

**TIAGO DE PAULA LELIS**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV.  
*MANIHOTIS* NAS REGIÕES NORDESTE E CENTRO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2014**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da  
Biblioteca Central da UFV

T

L541v  
2014 Lelis, Tiago de Paula, 1987-  
Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*  
nas regiões nordeste e centro sul do Brasil / Tiago de Paula Lelis. - Viçosa,  
MG, 2014.  
vii, 34f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Luis Claudio Vieira da Cunha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.27-32.

1. Mandioca - Doenças e pragas. 2. Mandioca - Cultivo.  
3. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em  
Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.68

**TIAGO DE PAULA LELIS**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV.  
*MANIHOTIS* NAS REGIÕES NORDESTE E CENTRO SUL DO BRASIL**

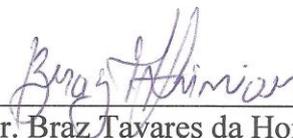
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2014.



---

Prof. José Rogério de Oliveira



---

Dr. Braz Tavares da Hora Júnior



---

Prof. Luis Cláudio Vieira da Cunha  
(Orientador)

Se a educação sozinha não pode mudar a sociedade,  
sem ela tampouco a sociedade muda.

(Paulo Freire).

À minha família,  
meu pai José Euzébio,  
minha Mãe Lucia e meu padrasto Marcelo,  
meu Irmão Diogo, minha cunhada Mariana e meu sobrinho Diego,  
todos os amigos.

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser a força por traz de todos meus passos e a luz em frente aos meus olhos.

Aos meus pais José Euzébio e Lúcia, irmão Diogo, minha cunhada Mariana e meu sobrinho Diego, fonte de toda inspiração, incentivo, amor e carinho incondicional.

A toda minha família, que sempre me proporciona momentos maravilhosos, além de todo suporte emocional e das palavras de incentivo.

Aos meus inesquecíveis amigos da graduação e mestrado, Lívio, Leo, Ivan, Gelton, Marco Aurélio, Rafael, Alberto, Victor, Isabel, Bruninha, Luciana, Andressa, Cris, que mesmo longe, estão sempre de alguma forma do meu lado.

Ao meu amigo João Paulo, pela ajuda no laboratório nos finais de semana, pela paciência e bons momentos de convivência.

Ao professor Luis Cláudio, por estes dois anos de convivência, ensinamento e incentivo. Na qual levo o aprendizado nesta nova trajetória que se inicia.

Aos meus amigos do laboratório de bacteriologia, Lilian, Yane, Pollyanne, Suelen, Patrícia, Cecília, que tem me proporcionado momentos incríveis nestes dois anos. Especialmente a Suelen e Patrícia que contribuíram com seus esforços para que este trabalho fosse concluído.

Aos meus amigos do laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro (Bio-Café), em especial a Karla pela grande ajuda, Denia e Dani.

A Dr. Eveline pela co-orientação no trabalho, ao BioCafé e Prof. Laércio Zambolim pelo oportunidade de realizar parte do trabalho.

A professora Claudine e os estudantes do laboratório de virologia pela possibilidade de utilizar os equipamentos do laboratório.

Ao Braz pelo auxílio nas análises de diversidade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia – UFV, pela estrutura física, ambiente acadêmico de excelência e professores na qual foram fonte de inspiração e pelos conhecimentos transmitidos.

A todos que contribuíram de certa forma nestes dois anos de mestrado.

## **BIOGRAFIA**

Tiago de Paula Lelis, filho de José Euzebio Lelis e Lúcia H. Batista de Paula, nasceu em Viçosa, Minas Gerais em 29 de maio de 1987.

Em março de 2005 ingressou no curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, graduando se em julho de 2011. Em fevereiro de 2010 a junho de 2011 participou do programa de intercambio MAST- University of Minnessota nos Estados Unidos.

Em março de 2012 ingressou no programa de Pós-Graduação pela Universidade Federal de Viçosa no departamento de Fitopatologia em nível de mestrado, com ênfase em Bacteriologia molecular, submetendo-se a defesa da dissertação em 28 de fevereiro de 2014.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. O cultivo da Mandioca e sua Importância.....	1
1.2. A Queima Bacteriana e Seu Agente causal.....	4
1.3. Diversidade genética de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> .....	5
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	9
2.1. Obtenção e Preservação dos Isolados .....	9
2.2. Extração do DNA Bacteriano.....	10
2.3. Teste de Patogenicidade.....	10
2.4. Marcadores de AFLP .....	10
2.5. Análise dos Dados.....	12
3. RESULTADOS.....	14
4. DISCUSSÃO .....	23
5. CONCLUSÃO .....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
7. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	33

## RESUMO

LELIS, Tiago de Paula, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* nas regiões Nordeste e Centro Sul do Brasil.** Orientador: Luis Cláudio Vieira da Cunha.

A mandioca é uma cultura de extrema importância em regiões tropicais, sendo utilizada na alimentação de cerca de 500 milhões de pessoas. Além do uso direto na alimentação humana, a participação da mandioca na indústria alimentícia tem tido considerável aumento nos últimos anos. A crescente incidência de pragas e doenças tem se tornado uma importante causa da redução de produtividade da cultura no Brasil, e demais regiões produtoras. Dentre as doenças presentes na cultura, a bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) se destaca como uma séria ameaça à produção em condições favoráveis. O uso de variedades resistentes tem se destacado como o método mais viável de controle da doença. Para a seleção de genótipos resistentes a doenças e o desenvolvimento de programas de melhoramento, um dos pré-requisitos é o conhecimento da variabilidade fenotípica e genotípica de isolados dentro da população do patógeno, associada a diferentes regiões geográficas e sistemas de cultivo. Apesar da importância desta doença para a sustentabilidade da cultura da mandioca, pouco se sabe sobre a variabilidade fenotípica e genotípica de *Xam* presente nas principais regiões produtoras do Brasil. Para ganhar conhecimento sobre este problema, testamos a hipótese de que os isolados brasileiros apresentam uma alta variabilidade genotípica, através do uso do marcador molecular AFLP. Alto nível de polimorfismo foi encontrado entre os isolados de *Xam* a partir da amplificação seletiva com os primers EcoRI-A/MseI-G e EcorI-T/MseI-A. Baseado nas análises aplicadas não foi encontrado diferenciação genética entre as populações da BA e MS-PR; no entanto baseado na análise de *minimum spanning network* observou a estruturação de dois grupos de genótipos multilocus distantes. Alta diversidade genética foi obtida quando estes grupos foram comparados. A diversidade genética encontrada entre os isolados de *Xam* não correlacionam com a origem geográfica e patogenicidade.

## ABSTRACT

LELIS, Tiago de Paula, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2014.

**Genetic variability of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in the Northeast and Mid-South regions of Brazil.** Advisor: Luis Cláudio Vieira da Cunha.

Cassava is an important crop in many tropical regions and it has been used to feed about 500 million people worldwide. However, the increasing incidence of pests and diseases has become a major cause of reduced crop production in all cassava producing countries. Among the main diseases, the bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) stands out as one of the most important and limiting factors. The use of resistant varieties, which depends greatly on the knowledge of the pathogen's phenotypic and genetic diversity, is the most feasible method of controlling this disease. Despite the importance of this disease to the sustainability of cassava, little is known about the phenotypic and genetic diversity of *Xam* present in the main cassava producing regions of Brazil. To gain knowledge into this issue, we tested the hypothesis that the Brazilian isolates show a high genetic diversity. In order to do this, we carried out AFLP marker analyses of 85 *Xam* isolates collected from different regions in Brazil (BA, MS, PR). Based on AFLP results, 53 polymorphic bands were found among isolates of *Xam*. Multilocus analyses showed a total of 26 MLGs (genotypes) among the isolates. Further diversity analyses showed that Brazilian isolates present a high level of diversity ( $H_{exp} = 0,567$ ). Surprisingly, this diversity neither correlates with the geographic origin nor with the pathogenicity/virulence characteristic of the isolates. Based on the analysis of the minimum spanning network, two major MLGs groups were observed, indicating the presence of two diverse populations. In conclusion, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Brazilian isolates are highly diverse and that this diversity does not relate to their geographic origin.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O cultivo da Mandioca e sua Importância

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta arbustiva, eudicotiledônea, heliófila, perene (mas cultivada como anual), pertencente à família Euphorbiaceae e gênero *Manihot* (VIANA *et al.*, 2002). Algumas espécies de plantas desta família destacam-se por sua empregabilidade agrônômica, como o *Jatropha curcas* (pinhão manso), *Ricinus communis* L. (mamoneira), *Hevea brasiliensis* (seringueira); no entanto, *Manihot esculenta* é a única espécie da família cultivada com a finalidade alimentar. Graças a suas raízes comestíveis ela é extensamente cultivada em regiões tropicais de todo mundo.

Desde sua domesticação de 5000-7000 anos atrás, a mandioca tem espalhado por regiões tropicais. Esta é a terceira mais importante fonte de calorias nos trópicos, logo após o arroz e milho (FAO, 2007). Além disso, é considerada pela FAO como a quarta cultura mais importante na produção de alimentos e tem um destaque especial por ser uma importante fonte de alimento para famílias de baixa renda, devido à baixa exigência de tecnologias durante seu processo produtivo e colheita. A importância da mandioca para as populações nas regiões subtropicais foi demonstrada no ano de 1990 em Uganda, através da epidemia causada pela virose mosaico da mandioca, devastando plantios e levando a fome a população dependente da cultura.

Do ponto de vista técnico, a cultura da mandioca apresenta algumas vantagens, como possibilidade de obtenção de altas produtividades, tolerância à seca e a solos degradados ou ácidos, grande flexibilidade no plantio e na colheita e fácil adaptação a ambientes onde o plantio de outras culturas é impraticável (EMBRAPA, 2007).

Originária da América do Sul, alguns estudos indicam que a planta ancestral da mandioca é natural de vegetação na zona de transição entre a floresta Amazônica e o Cerrado, próxima às fronteiras entre Peru e Brasil (CARVALHO, 2005). As condições mais propícias para seu cultivo são em climas tropicais e subtropicais, com amplitude térmica de 20°C a 27°C e a temperatura média ideal em torno de 25°C. Regiões alagadas e congelamento dos solos são fatores limitantes ao cultivo da mandioca que se desenvolve de maneira mais produtiva sob exposição direta ao sol. O cultivo apresenta maior adaptabilidade a solos arenosos à textura média, pois estes possibilitam melhor

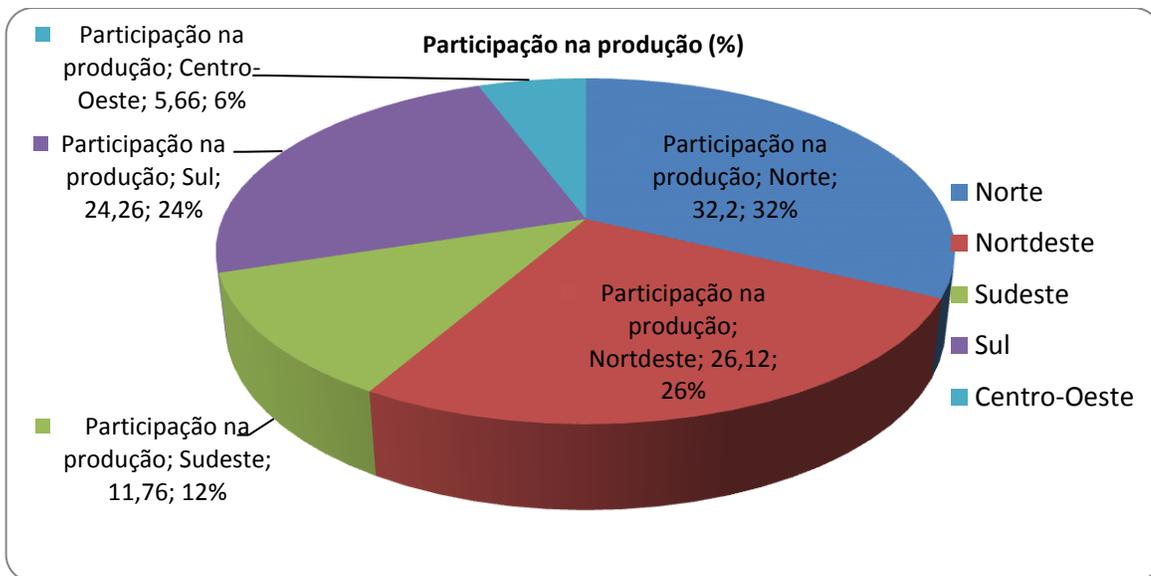
desenvolvimento das raízes, por serem mais profundos e friáveis além de boa drenagem, reduzindo problemas de apodrecimento do produto (EMBRAPA, 2007).

A produção mundial de mandioca em 2010 foi da ordem de 229,5 milhões de toneladas e atualmente permanece em ritmo contínuo (GROXKO, 2011). Os cinco principais países produtores são por ordem de importância: Nigéria, Brasil, Indonésia, Tailândia e República Democrática do Congo (EMBRAPA, 2011), sendo que a maior parte da produção mundial concentra-se no continente africano. Ocupando o segundo lugar em produção, o Brasil é responsável por aproximadamente 10% do total produzido no mundo, seguindo a tendência de diversos países da América Latina e do sudeste asiático na industrialização da cadeia produtiva. Atualmente, a produção brasileira gira em torno de 24,5 mil toneladas da raiz, o equivalente a 65% da produção da Nigéria.

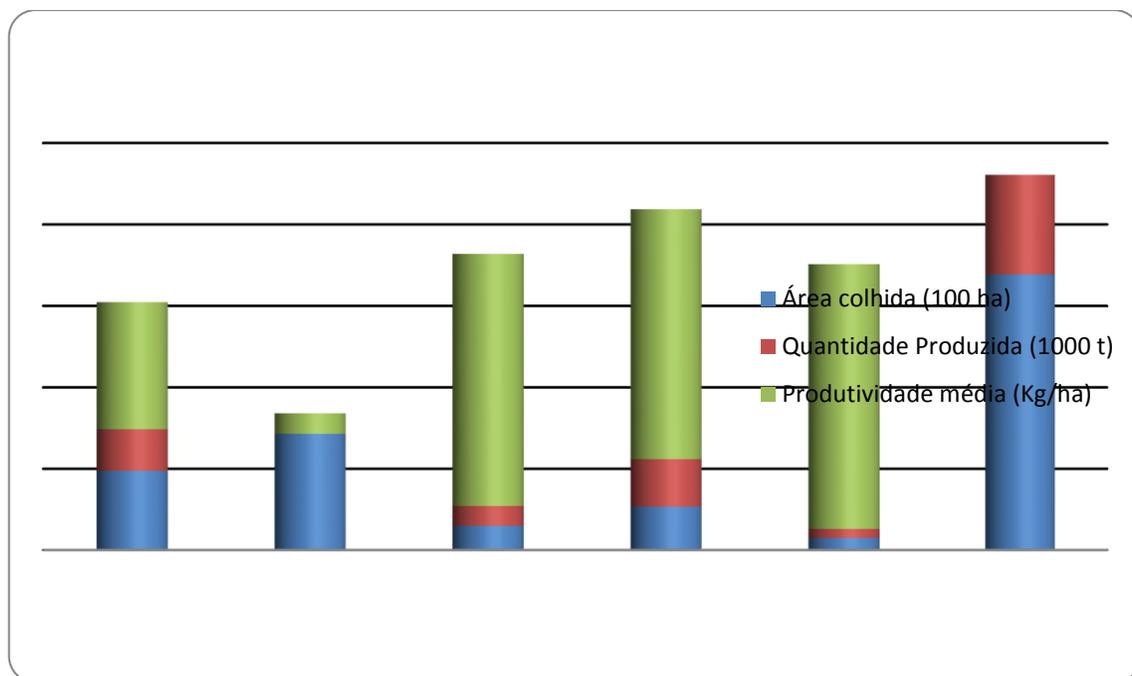
A cultura da mandioca destaca-se entre as demais por ser produzida em todas as regiões do país. Poucas culturas de importância econômica apresentam alta distribuição geográfica como a mandioca. Além disso, a cultura se destaca pela alta produtividade, quando comparada com outras culturas de importância econômica. Estima-se que a produtividade da mandioca no Brasil seja 13,61 t/ha (Figura 1), muito superior a culturas como soja, arroz e milho (GAMEIRO, 2002).

Dentre os estados brasileiros, se destaca como o maior produtor de mandioca o Pará, seguido por Bahia, Paraná e Maranhão (EMBRAPA, 2011) (Figura 2).

A cultura apresenta um alto potencial para a realização de melhoramento genético ou para incremento de produção com práticas agrícolas, já que atualmente o rendimento médio da mandioca é de apenas 20% do que pode ser obtido em condições ótimas.



**Figura 1:** Participação por estado na produção de mandioca nacional em 2012. **Adaptado:** EMBRAPA - Produção Agrícola Municipal, 2013.



**Figura 2:** Produção brasileira de mandioca em 2012; **Adaptado:** EMBRAPA - Produção Agrícola Municipal, 2013.

## 1.2 A Murcha Bacteriana e seu agente causal

A bacteriose causada por *Xam* é a doença de maior importância econômica no cultivo da mandioca. Dependendo das condições empregadas, o patógeno pode reduzir substancialmente a produção e até inviabilizar novos cultivos devido à disseminação por manivas infectadas (LOZANO e BOOTH, 1982; MASSOLA e BEDENDO, 2005).

*Xam* é uma bactéria Gram negativa, em forma de bastonete, não produtora de pigmentos ao contrário da maioria das espécies do gênero das *Xanthomonas* (SCHAAD *et al.*, 2005). A bacteriose foi descrita no Brasil em 1943 e desde então, tem sido relatada nas principais regiões produtoras da cultura.

As lesões visualizadas em folhas e ramos são resposta à infecção pelo patógeno, que penetra pelos estômatos ou por feridas presentes nas folhas (JORGE *et al.*, 2000), colonizando o tecido foliar e os feixes vasculares. Os sintomas da bacteriose caracterizam-se por manchas angulares, de aparência aquosa nos folíolos, murcha das folhas e pecíolos, morte descendente (die back) e exsudação de goma nas hastes, além de necrose dos feixes vasculares, devido à infecção sistêmica (MARAITE, 1993). A disseminação do patógeno ocorre principalmente pela dispersão de células bacterianas produzidas nas plantas infectadas através da chuva (JORGE *et al.*, 2000), também pelo uso de material propagativo infectado e através do manuseio com ferramentas infestadas durante a colheita (LOZANO, 1986).

Os prejuízos causados pela bacteriose variam com as condições climáticas, suscetibilidade ou tolerância das variedades, práticas culturais empregadas, épocas de plantio e nível de contaminação do material de plantio, bem como agressividade dos isolados presentes na área, 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 e LOZANO, 1981; VERDIER *et al.*, 1993). A variação brusca de temperatura entre o dia e a noite é o fator mais importante para a manifestação severa da doença, sendo que a amplitude diária de temperatura superior a 10°C durante um período maior que cinco dias são as condições ideais para o pleno desenvolvimento da doença (EMBRAPA, 2007).

A incidência desta bacteriose vem aumentando ao longo dos anos principalmente em países da América do sul e África (VERDIER *et al.*, 2004). No Brasil esta doença vem

ocasionando grandes perdas em lavouras, principalmente no eixo Centro-Sul (englobando os estados de Mato Grosso, São Paulo e Paraná), Distrito Federal, e Região Nordeste.

As perdas de produção estão em torno de 30% em cultivos usando variedades suscetíveis e, em locais com condições favoráveis para a doença, os prejuízos podem ser totais (EMBRAPA, 2007). Por outro lado, usando variedades tolerantes, mesmo com a ocorrência de condições favoráveis as perdas de produção chegam ao máximo a 30%. A utilização de manivas sadias, adequação das épocas de plantio e principalmente a utilização de variedades resistentes (FUKUDA, 2006) são as principais formas de se manejar a doença.

A resistência genética mediada pelas proteínas R é a estratégia de resistência mais efetiva e com menor impacto ao meio ambiente, no entanto a suplantação desta resistência tem ocorrido devido à alta variabilidade dos patógenos no campo e ou pouco conhecimento sobre o patossistema. O recente sequenciamento do genoma de *Xam* possibilita um rápido ganho de informações sobre o patossistema *Xam*-mandioca, permitindo elucidar componentes de virulência da população responsável pela bacteriose e tornando os estudos de genômica populacional mais prático (STASKAWICZ, 2012).

Programas de melhoramento visando resistência a esta bacteriose requerem informações da diversidade do patógeno e sua distribuição geográfica (RESTREPO, 2000). Resistência ao patógeno pode ser encontrada em uma ampla gama de acessos de mandioca, e não é limitada a alguns isolados do patógeno (SÁNCHEZ *et al.*, 1999). No entanto, existe grande deficiência em estudos de genes que governam resistência do hospedeiro ao patógeno. Por esta razão, as fontes de resistência até então conhecidas são usualmente consideradas como quantitativas. A resistência quantitativa pode ser estudada empregando os testes de inoculação da bacteriose em diferentes cultivares de mandioca para estudo da interação patógeno hospedeiro a evolução dos sintomas nestes. Até o momento, apenas uma única cultivar (BRS Formosa), indicada para as condições da Bahia, tem sido utilizada devido a tolerância a bacteriose e às condições semiáridas. Portanto, para a sustentabilidade do sistema de produção da mandioca, faz-se necessário o conhecimento detalhado desta e de outras fontes de resistência para que estratégias de manejo eficientes possam ser adotadas em todas as regiões produtoras.

### 1.3 Diversidade genética de *X. axonopodis* pv. *manihotis*

A importância das fitobacterioses pode ser mensurada pela sua agressividade em cultivares de interesse agrônomico, somada a dificuldade de manejo e sua capacidade de disseminação. Isto se deve a grande capacidade de se adaptar a diferentes ambientes permitindo sua sobrevivência e disseminação, além da capacidade de desenvolver resistência a defensivos (ROMEIRO, 2005).

A bacteriose da mandioca pode ocorrer em diferentes intensidades nos campos de produção dependendo do grau de susceptibilidade das variedades utilizadas e também pela variabilidade dos isolados presentes (VERDIER *et al.*, 1993), principalmente no Brasil por ser o centro de origem da mandioca e do patógeno. Baseado na diferença de evolução de sintomas de *Xam* na cultura da mandioca, acredita-se na diferença de agressividade entre isolados testados (VERDIER e BOHER 1994, RESTREPO e VERDIER, 2000). Além disso, estudos realizados em diferentes sistemas ecológicos na Colômbia demonstraram diferenciação geográfica dos isolados estudados (RESTREPO e VERDIER, 1997). Segundo Restrepo e Verdier (1997), a caracterização molecular de isolados de *Xam* em grandes regiões produtoras revelou maior variabilidade deste patógeno na América do sul do que África e Ásia.

A importância dos estudos de diversidade genética em uma população se deve a necessidade de classificar estes microrganismos podendo assim, organizá-los em grupos taxonômicos, realizar estudos de distribuição geográfica e a dinâmica populacional na área, estudar a estrutura da população, gerando assim, informações importantes para o manejo do patógeno (MUNHOZ, 2011).

Para o estudo de diversidade genética dois fatores devem ser levados em consideração, riqueza e equitabilidade. A riqueza corresponde ao número de genótipos contidos na população, quanto maior a riqueza, maior será a diversidade genética. Equitabilidade corresponde à distribuição dos genótipos na população, considerando poucos genótipos predominantes numa população a equitabilidade será baixa, levando a uma baixa diversidade (GRUNWALD *et al.*, 2003).

A caracterização da variabilidade fenotípica de isolados de *Xam*, bem como de outros patógenos consiste na determinação do grau de virulência em hospedeiros chamados de diferenciadores devido à presença de fatores de resistência ou susceptibilidade. No

entanto, análises fenotípicas nem sempre refletem completa estrutura genética de uma população devido à dependência dos genótipos do hospedeiro utilizado (RESTREPO, 1997).

Recentemente, o uso de técnicas moleculares como os marcadores, tem assumido papel importante e de destaque na caracterização da variabilidade dos patógenos e tem sido utilizados para *Xam* em alguns países (VERDIER *et al.*, 1993; e VERDIER, 1997; RESTREPO *et al.*, 1999). Dentre as técnicas mais utilizadas, destacam-se: *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP; RESTREPO e VERDIER, 2000; RESTREPO *et al.*, 2004), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP; RESTREPO *et al.*, 1999; OGUNJOBI *et al.*, 2010), *Random Lyamplified Polymorphic DNA* (RAPD; OGUNJOBI *et al.*, 2006; 2010). Além disso, observam-se no genoma bacteriano regiões que se repetem naturalmente no DNA, servindo como sítios para *primers* na amplificação destas, (VERSALOVIC *et al.*, 1991). Existem diferentes famílias desses elementos de repetição no genoma de bactérias: a sequência *Palindrômica Repetitiva Extragênica* (REP) de 35 a 40 pares de bases; a sequência *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC), de 124 a 127 pares de bases; e o elemento BOX de 154 pares de bases (VERSALOVIC *et al.*, 1994). As bandas amplificadas no rep-PCR são separadas de acordo com seu tamanho em gel de agarose e permitindo o fingerprinting de cada estirpe bacteriana (LUPSKI, 1993).

A técnica do AFLP desenvolvida por Vos *et al.* (1995) na Holanda, combina a aplicabilidade em mapeamento genético de plantas e animais, estudos filogenéticos, caracterização da variabilidade em microrganismos, além do alto poder de discriminação e reprodutibilidade (JANSSEN, 1996), permitindo maior confiabilidade dos resultados. Além disso, é uma técnica que apresenta boa cobertura do genoma, e não necessita de informação prévia das sequências a serem analisadas (VUYLSTEKE, 2007).

Estudos recentes baseados na aplicação destas técnicas têm mostrado que *Xam* apresenta um alto potencial de variabilidade genética provavelmente como resultado da seleção por hospedeiros com características genéticas diferentes (RESTREPO *et al.*, 1999; 2004; MAHUKU *et al.*, 2006). Na África as populações de *Xam* apresentam alta variação genética, mostrando a importância do desenvolvimento de cultivares resistentes voltada a população presente em uma determinada região (OGUNJOBI *et al.*, 2006). Estudos de diversidade genética com isolados da Nigéria, baseado em testes de RAPD e AFLP,

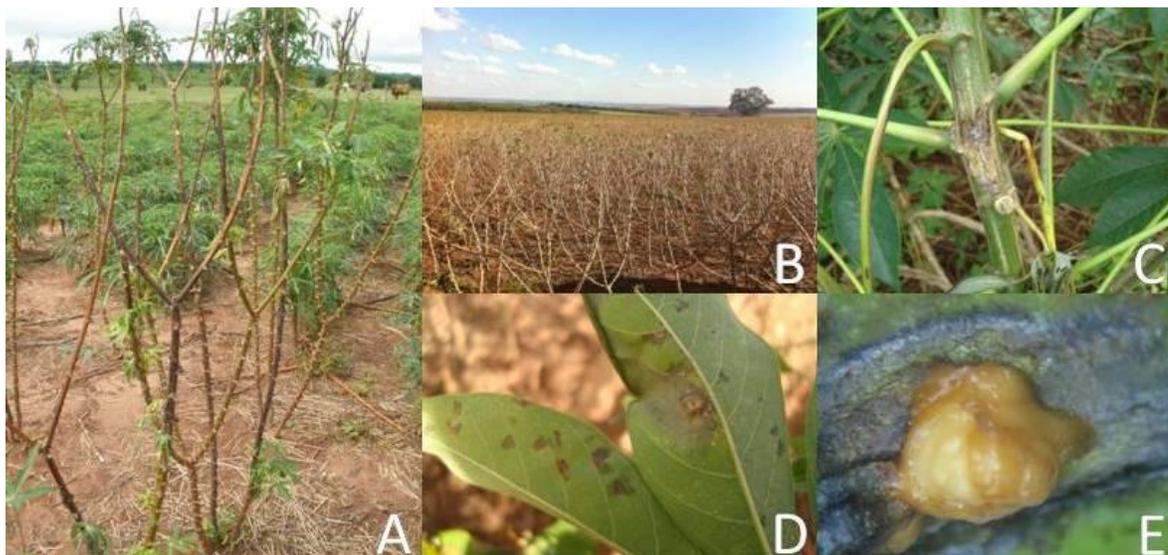
mostraram haver uma alta diversidade genética do patógeno. O Brasil carece de estudos baseados na análise da diversidade fenotípica e genotípica do patógeno. O único relato da diversidade presente entre os isolados brasileiros de *Xam* foi realizado no ano de 1999 por um grupo da Colômbia (RESTREPO *et al.*, 1999). Estes estudos sugeriram a existência de uma alta diversidade da população brasileira de *Xam*. Portanto, nesta dissertação teve como proposta estudar a diversidade genética de isolados de *Xam* originários dos estados brasileiros da BA, MS e PR.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção e Preservação dos Isolados

Oitenta e cinco isolados provenientes de isolamento em folhas e hastes sintomáticas (Figura 3), coletados nas principais regiões produtoras da cultura no Nordeste e Centro-Sul do Brasil, em colaboração com a EMBRAPA CNPMF em Cruz das Almas, BA (Figura 4), Tabela S1 [MATERIAL SUPLEMENTAR]). O isolamento foi realizado pelo método de isolamento a partir das bordas da lesão, proposto por (ROMEIRO, 2001). Colônias típicas de *Xam* foram transferidas para placas com meio 523 (KADO e HESKETT, 1970).

Após o isolamento, as culturas puras foram preservadas em meio 523 líquido Kado e Heskett (1970) contendo glicerol a 30% e armazenado em ultra freezer a -80°C (Romero, 2001), além da preservação em água pelo método Castellani (FIGUEIREDO, 1967).



**Figura 3:** Sintomas induzidos pela murcha da mandioca: **A:** Seca da ponteira; **B:** Desfolha; **C:** Necrose e Murcha do pecíolo; **D:** Enxarcamento e Necrose; **E:** Goma.

## **2.2 Extração do DNA Genômico Bacteriano**

O DNA genômico foi extraído a partir de culturas puras dos isolados crescidos em meio de cultura 523 a 28°C por um período de 24hs, utilizando o *Kit Wizard Genomic DNA* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA foi mensurada utilizando NanoDrop 2000 ThermoScientific, e a qualidade deste foi acessada em gel de agarose a 1%, corado com gel red (BioAmérica). Para visualização das bandas utilizado-se o Transluminador Loccus Biotecnologia. Posteriormente, o DNA genômico foi diluído em água mili-Q autoclavada, para uma concentração final de 50 ng/μl e armazenado a -20 °C até seu uso.

## **2.3 Testes de Patogenicidade**

Todos os 85 isolados de *Xam* foram inoculados na cultivar susceptível de mandioca Lazã para verificar a agressividade destes. Os ramos foram inoculados como descrito por Verdier e Jorge 2002 com algumas modificações. As plantas foram avaliadas 10 dias após a inoculação e a severidade foi avaliada com base nas seguintes notas: 0 = sem sintomas; 1 = zonas translúcidas ou necrose no ponto de inoculação; 2 = necrose além do ponto de inoculação; 3 = necrose e presença de exsudação de goma; 4 = murcha das folhas; 5 = morte apical ou de toda a planta. Os isolados com nota 0 foram considerados como não agressivos, aqueles com média das notas entre 1 e 2 moderadamente agressivos e os com média das notas maior que 2, foram classificados como altamente agressivos.

## **2.4 Marcadores de AFLP**

A diversidade genética dos isolados foi acessada utilizando a técnica de amplified fragmentlength polymorphism (AFLP). A técnica de AFLP foi empregada de acordo com protocolo descrito por Brito *et al.* (2010) com algumas modificações. A técnica consistiu das seguintes etapas: digestão do DNA genômico, ligação dos adaptadores aos fragmentos gerados, amplificação pré-seletiva e seletiva por PCR e separação dos fragmentos em gel de poliacrilamida.

Quatrocentos nanogramas de DNA bacteriano foi digerido com uma combinação de enzimas de restrição EcoRI e Tru9I por 6hs a 37°C e os fragmentos obtidos foram ligados

aos seus respectivos adaptadores, utilizando a enzima T4 DNA ligase overnight a 4 °C. O produto da ligação foi diluído 10 vezes em TE pH 8 e armazenado a -20 °C. 2,5 µl da reação de ligação foi utilizado para a pré-amplificação seletiva, utilizando os oligonucleotídeos complementares aos adaptadores e aos sítios das enzimas de restrição, sem a adição de bases seletivas, por 23 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C por 60s e 72 °C por 60s . O pré-amplificado foi diluído 40 vezes em TE pH 8, e uma alíquota de 5 µl utilizada em uma segunda reação de PCR. Amplificações seletivas foram realizadas com duas combinações de *primers*, EcoRI-A/MseI-G e EcoRI-T/MseI-A (Tabela 1), nas seguintes condições, 13 ciclos a 94 °C por 30s, 65 °C por 30s e 72 °C por 60s, seguindo por 32 ciclos a 94°C por 30s, 56°C por 30 e a 72°C por 60 segundos, e um ciclo de extensão final a 72°C por 20 minutos.

Após a segunda amplificação foi adicionado ao produto deste, 8 µl de formamida (formamida 98%, EDTA 20 pH 8 10 mM, xylene cyanol 1mg/ml e bromophenol blue 1 mg/ml). O resultado da amplificação seletiva foi aplicado em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% e corado com prata. A eletroforese foi conduzida durante 3 hs a 45 °C para as duas combinações de *primers*.

8 combinações de *primers* (EcoRI-A/MseI-T, EcoRI-A/MseI-G, EcoRI-A/MseI-C, EcoRI-T/MseI-A, EcoRI-T/MseI-T, EcoRI-G/MseI-T, EcoRI-G/MseI-A, EcoRI-C/MseI-G) foram previamente testadas e as combinações mais eficientes selecionadas para estudos posteriores.

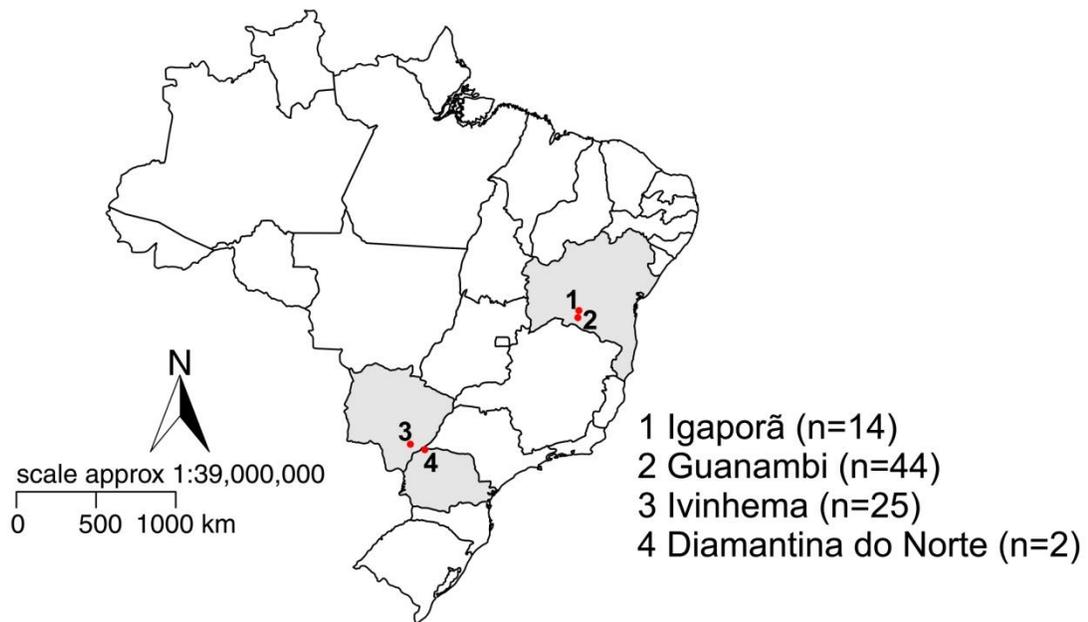
**Tabela 1** – *Primers* e sequência dos mesmos, utilizados no AFLP.

<b>TÉCNICA/ADAPATAÇÕES</b>	<b>PRIMERS</b>	<b>SEQUÊNCIA</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
<b>AFLP</b>	EcoRI + 0	GACTGCGTACCAATTC + 0	
<b>AFLP</b>	EcoRI + T	GACTGCGTACCAATTC + T	
<b>AFLP</b>	EcoRI + A	GACTGCGTACCAATTC + A	
<b>AFLP</b>	EcoRI + C	GACTGCGTACCAATTC + C	
<b>AFLP</b>	EcoRI + G	GACTGCGTACCAATTC + G	Restrepo <i>et al.</i> , 1999
<b>AFLP</b>	MseI + 0	GATGAGTCCTGAGTAA + 0	
<b>AFLP</b>	MseI + T	GATGAGTCCTGAGTAA + T	
<b>AFLP</b>	MseI + A	GATGAGTCCTGAGTAA + A	
<b>AFLP</b>	MseI + C	GATGAGTCCTGAGTAA + C	
<b>AFLP</b>	MseI + G	GATGAGTCCTGAGTAA + G	
<b>AFLP LINKERS</b>	EcoRI linker 1	TCGTAGACTGCGTACC	
<b>AFLP LINKERS</b>	EcoRI linker 2	AATTGGTACGCAAGTCTAC	
<b>AFLP LINKERS</b>	MseI linker 1	GACGATGAGTCCTGAG	
<b>AFLP LINKERS</b>	MseI linker 2	TACTCAGGACTCAT	

## 2.5 Análise dos Dados

As bandas polimórficas geradas em gel de poliácridamida a partir de duas combinações de *primers* foram codificadas em caracteres binários, e as notas 0 e 1 atribuídas à ausência e presença de bandas polimórficas respectivamente. Somente bandas polimórficas de boa intensidade foram consideradas nas análises. As medidas de riqueza e equitabilidade foram calculadas para estimar a diversidade genética das populações. Os índices de diversidade foram calculados baseado no tamanho das populações, e a curva de rarefação

(GRÜNWARD *et al.*, 2003) foi utilizada para estimar o número de genótipos esperados, considerando o menor número de genótipos multilocus (MLGs) das populações analisadas. O índice G (STODDARDT e TAYLOR, 1998) e  $N_1$  de Hill (HILL, 1973), foram calculados para medir a diversidade genotípica e o intervalo de confiança de 95% foi construído a partir 1000 bootstrapping. Os pacotes vegan e vegetarian do programa R versão 2.14.0 (R Development Core Team 2011) foram utilizados para calcular os índices de diversidade e rarefação. O  $G''_{ST}$  índice padrão de fixação entre os grupos e o  $F_{st}$  foram estimados seguindo Meirmans e Hedrick (2011) usando o programa Genodive versão 2.0 (Meirmans e van Tienderen, 2004). Os índices de diversidade para MLGs, a matriz de contagem de MLGs por população e *minimum spanning network* (rede de MGLs) foram calculados utilizando o pacote poppr 1.0.5 do programa R versão 2.14.0 (R Development Core Team 2011), função *mlg.table* para as duas primeiras e *greycurve* para a rede de MLGs.



**Figura 4:** Mapa representativo dos locais de coleta das amostras. Os estados coletados estão sombreados e as regiões coletadas estão identificadas pelos pontos. n: número de isolados coletados em cada região.

### 3. RESULTADOS

Anterior à execução dos testes de variabilidade genética, os 85 isolados estudados neste trabalho foram avaliados quanto a patogenicidade/virulência em plantas susceptíveis de mandioca cultivar Lazã. De acordo com a intensidade dos sintomas, os isolados foram classificados em 3 categorias: não agressivos (S), moderadamente agressivos (M) e altamente agressivos (A). Dentre os 85 isolados analisados, 49 isolados foram agrupados na categoria (S), 24 na categoria (M) e 12 na categoria (A).

O estudo da diversidade genética dos isolados foi realizado através da técnica de AFLP. Para seleção de combinações de primers seletiva, oito combinações (Tabela 1) foram testadas na amplificação de seis isolados de *Xam* selecionados com base na expressão diferencial de sintomas no teste de patogenicidade. Dentre estas, as combinações EcoRI-A/MseI-G e EcoRI-T/MseI-A, geraram o maior número de bandas polimórficas e foram selecionadas para as análises. As demais combinações geraram um alto número de bandas monomórficas dificultando assim a resolução dos géis ou apresentaram baixo polimorfismo, portanto, foram desconsiderados para análise. O número de fragmentos polimórficos para as combinações de primers EcoRI-A/MseI-G e EcoRI-T/MseI-A selecionadas foram de 35 e 18 fragmentos, respectivamente (Figura 5). A confiabilidade dos resultados foi garantida pela reprodutibilidade das amplificações (mesmo padrão de bandas) em testes com duplicadas utilizando os dez primeiros isolados listados na Tabela S1 (material suplementar). A identificação de MLGs nos 85 isolados estudados, baseado nos 53 loci polimórficos identificados no teste de AFLP, identificou 26 MLGs, dentre os quais o MLG2 foi representado por 39 e 17 isolados nas populações da BA e MS-PR, respectivamente (Figura 6). Também, MLG2 foi o único genótipo encontrado nas duas populações. MLGs 14 e 15 foram encontrados somente na população da BA e representados por 4 e 2 isolados, respectivamente (Tabela 2). Os demais MLGs (3-13 e 16-26) ou foram encontrados na BA ou MS-PR representados por apenas um isolado.

A heterozigose ( $H_{exp}$ ) esperada corrigida para a menor população ( $n = 27$ ) foi de 0,547 para a população da BA e de 0,613 para a população do MS-PR. Estes valores, considerados altos, indicam a presença de alta diversidade dentro das duas populações.

Para o estudo da diversidade considerando as regiões de origem dos isolados, considerou-se duas populações, uma corresponde aos isolados coletados no estado da Bahia (população BA; Nordeste) e outra referente aos isolados coletados no estado do Mato Grosso do sul e Paraná (população MS-PR; Centro-Sul). A diversidade entre as duas populações foi medida pelos índices G de Stoddart e Taylor e o índice  $N_1$  de Hill (HILL, 1973). Ambos os índices G e  $N_1$  apresentaram valores similares para as duas populações analisadas, ou seja, de 2,16; 2,43 e 4,38; 4,53 para as populações da BA e MS-PR, respectivamente.

A distribuição dos isolados dentro dos respectivos MLGs é mostrada na Figura 6A matriz de contagem na população permitiu verificar a abundância dos MLGs em cada área e dos isolados presentes nestes (Figura 6). A riqueza estimada pela curva de rarefação em relação à amostra de menor tamanho e MLGs foi de 8,69 para os indivíduos da BA e 11 para os indivíduos do MS-PR, não apresentando diferença significativa entre as duas populações (Tabela 3 e Figura 7). Os valores da equitabilidade (E.5) foram baixos tanto para BA (0,344) quanto para MS-PR (0,407), indicando que alguns MLGs predominam nas áreas analisadas. Com relação ao índice padrão de fixação, o baixo valor de  $G''_{ST}$  -0,013 ( $p = 0,749$ ) entre os grupos, indica ausência de diferença genética quando comparados as populações da BA e MS-PR.

A *minimum spanning network* (rede de MGLs) foi obtido a partir da matrix de dissimilaridade entre os isolados (Figura 8). De acordo com a rede de MLGs, percebe-se a formação de dois grupos principais com 11 e 16 MLGs, constituídos por 12 e 74 isolados de *Xam*, respectivamente. Em ambos os grupos, foram encontrados isolados representantes das duas regiões amostradas. O primeiro grupo, compreendendo a maior parte dos isolados, são mais próximos e emergem do MLG2. No entanto, um segundo grupo mais distante pode ser observado (Figura 8). Para avaliar a existência de diferença genética entre esta subdivisão da rede, uma nova análise de comparação entre os MLGs foi realizada. Para isto, procedeu-se a correção da população clonal considerado um único isolado para cada MLG (População A e B; Tabela 4). Os novos valores de  $G''_{st}$  0,35 ( $p = 0,002$ ) e de matriz de distância genética  $F_{st}$  0,27 ( $p = 0,001$ ) sugere a existe de diferença genética entre estes grupos.

**Tabela 2:** População, Genótipos e Isolados correspondentes aos Genótipos encontrados.

<b>População</b>	<b>Genótipos</b>	<b>Isolados</b>
<b>BA</b>	1	1
<b>BA, MS- PR</b>	2	2,4,5,7,10,12,13,14,15,16,18,20,24,25, 26,28,29,30,31,32,33,35,36,37,38, 39,40,44,45,47,48,49,50,51,52,53,54, 56,64,66,67,68,69,70,71,74,75,77,78, 81,82,86,88,91,93,98
<b>BA</b>	3	3
<b>BA</b>	4	6
<b>BA</b>	5	8
<b>BA</b>	6	9
<b>BA</b>	7	11
<b>BA</b>	8	17
<b>BA</b>	9	19
<b>BA</b>	10	21
<b>BA</b>	11	22
<b>BA</b>	12	23
<b>BA</b>	13	34
<b>BA</b>	14	41, 42, 43, 46
<b>BA</b>	15	58, 60
<b>BA</b>	16	61
<b>MS-PR</b>	17	65
<b>MS-PR</b>	18	76
<b>MS-PR</b>	19	79
<b>MS-PR</b>	20	80
<b>MS-PR</b>	21	85
<b>MS-PR</b>	22	87
<b>MS-PR</b>	23	89
<b>MS-PR</b>	24	90
<b>MS-PR</b>	25	92
<b>MS-PR</b>	26	101

**Tabela 3** – Índices de Diversidade, Riqueza e Equitabilidade para MLGs.

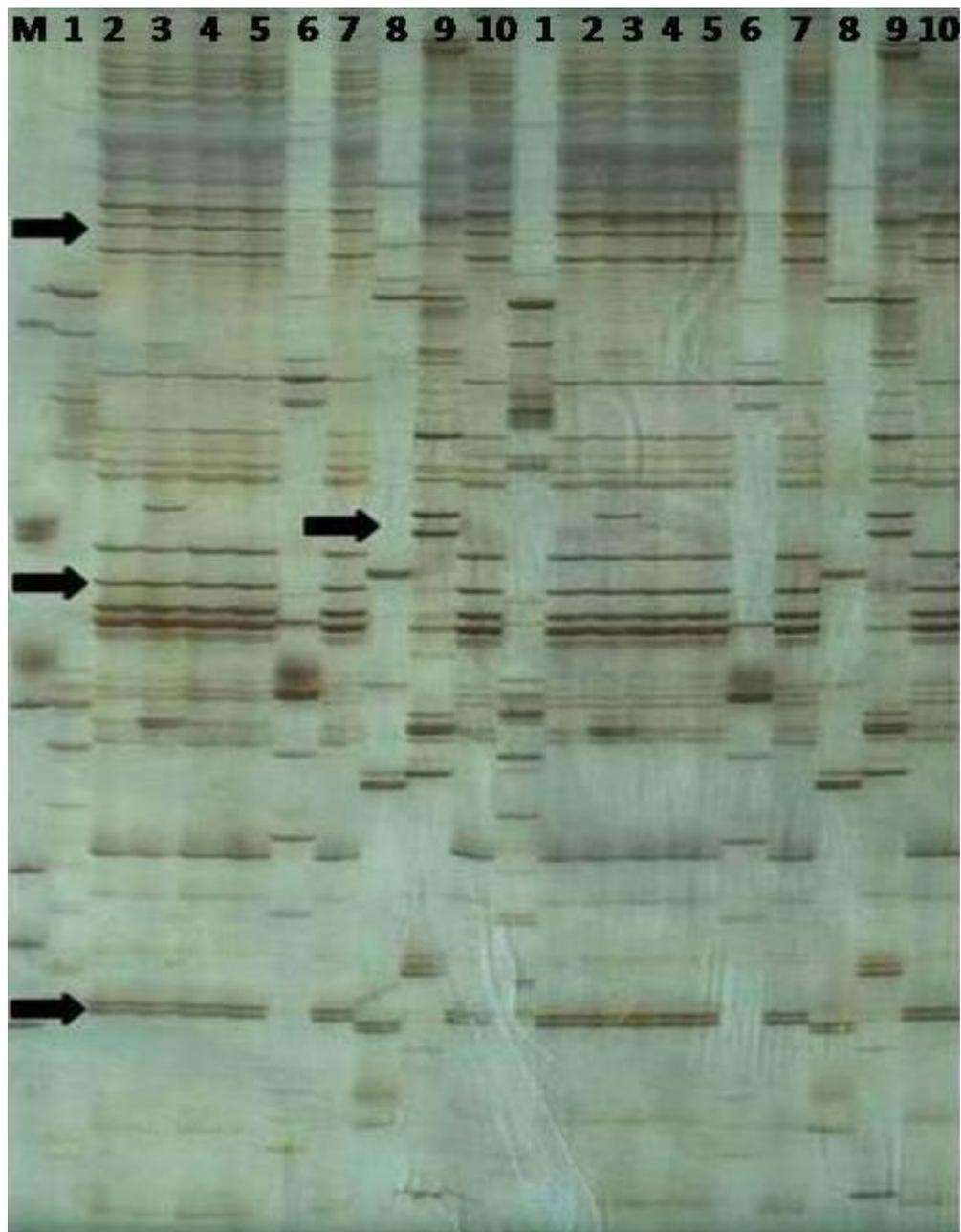
<b>População</b>	<b>N</b>	<b>MLG</b>	<b>eMLG</b>	<b>H</b>	<b>G</b>	<b>N1</b>	<b>E.5</b>	<b>Hexp</b>
<b>BA</b>	58	16	8.696 (5,52-11,86) <sup>a</sup>	1.478 (1,06 -1,88)	2.165 (1,42-2,90)	4,38 (2,73-5,96)	0.344	0.547
<b>MS-PR</b>	27	11	11	1.512 (1,00-2,01)	2.438 (1,16-3,70)	4,53 (2,55-6,51)	0.407	0.613
<b>Total</b>	85	26	9.633	1.709	2.273	-	-	0,567

**N:** tamanho das amostras; **MLG:** número de genótipos multilocus; **eMLG:** número de genótipos multilocus esperados corrido pela curva de rarefação para a menor amostra; **SE:** Erro padrão; **H:** Índice de diversidade de MLG (Shannon-Wiener); **G:** Índice de diversidade de MLG (Stoddart e Taylor); **N<sub>1</sub>:** Índice de Hill; **E.5:** Índice de equitabilidade; **Hexp:** Heterozigose esperada corrigida para o menor valor de N (Nei's); ; <sup>a</sup> valores entre parênteses correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

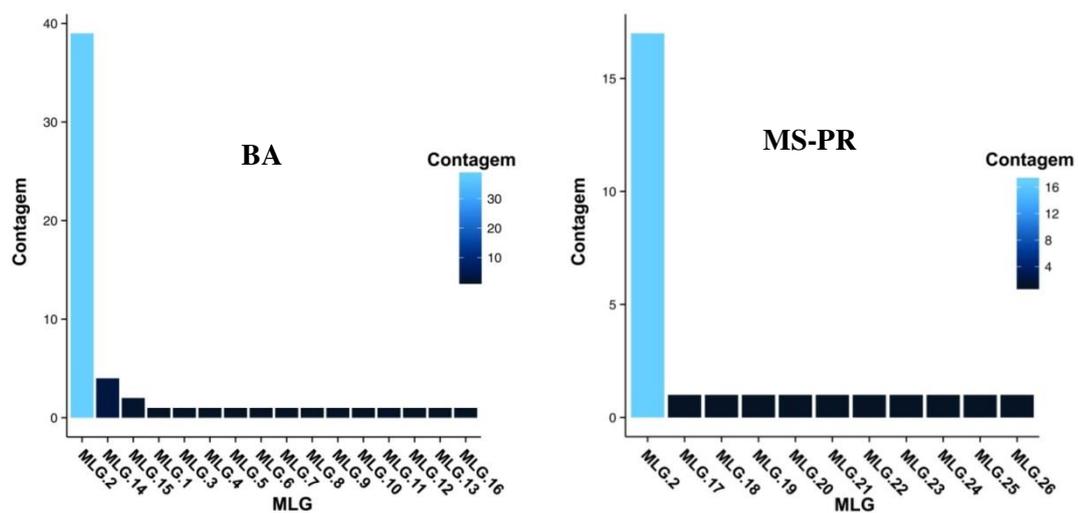
**Tabela 4:** População, Genótipos e Isolados correspondentes aos Genótipos encontrados.

População	Haplótipos	Isolados e Sintomas
Pop A	2	2 <sup>S</sup> ,4 <sup>S</sup> ,5 <sup>S</sup> ,7 <sup>S</sup> ,10 <sup>S</sup> ,12 <sup>M</sup> ,13 <sup>S</sup> ,14 <sup>S</sup> ,15 <sup>S</sup> ,16 <sup>M</sup> ,18 <sup>S</sup> ,20 <sup>M</sup> ,24 <sup>M</sup> ,25 <sup>S</sup> , 26 <sup>M</sup> ,28 <sup>M</sup> ,29 <sup>A</sup> ,30 <sup>S</sup> ,31 <sup>M</sup> ,32 <sup>M</sup> ,33 <sup>M</sup> ,35 <sup>S</sup> ,36 <sup>M</sup> ,37 <sup>M</sup> ,38 <sup>S</sup> , 39 <sup>S</sup> ,40 <sup>S</sup> ,44 <sup>S</sup> ,45 <sup>M</sup> ,47 <sup>A</sup> ,48 <sup>S</sup> ,49 <sup>A</sup> ,50 <sup>A</sup> ,51 <sup>S</sup> ,52 <sup>A</sup> ,53 <sup>A</sup> ,54 <sup>S</sup> , 56 <sup>A</sup> ,64 <sup>A</sup> ,66 <sup>S</sup> ,67 <sup>M</sup> ,68 <sup>S</sup> ,69 <sup>S</sup> ,70 <sup>M</sup> ,71 <sup>S</sup> ,74 <sup>S</sup> ,75 <sup>S</sup> ,77 <sup>S</sup> ,78 <sup>S</sup> , 81 <sup>S</sup> ,82 <sup>S</sup> ,86 <sup>S</sup> ,88 <sup>S</sup> ,91 <sup>S</sup> ,93 <sup>A</sup> ,98 <sup>S</sup>
Pop A	3	3 <sup>A</sup>
Pop A	6	9 <sup>M</sup>
Pop A	7	11 <sup>M</sup>
Pop A	12	23 <sup>A</sup>
Pop A	13	34 <sup>A</sup>
Pop A	14	41 <sup>M</sup> , 42 <sup>M</sup> , 43 <sup>S</sup> , 46 <sup>S</sup>
Pop A	16	61 <sup>M</sup>
Pop A	18	76 <sup>S</sup>
Pop A	21	85 <sup>M</sup>
Pop A	22	87 <sup>S</sup>
Pop A	23	89 <sup>M</sup>
Pop A	24	90 <sup>S</sup>
Pop A	25	92 <sup>S</sup>
Pop A	26	101 <sup>S</sup>
Pop B	1	1 <sup>S</sup>
Pop B	4	6 <sup>S</sup>
Pop B	5	8 <sup>S</sup>
Pop B	8	17 <sup>S</sup>
Pop B	9	19 <sup>S</sup>
Pop B	10	21 <sup>S</sup>
Pop B	11	22 <sup>S</sup>
Pop B	15	58 <sup>M</sup> , 60 <sup>M</sup>
Pop B	17	65 <sup>M</sup>
Pop B	19	79 <sup>S</sup>
	20	80 <sup>S</sup>

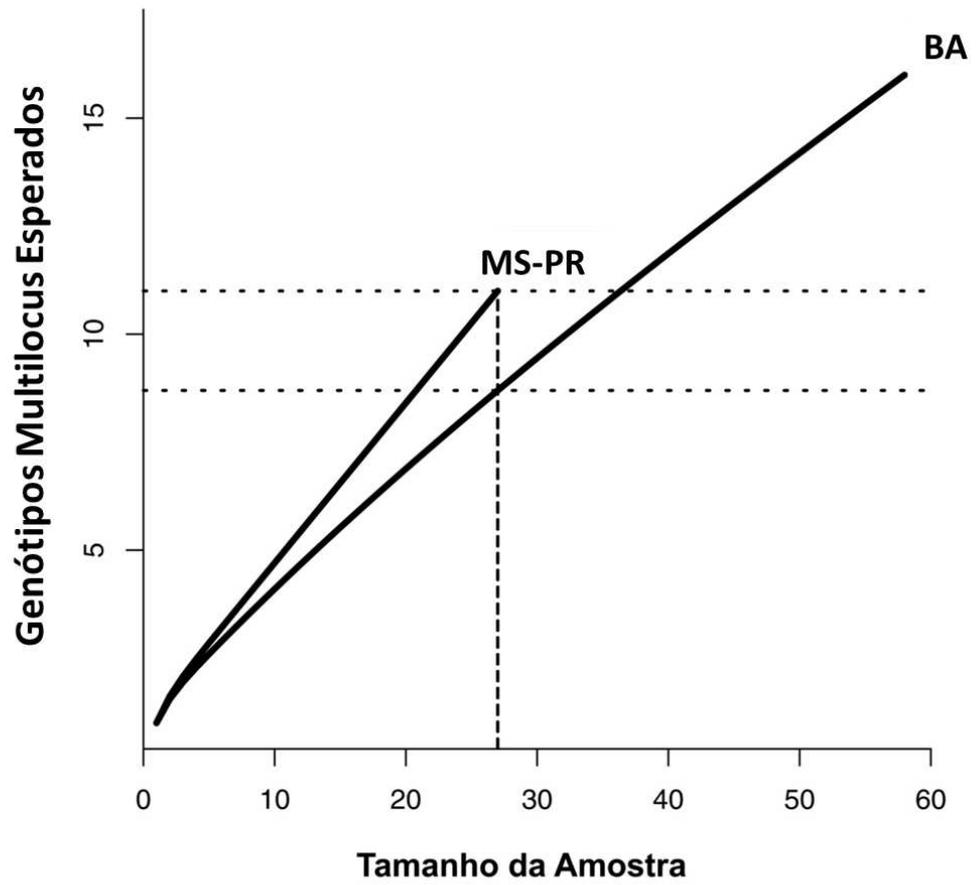
**Legenda:** As letras sobrescritas aos isolados correspondem aos sintomas induzidos por este em plantas de mandioca. **S:** sem sintomas; **M:** sintomas moderados; **A:** sintomas agressivos.



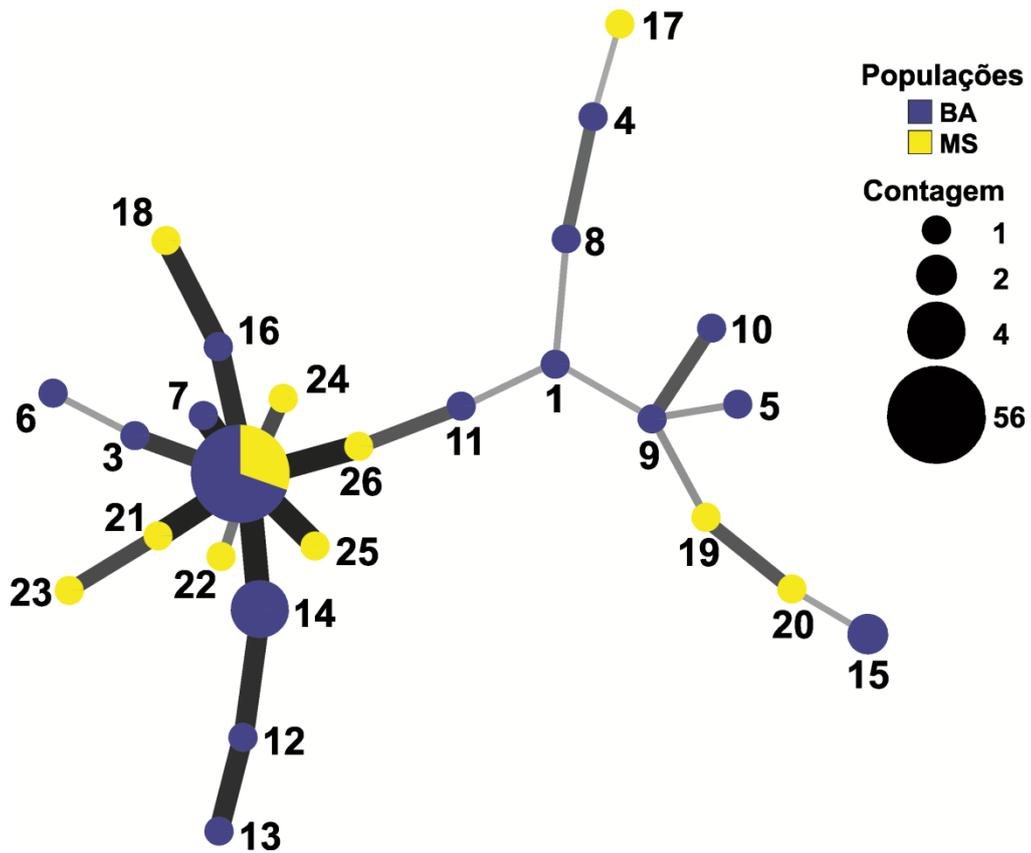
**Figura 5:** Gel de poliacrilamida representativo do padrão de polimorfismo encontrado no AFLP. Para a análise de AFLP a combinação de *primer* EcoRI-T/MseI-A foi utilizada. **M:** marcador de peso molecular 100bp; Os números de 1 a 10 correspondem aos isolados de *Xam* (Tabela SI [MATERIAL SUPLEMENTAR]) e suas respectivas repetições; Bandas polimórficas são indicadas por setas.



**Figura 6:** Gráfico representativo do número de isolados presentes em cada genótipos multilocus (MLGs), dentro da população da BA e MS-PR.



**Figura 7:** Curva de rarefação mostrando o número de genótipos multilocus (MLGs) esperados considerando a população de menor tamanho.



**Figura 8:** Rede de genótipos para os 26 MLGs encontrados. A cor azul representa a população da BA e a cor amarela a população do MS-PR. As distâncias entre os isolados é medida pela cor e espessura dos ramos (quanto mais escuro espesso, menor a distância entre os diferentes MLGs. O tamanho e cor dos nós representam número de indivíduos dentro de cada MLG e região de origem respectivamente.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi estudado a diversidade de 85 isolados brasileiros de *Xam*, coletados nas principais regiões produtoras, utilizando a técnica de AFLP. O último relato da diversidade de isolados de *Xam*, oriundos do Brasil, foi no ano de 1999 por um grupo de pesquisadores do CIAT na Colômbia (RESTREPO *et al.*, 1999a). Pesquisadores de outros países da América do Sul e África tem empenhado maiores esforços no estudo da variabilidade genética deste patógeno (OGUNJOBI *et al.*, 2006; RESTREPO *et al.*, 1997), no entanto estes resultados não se aplicam as condições brasileiras. O conhecimento da diversidade genética de isolados presente nas principais áreas produtoras de mandioca do país é fator crucial para o manejo e sustentabilidade da cadeia produtiva da mandioca.

A técnica de AFLP (VOS *et al.*, 1995), empregada como marcador de diversidade para este estudo, combina a aplicabilidade em mapeamento genético de plantas e animais, estudos filogenéticos, caracterização da variabilidade em microrganismo, além do alto poder de discriminação e reprodutibilidade (JANSSEN, 1996). Esta técnica mostrou-se eficiente para detecção da variabilidade genética de isolados de *Xam* (Restrepo *et al.*, 199b).

As análises executadas neste trabalho, baseadas no resultados de AFLP, para melhor conhecimento das características da população não permitem comparações específicas a nível de índices, pois estes não foram aplicados no estudo deste patossistema até então.

Os resultados apresentados aqui apontam a existência de uma alta variabilidade genética entre os isolados brasileiros de *Xam*. A heterozigose (Hexp) esperada corrigida para o menor valor de N para as duas populações é considerada elevada. Permitindo inferir que, apesar de ser uma população clonal, esta apresenta uma baixa estruturação genética. Alta variabilidade genética em populações de *Xam* também foi observada em estudos com isolados da África, Venezuela e Colômbia baseada em testes de RAPD e AFLP (OGUNJOBI *et al.*, 2006; RESTREPO, 2000; RESTREPO e VERDIER,1997).

A partir dos 85 isolados analisados, 26 MLGs foram encontrados, valor este considerado alto quando comparado com outros marcadores. Restrepo e Verdier (1997) acessando a diversidade de isolados colombianos de *Xam* com o marcador RFLP encontraram 26 MLGs entre 189 isolados testados.

Dentre os 26 MLGs encontrados, 16 genótipos foram provenientes da população da BA e 11 do MS-PR. Entretanto, apesar de haver alta variabilidade genética na população, esta não correlaciona com a origem geográfica dos isolados. Ambas as regiões brasileiras apresentaram alta variabilidade entre os isolados. Estudos recentes com isolados africanos mostram também haver diferenças significativas nas populações do patógeno dentro de uma mesma região (OGUNJOBI *et al.*, 2010).

O índice padrão de fixação entre grupos ( $G''_{st}$ ) baixo, com P-valor não significativo quando comparado os isolados da BA com MS-PR, indica que estas populações não diferem baseado na origem geográfica. Também, isolados geneticamente similares foram observados em regiões diferentes, sugerindo a migração de populações (WYDRA *et al.*, 1998). O MLG2 caracterizado neste trabalho, foi o único encontrado nas duas populações (BA e MS-PR). Portanto, é razoável assumir a migração de isolados entre as duas regiões. Estes resultados contrastam com aqueles encontrados por Restrepo e Verdier, (1997) na Colômbia, onde estudos realizados em diferentes sistemas ecológicos demonstraram diferenciação geográfica entre os isolados estudados. Contudo, não foi possível incorporar isolados oriundos de outros países neste estudo.

O índice G de Stoddart e Taylor e  $N_1$  de Hill, utilizados para estudar a diversidade entre as populações da BA e MS-PR, foram semelhantes para as duas populações. O mesmo resultado observado para riqueza e equitabilidade. Os valores baixos de equitabilidade são explicados pela alta frequência de poucos MLGs nas populações.

A partir da rede de MLGs, pode-se observar a separação dos isolados em dois grupos. Na população A encontra-se o genótipo MLG2 que mais se repetiu na população. Dentre os 85 isolados analisados 66% destes foram agrupados no MLG2. Aparentemente, os demais MLGs originaram-se a partir de mutações deste. O índice de diferenciação gênica calculado para estes grupos e seu respectivo P-valor significativo denota a existência de diversidade genética entre estes isolados, independente da origem geográfica. Este resultado reafirma os estudos realizados por Restrepo *et al.* (1999), o qual conclui que há uma alta diversidade da população brasileira de *Xam*, justificável pelo país ser o centro de origem do patógeno.

Os resultados de testes de patogenicidade, realizados com os 26 MLGs encontrados na população, mostra não haver correlação dos biotipos encontrados (não virulento, moderadamente virulento e virulento) com a origem geográfica. Dentro de

MLG2 é encontra-se representantes dos três grupos de patogenicidade. No entanto quando esta comparação é realizada a partir das populações A e B, observa-se que os MLGs da população B são constituídos, em sua maioria, por isolados não virulentos. A distância genética entre isolados das populações A e B e a predominância de isolados não virulentos nesta última, levanta a hipótese da possível presença de raças e mesmo outras espécies nesta população. Esta hipótese está sendo testada. Estudo de diversidade em diferentes zonas edafoclimáticas da Colômbia, realizado por Restrepo e Verdier (1997), utilizando a técnica RFLP, também não encontrou relação entre a patogenicidade e os grupos genéticos encontrados. No entanto, os autores deste trabalho acreditam na limitação dos testes de patogenicidade, pois estes foram conduzidos somente em uma variedade de mandioca, assim como neste estudo.

Por fim, os resultados deste trabalho contribuem para se esclarecer a diversidade genética de populações de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* presente no Brasil, que certamente auxiliarão no desenvolvimento de estratégias de manejo eficazes contra o patógeno.

## 5. CONCLUSÃO

Alto nível de polimorfismo foi encontrado entre os isolados de *Xam* a partir da amplificação seletiva com os primers EcoRI-A/MseI-G e EcorI-T/MseI-A.

A heterozigose esperada para as duas populações da BA e MS-PR é considerada elevada. Permitindo concluir que, apesar de ser uma população clonal, a diversidade dos isolados brasileiros é alta.

Baseado na análise de *minimum spanning network* observou a estruturação de dois grupos de MLGs distantes e alta diversidade genética foi obtida quando estes grupos foram comparados.

A partir dos testes de patogenicidade, os grupos de agressividade foram encontrados tanto nos MLGs presentes na população da BA, quanto na população do MS.

Os MLGs da população B, formado pelos isolados mais distantes são constituídos, em sua maioria, por isolados não virulentos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.; FERREIRA FILHO J. R. Mandioca: Uma boa alternativa para alimentação animal. **Bahia Agrícola**, v.7, n.1, p.50-56, 2005.

BOHER, B.; VERDIER, V. Cassava bacterial blight in Africa: the state of knowledge and implications for designing control strategies. **African Crop Science Journal**, v.2, p.1-5, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio** : Brasil 2012/2013 a 2022/2023. Brasília, p.96, 2013

BARTA, R.; COHNA, M.; KASSENA, A.; MCCALLUMB, E.J.; SHYBUTA, M.; PETRIELLO, A.; KRASILEVAA, K.; DAHLBECKA, D.; MEDINAC, C.; ALICAID, T.; KUMARE, L.; MOREIRAF, L. M.; NETOG, J. R.; VERDIERH, V.; SANTANAI, M. A.; KOSITCHAROENKULJ, N.; VANDERSCHURENB, H.; GRUISSEMB, W.; BERNALC, A.; STASKAWICZA, B. J. High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance. **PNAS**. v.109, p.1972–1979, 2012.

CARVALHO, LUIZ J. C. B. Biodiversidade e biotecnologia em mandioca. **XI Congresso Brasileiro de Mandioca. Anais...** Campo Grande: Embrapa, 2005.

CHICHERCHIO, C. L. S. Mandioca e principais derivados. In: **CONAB**. Companhia Nacional de Abastecimento. Estudos de Prospecção de Mercado: safra 2012/2013. p. 90-103, 2012. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_09\\_11\\_16\\_41\\_03\\_prospeccao\\_12\\_13.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_11_16_41_03_prospeccao_12_13.pdf). Acesso em: 12/01/2014.

ELANGO F, LOZANO JC. Pathogenic variability of *Xanthomonas manihotis*, the causal agent of cassava bacterial blight. **Fitopatologia Brasileira** v.6, p.57–63, 1981.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca\\_semiarido/index.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_semiarido/index.htm). Acesso em 23 jan. 2014.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL. Disponível em: [http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Mandioca\\_Mundo\\_2011.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Mandioca_Mundo_2011.pdf). Acesso em 12 fev. 2014.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Agricultural Department. A review of cassava in Latin América and the Caribbean with countries: case studies on Brazil and Colombia. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y5271e/y5271e07.htm>. Acesso em: 15 jan. 2014.

FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 9-13, 1967

FUKUDA, C. Doenças e seu controle. In: Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca, Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 672-697, 2006.

GAMEIRO, A. H. Mandioca: de alimento básico à matéria-prima industrial. Centro de Estudos Aplicados à Economia Aplicada (CEPEA/ESALQ/USP), 2002. Disponível em: [http://cepea.esalq.usp.br/pdf/mandioca\\_contexto.pdf](http://cepea.esalq.usp.br/pdf/mandioca_contexto.pdf). Acesso em: 10 fev. 2014.

GROXKO, M. Mandiocultura, Análise da Conjuntura Agropecuária Safra 2011/2012. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná (SEAB). Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/mandiocultura\\_2011\\_12.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/mandiocultura_2011_12.pdf). Acesso em: 17 jan. 2014

GRÜNWARD, N.J., GOODWIN, S.B., MILGROOM, M.G., FRY, W.E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology** 93:738-746, 2003.

HILL, M.O. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. **Ecology**. v. 54, p. 427-432, 1973.

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.;

ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, v.142, p.1881–1893, 1996.

JORGE, V.; FREGENE, M. A.; DUQUE, M. C.; BONIERBALE, M. W.; TOHME, J.; VERDIER, V. Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihote sculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.865-872, 2000.

LOZANO, J.C.; BOOTH, R.H. Enfermedades de la yuca. In: DOMINGUEZ, C.E. (Ed.). Yuca: investigacion, producción y utilización. Cali: Programa Yuca. Ciat/PNUD, p. 421-461. 1982.

LOZANO, J. C. Cassava bacterial blight: A manageable disease. **Plant Disease**, v.70, p.1089-1093, 1986.

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

MARAITE H. *Xanthomonas campestris* pathovars on cassava, cause of bacterial blight and bacterial necrosis. In: Swings JG, Civerolo EL, eds. *Xanthomonas*. London, UK: Chapman and Hall Ltd, 18–24, 1993.

MASSOLA, N.S.J.; BEDENDO, I.P. Doenças da mandioca (*Manihot esculenta*). In: KIMATI, H. *et al.* (Ed.). **Manual de Fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v. 2, p. 449-455, 2005.

MUNHOZ, C.F.; WEISS, B.; HANAI, L.R.; ZUCCHI, M.I.; FUNGARO, M.H.P.; OLIVEIRA, A.L.M.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; VIERIA, MLC. Genetic Diversity and a PCR-Based Method for *Xanthomonas axonopodis* Detection in Passion Fruit. **Phytopathology**. Vol. 101, No. 4, p. 416-424, 2011.

OGUNJOBI, A.A.; DIXON, A. G. O.; FAGADE, O. E. Prevalence of cassava bacterial blight in Nigeria. **African Crop Science Conference Proceedings**. v. 5, p. 479-482, 2001.

OGUNJOBI, A. A.; FAGADE, O. E.; DIXON, A. G. O. Comparative analysis of genetic variation among *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* isolated from the western states of Nigeria using RAPD and AFLP. **Indian Journal Microbiology**. v. 50, p. 132–138, 2010.

OGUNJOBI, A. A.; FAGADE, O. E.; DIXON, A. G. O. 2006. Molecular variation in population structure of *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* in the south eastern Nigeria. **African Journal Biotechnology**. v. 5, n. 20, p. 1868–1872, 2006.

RESTREPO, S.; VERDIER, V. Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4427–4434, 1997.

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

ROMEIRO R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: UFV , p: 55-64, 2001.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias Fitopatogênicas**. 2ed. Viçosa: UFV, p417, 2005.

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

SEBRAE.; SPM. Estudo de Mercado sobre a Mandioca (Farinha e Fécula). Disponível em:

[http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/F2D4D65FFFA3B380832574DC0046BFE1/\\$File/NT00039086.pdf](http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/F2D4D65FFFA3B380832574DC0046BFE1/$File/NT00039086.pdf). Acesso em: 18 jan. 2014.

SAVELKOUL, P. H. M.; AARTS, H. J. M.; DE HAAS, J.; DIJKSHOORN, L.; DUIM, B.; OTSEN, M.; RADEMAKER, J. L. W.; SCHOULS, L.; LENSTRA, J. A. Amplified-Fragment Length Polymorphism analysis: the state of an art. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37 p.3083–3091, 1999.

STODDART, J. A.; TAYLOR, J. F. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. **Genetics**. v. 118, p. 705-711, 1988.

VERDIER, V., RESTREPO, S., MOSQUERA, G., JORGE, V., & LOPEZ, C. Recent progress in the characterization of molecular determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*–cassava interaction. **Plant Mol Biol**. 56:573-584, 2004.

VERDIER V, BOHER B, MARAITE H, GEIGER JP. Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*). **Applied and Environmental Microbiology** v. 60, p. 4478–86, 1994.

VERDIER V., DONGO P., BOHER B. Assessment of genetic diversity among isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Journal of General Microbiology** v.139, p. 2591±601, 1993.

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

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Method Molecular Cell.Biology**, v.5, p.25-40, 1994.

VIANA, A. E. S.; SEDIYAMA, T.; CECON, P. R.; LOPES, S. C.; SEDIYAMA, M. A. N. Estimativas de tamanho de parcela em experimentos com mandioca. **Horticultura Brasileira**, v.20, p.58-63, 2002.

VILPOUX, O. F. Competitividade da mandioca no Brasil, como matéria-prima para amido. **Informações Econômicas**, v. 38, n.11, p. 27-38, 2008.

VILPOUX, O. **A cadeia de mandioca no Brasil**. Campo Grande: SEBRAE, p.82, 2006.

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KLUPER, M., AND ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23:4407-4414, 1995.

VUYLSTEKE, M.; PELEMAN, J. D.; MICHIEL J.; VAN EIJK, T. AFLP technology for DNA fingerprinting. **Nature Protocols**, v.2, n.6, p. 1387-1398, 2007.

WYDRA, K.; FESSEHAIE, A.; FANOU, A., SIKIROU, R.; JANSE, J.; VERDIER, V.; RUDOLPH, K. Variability of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, incitant of cassava bacterial blight, from different geographic origins in pathological, physiological, biochemical and serological characteristics. Pages 317-323 **In: Plant Pathogenic Bacteria**, Proc. Int. Conf., 9th. A. Mahadevan, ed. Centre for Advanced Study in Botany, University of Madras, India, 1998.

## 7. MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela S1:** Isolados, local e ano da coleta, cultivar, sintomas induzidos em plantas de mandioca.

<b>ISOLADOS</b>	<b>LOCAL DE COLETA</b>	<b>CULTIVAR</b>	<b>Sintomas</b>	<b>ANO</b>
1	Guanambi - BA	Castelona	S.S	2011
2	Guanambi - BA	Castelona	S.S	2011
3	Guanambi - BA	Castelona	S.A	2011
4	Guanambi - BA	Castelona	S.S	2011
5	Guanambi - BA	Castelona	S.S	2011
6	Guanambi - BA	Castelona	S.S	2011
7	Guanambi - BA	Castelona	S.S	2011
8	Guanambi - BA	Castelona	S.S	2011
9	Guanambi - BA	Castelona	S.M	2011
10	Guanambi - BA	Castelona	S.S	2011
11	Guanambi - BA	Castelona	S.M	2011
12	Guanambi - BA	Castelona	S.M	2011
13	Guanambi - BA	Castelona	S.S	2011
14	Guanambi - BA	Castelona	S.S	2011
15	Guanambi - BA	Castelona	S.S	2011
16	Guanambi - BA	Castelona	S.M	2011
17	Guanambi - BA	Castelona	S.S	2011
18	Guanambi - BA	Castelona	S.S	2011
19	Guanambi - BA	Castelinha	S.S	2011
20	Guanambi - BA	Castelinha	S.M	2011
21	Guanambi - BA	Castelinha	S.S	2011
22	Guanambi - BA	Castelinha	S.S	2011
23	Guanambi - BA	Castelinha	S.A	2011
24	Guanambi - BA	Castelinha	S.M	2011
25	Guanambi - BA	Castelinha	S.S	2011
26	Guanambi - BA	Castelinha	S.M	2011
28	Guanambi - BA	Castelinha	S.M	2011
29	Guanambi - BA	Castelinha	S.A	2011
30	Guanambi - BA	Castelinha	S.S	2011
31	Guanambi - BA	Castelinha	S.M	2011
32	Guanambi - BA	Castelinha	S.M	2011
33	Guanambi - BA	Castelinha	S.M	2011
34	Guanambi - BA	Castelinha	S.A	2011
35	Guanambi - BA	Castelinha	S.S	2011
36	Guanambi - BA	Castelinha	S.M	2011
37	Guanambi - BA	Joaquim Muá	S.M	2011
38	Guanambi - BA	Joaquim Muá	S.S	2011
39	Guanambi - BA	Joaquim Muá	S.S	2011
40	Guanambi - BA	Joaquim Muá	S.S	2011
41	Guanambi - BA	Joaquim Muá	S.M	2011
42	Guanambi - BA	Joaquim Muá	S.M	2011

43	Guanambi - BA	Joaquim Muá	S.S	2011
44	Guanambi - BA	Joaquim Muá	S.S	2011
45	Guanambi - BA	Joaquim Muá	S.M	2011
46	Igaporã - BA	IAC 90	S.S	2012
47	Igaporã - BA	Fécula Branca	S.A	2012
48	Igaporã - BA	Fécula Branca	S.S	2012
49	Igaporã - BA	IAC 90	S.A	2012
50	Igaporã - BA	IAC 90	S.A	2012
51	Igaporã - BA	Fécula Branca	S.S	2012
52	Igaporã - BA	Fécula Branca	S.A	2012
53	Igaporã - BA	Fécula Branca	S.A	2012
54	Igaporã - BA	Fécula Branca	S.S	2012
56	Igaporã - BA	IAC 90	S.A	2012
58	Igaporã - BA	IAC 90	S.M	2012
60	Igaporã - BA	Fécula Branca	S.M	2012
61	Igaporã - BA	Fécula Branca	S.M	2012
64	Igaporã - BA	IAC 90	S.A	2012
65	Ivinhema - MS	IAC 90	S.M	2012
66	Ivinhema - MS	IAC 90	S.S	2012
67	Ivinhema - MS	Fécula Branca	S.M	2012
68	Ivinhema - MS	Fécula Branca	S.S	2012
69	Ivinhema - MS	Fécula Branca	S.S	2012
70	Ivinhema - MS	IAC 90	S.M	2012
71	Ivinhema - MS	IAC 90	S.S	2012
74	Ivinhema - MS	Fécula Branca	S.S	2012
75	Ivinhema - MS	Fécula Branca	S.S	2012
76	Ivinhema - MS	Fécula Branca	S.S	2012
77	Ivinhema - MS	-	S.S	2012
78	Ivinhema - MS	-	S.S	2012
79	Ivinhema - MS	-	S.S	2012
80	Ivinhema - MS	-	S.S	2012
81	Ivinhema - MS	-	S.S	2012
82	Ivinhema - MS	-	S.S	2012
85	Ivinhema - MS	-	S.M	2012
86	Ivinhema - MS	-	S.S	2012
87	Ivinhema - MS	-	S.S	2012
88	Ivinhema - MS	-	S.S	2012
89	Ivinhema - MS	-	S.M	2012
90	Ivinhema - MS	-	S.S	2012
91	Ivinhema - MS	-	S.S	2012
92	Ivinhema - MS	-	S.S	2012
93	Ivinhema - MS	-	S.A	2012
98	Diamantina do Norte - PR	-	S.S	2012
101	Diamantina do Norte - PR	-	S.S	2012