas axonopodis* pv. *eucalyptorum* pv. nov. causing bacterial leaf blight on eucalypt in Brazil. **The plant pathology journal**, v. 34, n. 4, p. 269, 2018.

YOUNG, J. M. et al. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and applied microbiology**, v. 31, n. 5, p. 366-377, 2008.

MATERIAL SUPLEMENTAR:

Tabela S2- Estimativas de divergência evolutiva entre sequências de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*.

Ano de coleta	Isolados	Local de coleta	Xam 1	Xam 3	Xam 4	Xam 6	Xam 8	Xam 10	Xam 14	Xam 15	Xam 16	Xam 17	Xam 18	Xam 19	Xam 20	Xam 21	Xam 23	Xam 25	Xam 26	Xam 27	Xam 28	Xam 29	Xam 30	Xam 31	Xam 35	Xam 36	Xam 37	Xam 38
2011	Xam 1	Acara PA																										
2011	Xam 3	Castanhal PA	0,01																									
2012	Xam 4	Castanhal PA	0,02	0,01																								
2013	Xam 6	Castanhal PA	0,01	0,01	0,02																							
2013	Xam 8	Castanhal PA	0,05	0,05	0,05	0,05																						
2013	Xam 10	Castanhal PA	0,01	0,01	0,02	0,00	0,05																					
2014	Xam 14	Capitao Poco PA	0,02	0,01	0,02	0,01	0,06	0,01																				
2014	Xam 15	Acara PA	0,01	0,01	0,02	0,00	0,05	0,00	0,01																			
2014	Xam 16	Acara PA	0,01	0,01	0,02	0,00	0,05	0,01	0,01	0,00																		
2014	Xam 17	Acara PA	0,05	0,04	0,04	0,04	0,08	0,05	0,05	0,04	0,05																	
2014	Xam 18	Acara PA	0,08	0,07	0,08	0,08	0,10	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09																
2014	Xam 19	Acara PA	0,01	0,01	0,02	0,00	0,05	0,01	0,01	0,00	0,01	0,05	0,08															
2014	Xam 20	Acara PA	0,01	0,01	0,02	0,00	0,05	0,00	0,01	0,00	0,00	0,05	0,08	0,00														
2014	Xam 21	Ananideua	0,01	0,01	0,02	0,00	0,05	0,00	0,01	0,00	0,00	0,04	0,08	0,00	0,00													
2014	Xam 23	Santa Izabel PA	0,01	0,01	0,02	0,00	0,05	0,01	0,01	0,00	0,01	0,05	0,08	0,01	0,00	0,00												
2015	Xam 25	Tracuateua PA	0,01	0,01	0,02	0,01	0,05	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04	0,08	0,01	0,01	0,00	0,01											
2015	Xam 26	Tracuateua PA	0,01	0,01	0,02	0,00	0,05	0,00	0,01	0,00	0,01	0,05	0,08	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01										
2015	Xam 27	Igarape Acu PA	0,01	0,01	0,02	0,00	0,05	0,01	0,01	0,00	0,01	0,05	0,08	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01									
2016	Xam 28	Igarape Acu PA	0,01	0,01	0,02	0,01	0,05	0,01	0,02	0,01	0,01	0,05	0,08	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01								
2015	Xam 29	Igarape Acu PA	0,01	0,01	0,02	0,00	0,05	0,01	0,01	0,00	0,01	0,04	0,08	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01							
2015	Xam 30	Sao Francisco do Para PA	0,01	0,02	0,03	0,01	0,06	0,01	0,02	0,01	0,01	0,05	0,08	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01						
2016	Xam 31	Braganca PA	0,02	0,02	0,03	0,01	0,06	0,01	0,02	0,01	0,02	0,06	0,09	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02					
2016	Xam 35	Igarape Acu PA	0,01	0,01	0,02	0,01	0,05	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	0,08	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02			
2015	Xam 36	Tailandia PA	0,02	0,01	0,02	0,01	0,06	0,01	0,02	0,01	0,01	0,05	0,08	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01		
2016	Xam 37	Belem PA	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02		
2016	Xam 38	Castanhal PA	0,02	0,02	0,03	0,01	0,06	0,02	0,02	0,01	0,02	0,06	0,09	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	
		CMP 5741	0,01	0,01	0,01	0,00	0,05	0,00	0,01	0,00	0,00	0,04	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01

ARTIGO 2: SELEÇÃO DE MATERIAIS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* CRANTZ) COM RESISTÊNCIA À BACTERIOSE.

Sandra Valéria Dias Cardoso¹; Alessandra Keiko Nakasone²; Ricardos Magela de Souza¹

¹ Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras 37200-900, Brasil

² Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Dr. Enéas Pinheiro s/n, Belém 66095-903, Brasil

RESUMO

A bacteriose ou murcha bacteriana causada pela bactéria *Xanthomonas phaseolis* pv. *manihotis* é uma das doenças de maior importância econômica na cultura da mandioca. Sua intensidade está relacionada, principalmente, com a resistência e idade da planta e com as condições edafoclimáticas. Dessa forma, a seleção de cultivares resistentes é conhecida como a melhor estratégia de controle contra esta doença. O objetivo com o presente trabalho foi selecionar cultivares de mandioca resistente à bacteriose em casa de vegetação utilizando materiais de mandioca selecionados em programas de melhoramento genético. Foram avaliadas vinte e nove cultivares e dois clones de mandioca provenientes dos bancos de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, da Embrapa Cerrado e da Embrapa Amazônia Oriental. Foi usado como padrão de resistência a cultivar BRS Taquari e como padrão de suscetibilidade a BRS Vassourinha. A seleção de material quanto à resistência a *X. phaseoli* pv. *manihotis* foi realizada em casa-de-vegetação contra os dois isolados mais agressivos selecionados previamente por teste de agressividade. Os resultados de reação das cultivares à *Xpm* demonstraram que todos os materiais de mandioca exibiram sintomas com níveis de incidência variados. As cultivares BRS Boitatá, BRS Pretinha, BRS Tapioqueira, BRS Verdinha, BRS 14-10-11, BRS 420, BRS Caipira, BRS 17-012-19, BRS Ocauçu, BRS 17 - 020 -10, BRS Novo horizonte, BRS Dourada, BRS 429, BRS Rendeira, BRS 418, BRS 419, BRS 2012 34 – 15, BRS Prata, BRS Progresso, BRS Poti branca, BRS Mari, BRS Vassourinha e BRS Formosa foram classificadas como resistentes.

Palavras-chave: severidade da doença; murchadeira; *Manihot esculenta*

ABSTRACT

A bacteriose ou murcha bacteriana causada pela bactéria *Xanthomonas phaseolis* pv. *manihotis* é uma das doenças de maior importância econômica na cultura da mandioca. Sua intensidade está relacionada, principalmente, com a resistência e idade da planta e com as condições edafoclimáticas. Dessa forma, a seleção de cultivares resistentes é conhecida como a melhor estratégia de controle contra esta doença. O objetivo com o presente trabalho foi selecionar cultivares de mandioca resistente à bacteriose em casa de vegetação utilizando materiais de mandioca selecionados em programas de melhoramento genético. Foram avaliadas vinte e nove cultivares e dois clones de mandioca provenientes dos bancos de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, da Embrapa Cerrado e da Embrapa Amazônia Oriental. Foi usado como padrão de resistência a cultivar BRS Taquari e como padrão de suscetibilidade a BRS Vassourinha. A seleção de material quanto à resistência a *X. phaseoli* pv. *manihotis* foi realizada em casa-de-vegetação contra os dois isolados mais agressivos selecionados previamente por teste de agressividade. Os resultados de reação das cultivares à *Xpm* demonstraram que todos os materiais de mandioca exibiram sintomas com níveis de incidência variados. As cultivares BRS Boitátá, BRS Pretinha, BRS Tapioqueira, BRS Verdinha, BRS 14-10-11, BRS 420, BRS Caipira, BRS 17-012-19, BRS Ocauçu, BRS 17 - 020 -10, BRS Novo horizonte, BRS Dourada, BRS 429, BRS Rendeira, BRS 418, BRS 419, BRS 2012 34 – 15, BRS Prata, BRS Progresso, BRS Poti branca, BRS Mari, BRS Vassourinha e BRS Formosa foram classificadas como resistentes.

Keywords: disease severity; wither; *Manihot esculenta*.

1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com seu longo ciclo de vida é acometida por várias doenças das quais a bacteriose causa sérios danos à produção em regiões cultivadas nos países da América Latina, onde as flutuações diárias de temperatura e chuva favorecem o desenvolvimento de doenças (TAKATZU et al, 1978; ELANGO; LOZANO, 1981).

Considerando que a mandioca se destina a sustentar principalmente agricultores de baixa renda, a implantação de variedades tolerantes ou resistentes é considerada a principal solução para o controle da bacteriose (ZÁRATE-CHAVES et al., 2021). Mas em função da grande variação edafoclimática onde a mandioca se desenvolve no Brasil, os trabalhos de seleção e melhoramento com a cultura para diferentes formas de utilização são dirigidos para ecossistemas específicos (FUKUDA et al. 2002).

A seleção clonal e o melhoramento para resistência à doença da mandioca começaram na década de 1940, porém, a implantação de variedades de mandioca resistentes a *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* em cultivares comerciais é relativamente recente. Para o Estado do Pará, atualmente há duas cultivares de mandioca recomendadas pela Embrapa Amazônia Oriental para plantio, que são a BRS Poti e BRS Mari, resistentes à podridão-mole-da-raiz, doença que causa perda total nos plantios (ALBUQUERQUE, 2008a, 2008b). No entanto, para a bacteriose ainda não se têm estudos dessas cultivares no referido Estado. Elas foram geradas a partir do cruzamento entre uma variedade com reconhecida resistência à doença, mas adaptada ao Estado do Amazonas, e variedades produtivas adaptadas ao Pará (JUNIOR et al., 2016).

A Embrapa Mandioca e Fruticultura recomenda a cultivar BRS Formosa para as microrregiões de Valença, Santo Antônio de Jesus, Jequié e sudoeste da Bahia. Enquanto a variedade BRS Purus indicada pela Embrapa Amazônia Ocidental para o Estado do Amazonas, porém não é tolerante à bacteriose e a Embrapa Roraima recomenda as cultivares BRS Japonesa e BRS Moura, as quais conferem resistência à bacteriose, para regiões do cerrado e mata de transição (EMBRAPA, 2018).

A introdução dessas cultivares resistentes de mandioca correlacionou-se com uma mudança na diversidade patogênica das populações de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*, ou seja, novas linhagens do patógeno emergem e suplantam a resistência implantada (DIXON et al., 2002; OGUNJOBI, 2006; ZÁRATE-CHAVES et al., 2021). Pois, sabe-se que a durabilidade da resistência a doenças é afetada pelo potencial evolutivo da população dos patógenos (MCDONALD; LINDE, 2002).

Xanthomonas phaseoli pv. *manihotis* tem recebido considerável atenção devido ao seu potencial devastador nos trópicos e importância científica em todo o mundo (MANSFIELD et al., 2012). Embora as populações desse patógeno dentro de uma região geralmente fossem semelhantes, em alguns casos cepas geneticamente semelhantes foram detectadas em diferentes regiões, sugerindo a migração de cepas entre países (ASSIGBETSE et al., 1996; WYDRA et al., 1998).

Nessa perspectiva, estudos histológicos e citoquímicos dos mecanismos de resistência em mandioca durante a infecção pela bactéria mostraram deposição de calose que atua como uma barreira nas células do parênquima cortical e floema para bloquear a multiplicação e dispersão bacteriana (KPÉMOUA et al., 1996; SANDINO et al., 2015). Outros mecanismos de resposta de defesa, incluindo fortificação da parede celular, lignificação, suberização associada à deposição de calose e produção de flavonoides e polissacarídeos também foram observados e são mais rápidos e fortes em cultivares resistentes em comparação com as suscetíveis (KPÉMOUA et al., 1996). Por isso, a resistência da cultura da mandioca à bacteriose é considerada quantitativa (KPÉMOUA et al. 1996).

Esses aspectos estimulam muita curiosidade sobre a contribuição do genótipo do hospedeiro e outros fatores para a diversidade genética do patógeno. Diante desses questionamentos somados a relevância nacional da produção de mandioca do estado do Pará, objetiva-se com este trabalho selecionar cultivares de mandioca resistente à bacteriose em casa de vegetação utilizando materiais de mandioca selecionados em programas de melhoramento genético.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Teste de cultivar

2.1.1 Material vegetal

Foram avaliadas vinte e nove cultivares e dois clones de mandioca provenientes dos bancos de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, da Embrapa Cerrado e da Embrapa Amazônia Oriental (Tabela 1). A cultivar BRS Taquari (Figura 1) foi usada como padrão de resistência e a BRS Vassourinha (Figura 2) como padrão de suscetibilidade. As ramas de aproximadamente sete meses foram cortadas de 10 a 15 centímetros contendo três gemas em cada estaca e adicionadas duas em cada vaso (3 kg) contendo solo para a

propagação. As plantas ficaram em casa de vegetação por um período de aproximadamente quarenta e cinco dias para atingirem as condições ideais para ser montado o ensaio.

Tabela 1 - Variedades e clones de mandioca testados para resistência à *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* e o Banco de Germoplasma procedente.

Material vegetal	Procedência
BRS Verdinha	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS 14 - 10 – 11	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Rendeira 2011 34 – 41	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Poti branca	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Boitató	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Novo horizonte	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Progresso 2011 34 -64	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Ocaçu	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Caipira	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Tapioqueira	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Dourada	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Kiriris	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Gema de ovo	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Pretinha	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Formosa	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS 17 - 020 – 10	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS 2012 34 – 15	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS 399	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Mulatinha	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS 17 - 012- 19	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
BRS Prata	Embrapa Mandioca e Fruticultura - BA
Clone 54/10	Embrapa Cerrados - DF
Clone 1097/13	Embrapa Cerrados - DF
BRS 417	Embrapa Cerrados - DF
BRS 418	Embrapa Cerrados - DF
BRS 419	Embrapa Cerrados - DF
BRS 420	Embrapa Cerrados - DF
BRS 429	Embrapa Cerrados - DF
BRS Taquari ¹	Embrapa Cerrados - DF
BRS Vassourinha ²	Embrapa Cerrados - DF
BRS Mari	Embrapa Amazônia Oriental - PA

¹ Cultivar considerada padrão de resistência para o Distrito Federal

² Cultivar considerada padrão de suscetibilidade para o Distrito Federal

Figura 1 - Planta da cultivar considerada padrão de resistência na região Centro-Oeste do Brasil.

BRS Taquari



Figura 2 - Planta da cultivar considerada padrão de suscetibilidade na região Centro-Oeste do Brasil.

BRS Vassourinha



2.1.2 Inoculação

A seleção de material quanto à resistência a *X. phaseoli* pv. *manihoti* foi realizada em casa-de-vegetação contra dois isolados mais agressivos selecionados no teste de agressividade. Para o uso experimental, os isolados foram transferidos para o meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) pelo método de estrias paralelas e incubados por 48 h a 28 °C. A inoculação dos isolados bacterianos foi realizada quando as plantas apresentarem 5 a 6 pares de folhas verdadeiras, através de pulverização da face inferior das folhas com suspensão bacteriana na concentração de 10^8 UFC/mL. As plantas foram mantidas em câmara úmida em casa-de-vegetação por 24 h após a inoculação.

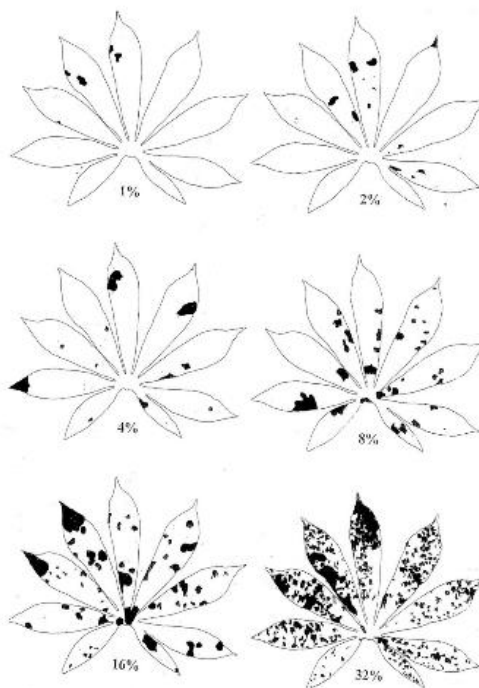
O ensaio foi montado no mês de julho, na estação menos chuvosa, com média das temperaturas mínimas do mês ficou em 23,3°C, enquanto a média das máximas chegou a 34,2°C e umidade relativa do ar de 83.5 % (Inmet, 2024).

2.1.3 Avaliações

As avaliações foram realizadas a cada dois dias após o aparecimento dos sintomas, utilizando-se a escala de notas de Kublik et al. (2020), a qual é baseada em níveis de severidade crescentes (1%, 2%, 4%, 8%, 16% e 32 %) (Figura 3).

As avaliações da severidade da doença foram realizadas aos 6, 8, 10, 13, 15 e 17 dias após a inoculação do patógeno.

Figura 3 - Escala diagramática para quantificação da severidade de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* em folhas de mandioca.



Fonte: Kublik et al. (2020).

2.1.3 Delineamento experimental e análises

O ensaio foi montado em esquema fatorial, composto de dois fatores (isolado x cultivar/clone) e o delineamento foi em blocos casualizados com quatro repetições. Com os valores obtidos a partir da escala diagramática, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), proposta por Shaner e Finney (1977) e os dados foram submetidos a teste estatístico utilizando o *software* Sisvar, onde as médias foram comparadas pelo teste *Scott-Knott* a 5% de probabilidade.

Com base na porcentagem de AACPD de cada cepa, a média dos maiores valores de AACPD foi considerado como 100% e a partir desse dado foram realizados cálculos baseados nos percentuais para a formação de cada grupo: resistentes (0 - 33,2%), moderadamente resistentes (33,3 - 49,9%) e suscetíveis (50 - 100%). Para a AACPD total, a qual é composta pela soma das médias das reações para as duas cepas de cada cultivar, também foi considerada como 100% para a formação dos grupos de resistentes, moderadamente resistentes e suscetíveis com os mesmos parâmetros de percentuais utilizados por Banito et al. (2010).

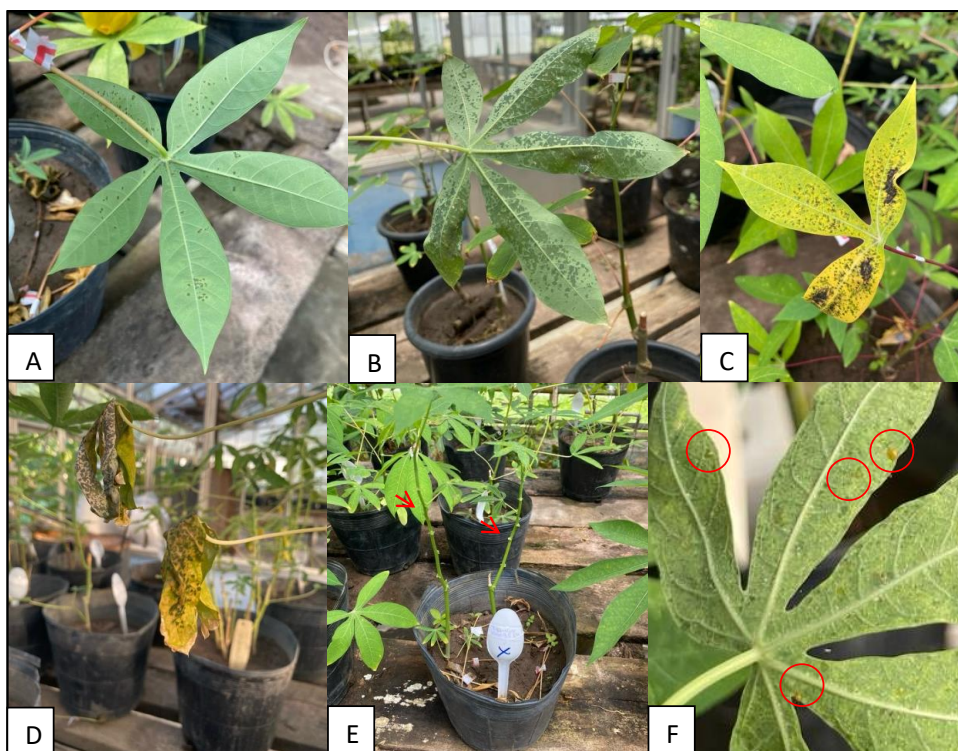
3 RESULTADOS

3.1 Reação de cultivares de mandioca a *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*

Todos os materiais vegetais testados para as bactérias Xam 4 e Xam 35 foram suscetíveis e apresentaram sintomas típicos da bacteriose em diferentes graus de severidade (Figura 4). Na análise de variância, foi verificada diferença significativa entre isolados, entre variedades e também na interação cultivar x isolado (Tabelas 2, 3 e 4).

Os dados da média geral da AACPD da tabela 2 mostra a formação de quatro agrupamentos de similaridade, as cultivares BRS Boitatá, BRS Verdinha, BRS Pretinha, BRS Tapioqueira, BRS Formosa, BRS 14-10-11, BRS Caipira, BRS Ocauaçu, BRS 17-012-19, BRS 420 e BRS 429 foram consideradas as mais resistentes à *Xpm* enquanto a BRS 417 e a BRS Taquari as mais suscetíveis.

Figura 4 - Sintomas da bacteriose apresentados no ensaio em diferentes graus de severidade.



Legenda: Progressão das manchas ao longo da avaliação (A), (B), (C) e (D). Algumas cultivares apresentaram queda de praticamente todas as folhas inoculadas indicadas. Os caules sem folhas são indicados pelas setas em vermelho (E). Gotícula de exsudato bacteriano circundadas em vermelho manifestado pelas cultivares BRS Poti branca inoculada com Xam 35 e BRS 17 inoculada com Xam 4 (F).

Tabela 2 - Severidade média para *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* inoculadas nas diferentes cultivares de mandioca.

Cultivares	AACPD ¹
BRS Boitató	0,07 a ²
BRS Verdinha	3,60 a
BRS Pretinha	5,35 a
BRS Tapioqueira	5,92 a
BRS Formosa	10,34 a
BRS 14-10-11	11,45 a
BRS Caipira	15,16 a
BRS Ocauçu	17,94 a
BRS 17-012-19	19,39 a
BRS 420	20,95 a
BRS 429	23,03 a
BRS 17 - 020 -10	26,16 b
BRS Poti branca	28,56 b
BRS 419	30,49 b
BRS Novo horizonte	30,86 b
BRS Rendeira	35,10 b
BRS Prata	35,72 b
BRS Vassourinha	36,30 b
BRS 399	37,96 b
BRS 2012 34 - 15	39,48 b
BRS Dourada	41,11 b
BRS 418	43,52 b
BRS Mari	45,44 b
BRS Progresso	48,67 b
BRS Kiriris	50,33 b
BRS Mulatinha	70,66 b
Gema de ovo	78,17 b
Clone 1097/13	80,54 b
Clone 54/10	110,08 c
BRS 417	133,64 d
BRS Taquari	164,95 d
CV (%)	64,25

¹AACPD = área abaixo da curva do progresso da doença. ²Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna pelo teste de *Scott Knott* a nível de 5% de probabilidade.

Houve diferença significativa entre os isolados em estudo, sendo o isolado Xam 35 mais agressivo que Xam 4 (Tabela 3). As médias de AACPD para cada isolado também foram analisadas para melhor interpretação dos dados.

Tabela 3 - Médias da severidade dos isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*.

Tratamentos	Médias
Xam 4	25,26 a ¹
Xam 35	58,67 b

¹ Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna pelo teste de *Scott Knott* ao nível de 5% de probabilidade.

Para a avaliação das médias de severidade avaliadas para cada isolado, as cultivares BRS 418, BRS 419, BRS 17 - 020 -10, BRS Mari, BRS Dourada, BRS Poti branca, BRS Prata e BRS Vassourinha passaram a fazer parte do grupamento de cultivares resistentes à *Xpm* juntamente com as outras onze cultivares citadas anteriormente quando a média geral foi analisada. Esses materiais também não apresentaram diferença significativa quanto aos isolados (Tabela 4).

Para o isolado Xam 4, formou-se dois grupamentos de similaridade e as cultivares mais susceptíveis foram BRS 2012 34 - 15, BRS 417, BRS Taquari e os clone 54/10 e 1097/13 (Tabela 4). Para o isolado Xam 35, as cultivares foram separadas em três grupos de similaridade e as mais susceptíveis foram BRS 417 e BRS Taquari (Tabela 4). Porém, somente a BRS 2012 34 -15 e o clone 1097/13 não diferiram significativamente para ambos isolados (Tabela 4).

Tabela 4 - Reação de cultivares de mandioca aos dois isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*.

Cultivares	Isolados bacterianos	
	Xam 4	Xam 35
BRS 399	4,61 ¹ a ² A ³	121,01 bB
BRS 417	83,43 bA	183,85 cB
BRS 418	33,35 aA	34,36 aA
BRS 419	34,56 aA	48,73 aA
BRS 420	0,40 aA	27,80 aA
BRS 429	9,81 aA	50,85 aA
BRS 14-10-11	0,80 aA	22,10 aA
BRS 17 - 020 -10	21,88 aA	22,75 aA
BRS 17-012-19	4,41 aA	26,41 aA
BRS 2012 34 - 15	56,20 bA	30,43 aA
BRS Boitató	0,13 aA	0,00 aA
BRS Caipira	13,53 aA	16,78 aA
Clone 1097/13	79,65 bA	144,96 bA
Clone 54/10	75,18 bA	129,33 bB
BRS Dourada	22,6 aA	36,25 aA

BRS Formosa	0,80 aA	19,88 aA
BRS Gema de ovo	35,31 aA	89,35 bB
BRS Kiriris	11,30 aA	81,43 aB
BRS Mari	35,28 aA	59,70 aA
BRS Mulatinha	11,98 aA	87,06 bB
BRS Novo horizonte	2,01 aA	53,68 aB
BRS Ocauaçu	21,21 aA	14,66 aA
BRS Poti branca	29,33 aA	58,70 aA
BRS Prata	22,70 aA	55,60 aA
BRS Pretinha	1,06 aA	2,43 aA
BRS Progresso	10,26 aA	71,30 aB
BRS Rendeira	11,50 aA	59,61 aB
BRS Tapioqueira	10,83 aA	1,00 aA
BRS Taquari	112,30 bA	217,60 cB
BRS Vassourinha	21,75 aA	41,50 aA
BRS Verdinha	4,76 aA	9,63 aA

¹AACPD = área abaixo da curva do progresso da doença. ²Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna pelo teste de *Scott Knott* a nível de 5% de probabilidade. ³Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si na mesma linha pelo teste de *Scott Knott* a nível de 5% de probabilidade.

Foram observados comportamentos padronizados de reações às duas cepas de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* para a maioria das cultivares (Tabela 5). Porém, as cultivares BRS Kiriris e BRS Mulatinha foram consideradas resistentes para Xam 4, moderadamente resistentes para Xam 35 e para a AACPD total foram resistentes. Já a cultivar BRS Gema de ovo foi resistente somente para Xam 4 mas moderadamente resistente tanto para Xam 35 como para a AACPD total. A BRS 399 foi a única que apresentou reação diferenciada em cada, resistência para Xam 4, suscetibilidade para Xam 35 e moderada resistência para a AACPD total. Das 31 cultivares, 23 provaram resistência enquanto 4 foram suscetíveis e as outras 4 apresentaram respostas variáveis. As cultivares suscetíveis foram BRS 417 e BRS Taquari, juntamente com os Clones 1097/73 e 54/10.

As cultivares BRS Taquari e BRS Vassourinha não apresentaram os resultados padrões esperados. A cultivar padrão de resistência (BRS Taquari) apresentou reação de suscetibilidade enquanto a cultivar padrão de suscetibilidade (BRS Vassourinha) apresentou resposta de resistência. Na figura 5 é possível observar a agressividade dos dois isolados testados e como controle negativo, a planta testemunha ao meio das duas plantas inoculadas, pois na última avaliação, mais especificamente ao décimo sétimo dia a maioria das folhas avaliadas já tinham caído das plantas e atingido a nota máxima de avaliação.

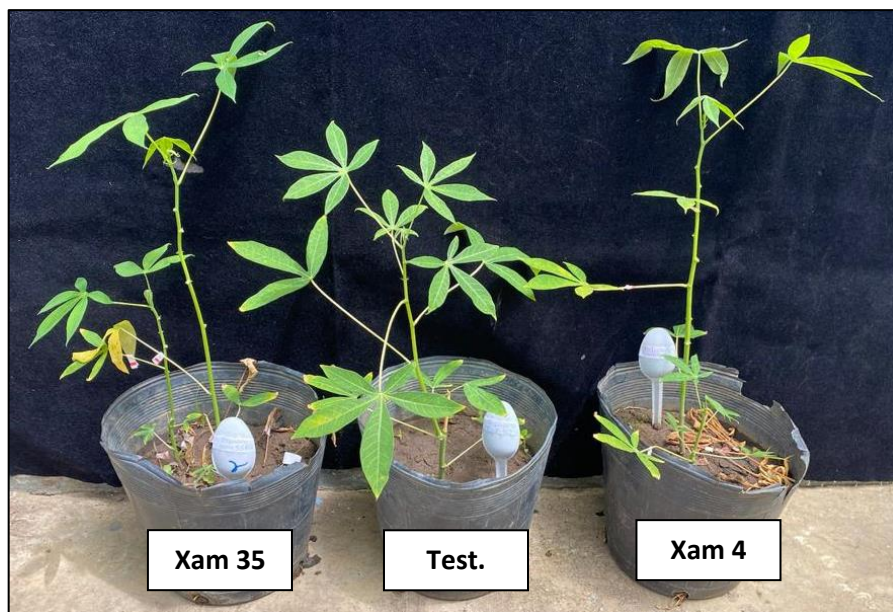
Tabela 5 - Reação de trinta e uma cultivares de mandioca inoculadas com dois isolados altamente virulentos de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*.

Cultivares	Xam 4	Xam 35	AACPD total
BRS BRS Boitató	0,13 R ³	0,00 R	0,13 R
BRS BRS Pretinha	1,06 R	2,43 R	3,49 R
BRS Tapioqueira	10,83 R	1,00 R	11,83 R
BRS Verdinha	4,76 R	9,63 R	14,39 R
BRS Formosa	0,80 R	19,88 R	20,68 R
BRS 14-10-11	0,80 R	22,10 R	22,90 R
BRS 420	0,40 R	27,80 R	28,20 R
BRS Caipira	13,53 R	16,78 R	30,31 R
BRS 17-012-19	4,41 R	26,41 R	30,82 R
BRS Ocauaçu	21,21 R	14,66 R	35,87 R
BRS 17 - 020 -10	21,88 R	22,75 R	44,63 R
BRS Novo horizonte	2,01 R	53,68 R	55,69 R
BRS Dourada	22,60 R	36,25 R	58,85 R
BRS 429	9,81 R	50,85 R	60,66 R
BRS Vassourinha	21,75 R	41,50 R	63,25 R
BRS 418	33,35 R	34,36 R	67,71 R
BRS Rendeira	11,50 R	59,61 R	71,11 R
BRS Prata	22,70 R	55,60 R	78,30 R
BRS Progresso	10,26 R	71,30 R	81,56 R
BRS 419	34,56 R	48,73 R	83,29 R
BRS 2012 34 - 15	56,20 R	30,43 R	86,63 R
BRS Poti branca	29,33 R	58,70 R	88,03 R
BRS Mari	35,28 R	59,70 R	92,73 R
BRS Kiriris	11,30 R	81,47 MR ²	94,98 R
BRS Mulatinha	11,98 R	87,06 MR	99,04 R
BRS Gema de ovo	35,31 R	89,35 MR	124,51 MR
BRS 399	4,61 R	121,01 S	125,62 MR
Clone 54/10	75,18 S ¹	129,33 S	204,51 S
Clone 1097/13	79,65 S	144,96 S	224,61 S
BRS 417	83,43 S	183,85 S	267,28 S
BRS Taquari	112,30 ⁵ S	217,60 ⁵ S	329,90 ⁴ S

¹S = suscetível (50-100%); ²MR = moderadamente resistente (33,3-49,9%); ³R = resistente (0-33,2%);

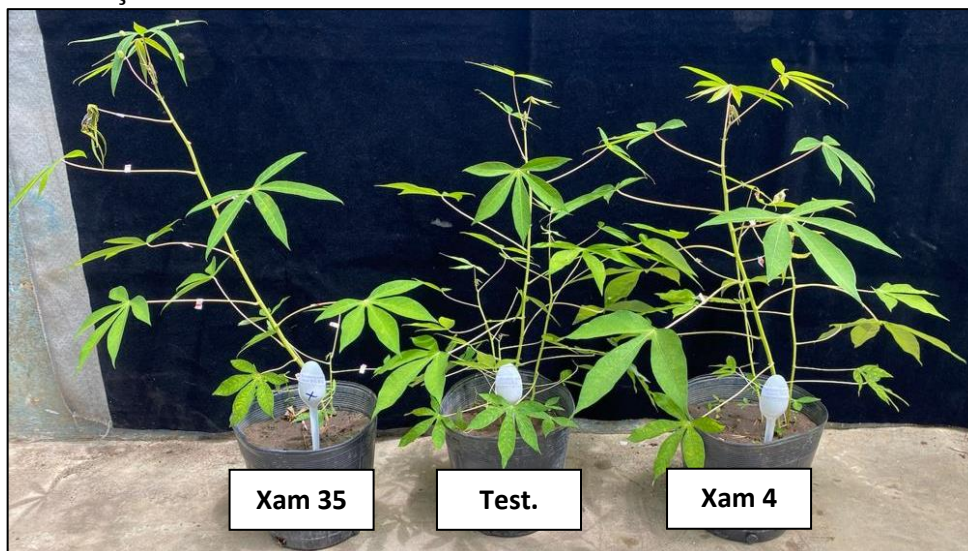
⁴Valor mais alto de AACPD usado como 100% para determinar o grupo de reação de acordo com o total; ⁵A média dos maiores valores de AACPD das 2 cepas foi utilizada como valor de 100% para determinar o grupo de reação para cada uma das cepas.

Figura 5 - Plantas da cultivar BRS Taquari inoculadas com os isolados com as duas bactérias (Xam 4 e Xam 35) e com água de torneira (testemunha) avaliadas no décimo sétimo dia após a inoculação.



A cultivar BRS Vassourinha, está entre as cultivares resistente à bacteriose da mandioca perante o estudo com os dois isolados testados. Na Figura 6 observa-se a aparência das plantas inoculadas comparadas com a planta testemunha, a qual está coerente com os dados de baixa severidade pela análise estatística, pois as plantas apresentaram poucos sintomas ao longo das avaliações e não foram capazes de atingir todo o tecido foliar causando a seca das folhas e consequentemente a morte e a queda das folhas.

Figura 6 - Plantas da cultivar BRS Vassourinha inoculadas com os isolados (Xam 4 e Xam 35) e com água de torneira (testemunha) avaliadas no décimo sétimo dia após a inoculação.



4 DISCUSSÃO

Condições climáticas com grandes flutuações de temperatura durante dia/noite tornam-se favoráveis para o aumento da severidade da bacteriose da mandioca (LOZANO, 1986). O Município de Belém, cidade onde foram realizados os experimentos em casa de vegetação, apresentaram valores médios de temperaturas mínima e máxima do ar de 23,2 °C e 34,2 °C, respectivamente no período da execução do ensaio (INMET, 2024). Esta condição, somada à alta umidade relativa do ar de 83,6%, certamente pode ter influenciado nos resultados obtidos.

Banito et al. (2008) observaram alta interação de genótipos de mandioca com o ambiente e às reações de tolerância de alguns genótipos. Ao avaliaram vinte e sete genótipos de mandioca em diferentes ambientes durante dois anos, os autores concluíram que poucos genótipos exibiram o mesmo padrão de resistência nos diferentes ambientes, enquanto a maioria dos genótipos avaliados reagiram à infecção de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* pela mudança de ambiente.

A influência do ambiente também é capaz de gerar variação da agressividade entre isolados de *Xpm*. Martin et al. (2017) ao estudarem a distribuição de isolados de *Xpm* na Costa do Marfim e a sensibilidade de reação de oito cultivares de mandioca ao patógeno, demonstraram que a severidade da doença foi muito baixa na estação seca, em contrapartida, o período chuvoso contribuiu para a expansão da doença.

Com base nos diferentes valores de severidade observados no presente trabalho, constatou-se a variabilidade patogênica dos isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* e que podem ser identificados em diferentes níveis de agressividade. Nessa perspectiva, outros trabalhos também apresentaram velocidades diferentes no aparecimento dos sintomas de bacteriose (NERY-SILVA et al., 2007; BANITO et al., 2010; OGUNJOBI et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2021; AQUILES et al., 2021).

Na seleção dos isolados para o teste de variabilidade das cultivares, optou-se por dois isolados de regiões diferentes, um pertencente ao município de Castanhal (Xam 4) e outro de Igarapé-Açu (Xam 35). Pois, assim como demonstrado por Aquiles et al. (2021) que a cepa UnB 1111 (Paranavaí-PR) foi mais agressiva que a cepa UnB 1386 (Planaltina-DF) com base no valor médio do grau de reação, mostrando a variação que existe entre os isolados bacterianos de diferentes regiões. Essa variabilidade existente pode ser compreendida pela variabilidade TALEs (efetores semelhantes a ativadores de transcrição) em populações de *Xpm*. As sequências TALEs permitem fazer algumas inferências evolutivas e funcionais sobre

a biologia TALE para o patossistema *Xpm* –mandioca (ZÁRATE-CHAVES, et al., 2021). Porém, ainda são poucos trabalhos com essa abordagem de estudo.

Com relação às reações das cultivares inoculadas com *Xpm* neste trabalho, utilizou-se a escala de notas atualmente descrita por Kublik et al. (2020) e os dados obtidos com significância estatística que corroboram com a eficiência da escala citada. A maioria dos trabalhos publicados recentemente ainda utilizam diferentes escalas baseadas em notas de sintomas visuais na parte aérea, porcentagens de desfolha e de infecção sistêmica do caule, pois a metodologia de inoculação utilizada é por inoculação do caule (NERY-SILVA, et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2021; AQUILES et al., 2021). Porém, para a seleção de cultivares resistentes, Banito et al. (2010) recomendam que a inoculação foliar é fundamental, adicionalmente aos testes em campo e em diferentes ambientes, para a seleção de materiais resistentes.

As cultivares BRS Boitató, BRS Pretinha, BRS Tapioqueira, BRS Verdinha, BRS 14-10-11, BRS 420, BRS Caipira, BRS 17-012-19, BRS Ocauçu, BRS 17 - 020 -10, BRS Novo horizonte, BRS Dourada, BRS 429, BRS Rendeira, BRS 418, BRS 419, BRS 2012 34 – 15, BRS Prata, BRS Progresso, BRS Poti branca, BRS Mari, BRS Vassourinha e BRS Formosa foram classificadas como resistentes no presente trabalho.

No trabalho realizado no estado da Bahia por Teixeira et al. (2021), as cultivares BRS Formosa e BRS Poti branca foram consideradas como moderadamente resistentes, porém, nessa classificação essas cultivares foram consideradas resistentes. A cultivar BRS Formosa também foi considerada resistente em campo à *Xpm* (VIEIRA et al. 2013). Segundo Teixeira et al. (2021) o plantio desta cultivar minimizou os problemas causados pela doença.

Além desses materiais, outros também apresentaram resultados de reações diferenciadas quando testados na Bahia, cultivares classificadas como suscetíveis por Teixeira et al. (2021) foram consideradas resistentes e moderadamente resistentes no presente trabalho, como as cultivares BRS Mulatinha e BRS Kiriris enquanto a BRS Tapioqueira, BRS Novo horizonte, BRS 398, BRS Caipira mostraram resistência neste trabalho. Os resultados diferenciados podem ser dados pelas cepas selecionadas para a inoculação, procedentes de regiões diferentes, pois os patógenos mais agressivos resultam em maiores médias e logo irão influenciar na classificação da reação.

A cultivar BRS 399 apresentou moderada resistência aos dois isolados de *Xpm* do Pará, como também para três cepas testadas no Distrito Federal, apresentando potencial para cultivo em regiões onde as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento da

bacteriose (AQUILES et al., 2021). Porém, os resultados para os padrões BRS Taquari e BRS Vassourinha foram opostos comparados aos testes realizados por Aquiles et al. (2021). Por conta desses aspectos, Ramos e Takatsu (1987) recomendam que a introdução de cultivares de outras regiões seja feita com avaliação prévia de seu comportamento nas condições da região de introdução das mesmas.

A cultivar local, BRS Mari, é registrada como moderadamente resistente à podridão-mole das raízes da mandioca (ALBUQUERQUE, 2008). Apresentou resistência à bacteriose nesse estudo, demonstrando ser promissora em regiões produtoras do Estado do Pará onde a doença está disseminada.

As diferenças na reação das cultivares à inoculação de *Xam* podem ser devidas às variações genotípicas das cultivares em decorrência de diferenças na secreção de compostos fenólicos, lignificação, deposição calosa, suberização e oclusão de vasos (tilose), compostos antimicrobianos nas atividades vasculares e fisiológicas (LOZANO; LABCRRY, 1982; BANITO et al., 2010). Zinsou et al., (2006) também sugeriram que a cera superficial da folha de mandioca e o número de estômatos foliares adaxiais pode desempenhar um papel na defesa contra a bacteriose como barreira estrutural, mas não é são considerados decisivos para a resistência.

E mais recentemente, Ramirez et al. (2020) tentaram elucidar os mecanismos moleculares ativados na mandioca em resposta a *Xpm*, onde estudaram perfis de expressão de mRNA em larga escala usando uma abordagem RNAseq para identificar respostas de uma cultivar de mandioca resistente para um determinado isolado e suscetível para outro. As diferenças entre as duas interações podem ser explicadas quantitativamente, a resposta resistente obteve menor quantidade de genes expressos comparando com a resposta suscetível (RAMIREZ, et al., 2020).

5 CONCLUSÕES

- Todos os materiais avaliados apresentaram sintomas típicos da bacteriose, porém com variação de severidade da doença entre as variedades testadas e com variação de agressividade entre os isolados inoculados;
- Dos trinta e um materiais testados, vinte e três foram classificados como resistentes.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A. S. Cultivar de mandioca BRS Mari. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado técnico, 205), 3 p. 2008b.
- ALBUQUERQUE, A. S. Cultivar de mandioca BRS Poti. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado técnico, 204), 3 p. 2008a.
- AQUILES, K. R. et al. Reaction of Sweet Cassava Genotypes to *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* From Three Regions of Brazil. 2021.
- ASSIGBETSÉ, K. et al. Genetic variation of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, originating from different regions in Africa. 1996.
- BANITO, A. et al. Expression of resistance and tolerance of cassava genotypes to bacterial blight determined by genotype x environment interactions/Resistenz und Toleranz von Maniok gegenüber Bakterienbrand in Sorte-Umwelt-Interaktionen. **Journal of Plant Diseases and Protection**, p. 152-161, 2008.
- BANITO, A. et al. Screening of cassava genotypes for resistance to bacterial blight using strain× genotype interactions. **Journal of Plant Pathology**, p. 181-186, 2010.
- DIXON, A. G. O. et al Genotype× environment effects on severity of cassava bacterial blight disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 8, p. 763-770, 2002.
- ELANGO, F. N.; LOZANO, J. C. Epiphytic survival of *Xanthomonas manihotis* on common weeds in Colombia. **Series 03E (CIAT)**, 1981.
- EMBRAPA. Principais variedades de mandioca recomendadas para o Norte, Nordeste e Centro-sul do Brasil. **Disponível em:** < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/173763/1/folder-Variedades-Mandioca-Ainfo.pdf>>. **Acesso em:** 21 de setembro de 2018.
- FUKUDA, W. M. G. et al. **Cultivares de mandioca recomendadas para o Brasil -2002**. Embrapa, 2002.
- Instituto Nacional de Meteorologia. **Disponível em:** < [https:// portal.inmet.gov.br](https://portal.inmet.gov.br)>. **Acesso em:** 22 de janeiro de 2024.
- JUNIOR, M. et al. Cultura da mandioca: Aspectos socioeconômicos, melhoramento genético, sistemas de cultivo, manejo de pragas e doenças e agroindústria. 2016.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.
- KPÉMOUA, K. et al. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 1131-1143, 1996.

- KUBLIK, G. et al. Desenvolvimento e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da bacteriose em mandioca. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 18, n. 2, p. 75-81, 2020.
- LOZANO, J. C. et al. Cassava bacterial blight: a manageable disease. **Plant Dis**, v. 70, n. 12, p. 1989-1993, 1986.
- LOZANO, J.C.; LABCRRY, R. Screening for resistance to cassava bacterial blight. **Plant disease**, v. 66, n. 4, p. 316-318, 1982.
- MANSFIELD, J. et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 13, n. 6, p. 614-629, 2012.
- MARTIN, A. A. et al. Geographical distribution and incidence of cassava bacterial blight (*Manihot esculenta* Crantz) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in two agro-ecological zones of Cote d'Ivoire. **Plant Pathology Journal** (Faisalabad), v. 16, n. 1, p. 1-11, 2017.
- MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v. 124, p. 163-180, 2002.
- NERY-SILVA, F. A. et al. Reação de germoplasma de mandioca a *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 3-10, 2007.
- OGUNJOBI, A. A. et al. Assessment of large population of cassava accessions for resistant to cassava bacterial blight infection in the screen house environment. **Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development**, v. 2, n. 6, p. 87, 2010.
- OGUNJOBI, A. A. Molecular variation in population structure of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in the south eastern Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 20, 2006.
- RAMIREZ, Edilene et al. Resistance and susceptibility to *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* in cassava: A transcriptomic comparison (or two sides of the same coin). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 112, p. 101535, 2020.
- RAMOS, J. G. A.; TAKATSU, A. Avaliação da resistência de cultivares de mandioca a bacteriose, em Goiás. **Boletim de Pesquisa-Empresa Goiana de Pesquisa Agropecuária (Brazil). no. 08.**, 1987.
- SANDINO, Tamara et al. Caracterización de la respuesta morfológica de variedades susceptibles y resistentes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) a la bacteriosis vascular causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Summa Phytopathologica**, v. 41, p. 94-100, 2015.
- SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 1051- 1056, 1977.
- TAKATSU, A. et al. Epidemiological aspects of bacterial blight of cassava in Brazil. In: **Diseases of Tropical Food Crops. Proceedings of an International Symposium. Louvain-la-Neuve, Belgium: Université Catholique de Louvain, 141a50**. 1978.

TEIXEIRA, J. H. S. et al. Evaluation of resistance to bacterial blight in Brazilian cassava germoplasm and disease-yield relationships. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, p. 324-335, 2021.

VIEIRA, E. A. et al. Caracterização fenotípica e molecular de acessos de mandioca de indústria com potencial de adaptação às condições do Cerrado do Brasil Central. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 2, p. 567-581, 2013.

WYDRA, K. et al. Variability of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (XCM), incitant of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) bacterial blight, from different geographic origins in pathological, physiological, biochemical and serological characteristics. In: Plant Pathogenic Bacteria. **Proceedings of the 9th International Conference, University of Madras**. p. 317-323. 1998.

ZÁRATE-CHAVES, C. A. et al. Cassava diseases caused by *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* and *Xanthomonas cassavae*. **Molecular plant pathology**, v. 22, n. 12, p. 1520-1537, 2021.

ZINSOU, V. et al. "Leaf waxes of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in relation to ecozone and resistance to *Xanthomonas* blight," **Euphytica**, 149(1-2): 189-198, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese apresentou os resultados obtidos utilizando técnicas moleculares e teste de patogenicidade para o conhecimento de diferentes populações de *Xpm* existentes no Estado do Pará e selecionar materiais de mandioca visando à resistência a bacteriose.

Os resultados alcançados neste estudo são importantes para a comunidade científica que objetiva propor estratégias de controle a bacteriose da mandioca, haja vista a inexistência de tratamento curativo para a doença somado a poucos estudos relacionados tanto a diversidade genética do patógeno, quanto à seleção de resistência a *Xpm* no Brasil e mais especificamente no Estado do Pará.

No presente trabalho, foi possível comprovar a existência de uma grande diversidade genética de isolados de *Xpm*, possivelmente a disseminação desses patógenos às diversas regiões produtoras de mandioca do Estado do Pará é resultante da troca de material de propagação vegetativa entre produtores. Dessa forma, a relação de severidade da doença não obteve correlação com a variabilidade genética ou as origens geográficas. No teste de seleção, 23 cultivares foram selecionadas classificadas como resistentes para o Estado do Pará, incluindo a cultivar BRS Mari a qual já é indicada para a região como produtiva e resistente a prodridão da raiz. Portanto, os dados originados deste trabalho abrem precedentes para pesquisas futuras quanto a diversos âmbitos relacionados ao controle da doença bacteriana da mandioca.