

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS, BIOLÓGICOS E  
EXPRESSÃO GÊNICA NA RESISTÊNCIA À BACTERIOSE DA  
MANDIOCA (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*).**

**FERNANDO LUIZ MATTOS GONZALEZ JUNIOR**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
FEVEREIRO – 2021**

**AVALIAÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS, BIOLÓGICOS E  
EXPRESSÃO GÊNICA NA RESISTÊNCIA À BACTERIOSE DA  
MANDIOCA (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*).**

**FERNANDO LUIZ MATTOS GONZALEZ JUNIOR**

Biotechnologista

Universidade Federal da Bahia, 2017

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca Fruticultura, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira.

Coorientador: Dra Claudia Fortes Ferreira.

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**FEVEREIRO – 2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

G643a

Gonzalez Junior, Fernando Luiz Mattos.

Avaliação de agentes químicos, biológicos e expressão gênica na resistência à bacteriose da mandioca (*Xanthomonas phaseoli* Pv. Manihotis). / Fernando Luiz Mattos Gonzalez Junior. – Cruz das Almas, Bahia, 2021.

130f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira.

Coorientadora: Prof. Dra. Claudia Fortes Ferreira.

1. Fitopatologia – Mandioca. 2. Doenças e pragas – Mandioca. 3. Controle biológico – Análise. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 581.2

Ficha elaborada pela Biblioteca Central de Cruz das Almas - UFRB.  
Responsável pela Elaboração - Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).  
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico).

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

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE**  
**FERNANDO LUIZ MATTOS GONZALEZ JUNIOR**



---

Dr Saulo Alves Santos de Oliveira  
Embrapa Mandioca e Fruticultura



---

Dra. Andresa Priscila de Souza Ramos  
Embrapa Mandioca e Fruticultura



---

Dra. Daniele Takahashi Bernal  
Universidade Federal da Bahia

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_ conferindo o grau de Mestre  
em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_.”

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, pai e irmã pela paciência em relação às horas que lhes neguei.

Aos amigos Thiago, Bruna, Marcos, Jéssica, Priscila, Luciele, Débora e Francine pelo afeto e credibilidade e sobretudo ao amor nas horas difíceis.

Aos amigos companheiros de mestrado, Cleilton, Cristiane, Layana, Mileide que tornaram a jornada mais leve.

À equipe e amigos do Laboratório de Biologia Molecular – EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, sobretudo aos exímios profissionais Dra. Andresa e ao Técnico de Laboratório Raimundo pelo apoio nesta jornada.

Ao doutor Saulo Alves Santos de Oliveira pelo apoio e suporte como orientador.

Aos colegas de trabalho do NUGTESP-CFP, Gerônimo, Aline, Silvestre, Robson, Thiago e Evandro pelo suporte e entendimento das minhas necessidades.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia agrícola (PPGMA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e à Embrapa Mandioca e Fruticultura.

A todos que aqui não foram citados, mas em decorrência da vida sei que não foram esquecidos.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

**Figura 1:** Sintomas característicos da infecção por bacteriose. (A) Lesões angulares com presença anasarca (encharcamento), características do início da infecção. (B) Requeima das folhas, de formato irregular, característico de estágios mais avançados da doença (PERUCH, et al., 2013). ----- 24.

### Capítulo II

**Figura 1.** Placas contendo halos de inibição dos testes de antibiograma e Gráfico com valores médios das áreas de halos obtidos no ensaio de antibiograma. **1)** Ensaio de Antibiograma com o Sulfato de Cobre; **A)** Placa contendo o ensaio de Sulfato de Cobre, **B)** Gráfico contendo os valores médios de halo de inibição obtidos com relação a dose avaliada de Sulfato de Cobre. **2)** Ensaio de Antibiograma com o Fosfito de Cobre; **A)** Placa contendo o ensaio de Fosfito de Cobre, **B)** Gráfico contendo os valores médios de halo de inibição obtidos com relação a dose avaliada de Fosfito de Cobre. **3)** Ensaio de Antibiograma com o Sulfato de Estreptomicina; **A)** Placa contendo o ensaio de Sulfato de Estreptomicina, **B)** Gráfico contendo os valores médios de halo de inibição obtidos com relação a dose avaliada de Sulfato de Estreptomicina. Letras maiúsculas simbolizam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey a  $p > 0,05$ . **4)** Placas utilizadas no ensaio de antibiograma em que os tratamentos não apresentaram formação de halo de inibição; **A)** Oxícloreto de Cobre, **B)** Acibenzolar-S-Metílico (ASM), **C)** Controle. ----- 60.

**Figura 2.** 1. Placas contendo os resultados do ensaio de antagonismo com área de mensuração dos halos de inibição. (A) VT-F1, (B) BAC. TRA 058895, (C) BAC. TRA 058893, (D) placa apenas com o Xpm (controle). 2. Gráfico com valores médios dos halos de inibição obtidos no ensaio de antagonismo por metabólitos secundários. Letras maiúsculas simbolizam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey a  $p > 0,05$ . - ----- 62.

**Figura 3.** Gráfico de barras representando a AAC do índice de severidade da doença ao longo do tempo (30 dias) dos diferentes tratamentos dentro da mesma variedade. Letras maiúsculas simbolizam diferenças estatísticas entre as médias dos diferentes tratamentos dentro de um mesmo tempo; letras minúsculas simbolizam diferenças estatísticas de um mesmo tratamento em tempos diferentes com base no teste estatístico Tukey a  $p > 0,5$ . \*ASM = Acibenzolar-S-Metílico. ----- 64.

**Figura 4.** Gráfico de barras representando a Taxa de Incremento do ISD% (TID) índice de severidade da doença ao longo do tempo (30 dias) dos diferentes tratamentos dentro da mesma variedade. Letras maiúsculas simbolizam diferenças estatísticas entre as médias dos diferentes tratamentos dentro de um mesmo tempo; letras minúsculas simbolizam diferenças estatísticas de um mesmo tratamento em tempos

diferentes com base no teste estatístico Tukey a  $p > 0,5$ . \*ASM = Acibenzolar-S-Metílico.----- 66.

### Capítulo III

**Figura 1.** Gráfico representando os valores de ISD (%) ao longo do tempo (30) dias. Linhas pontilhadas indicam a média móvel. \* Simbolizam diferenças estatísticas entre pares dos valores de ISD (%) dos tratamentos obtidos no mesmo tempo baseado no teste F a 5% de significância. ----- 93.

**Figura 2.** Gráficos do Log da Quantificação Relativa (Log RQ) dos genes candidatos. Letras maiúsculas determinadas com base no teste estatístico Tukey a  $p > 0,5$ . 96-98.

**Figura 3.** Gráfico de HeatMap baseado nos valores de Log da Quantificação Relativa (Log RQ) dos genes candidatos. Cores azuis indicam valores positivos de Log RQ ou superexpressão do gene enquanto que as cores vermelhas indicam valores negativos de Log RQ e repressão do gene ----- 101.

**Figura 4.** Curva de melting ou de dissociação obtida na curva de eficiência dos primers. A) 25 S, B) PP2A, C) MeCu/ZnSOD, D) MeBZIP, E) MeRZF, F) MeCPI, G) MeLEA H) MePAL, I) MANES.14G034600, J) MANES.16G007300, L) MANES.06G155600, M) MANES.04G096600, N) MANES.12G132900, P) MANES.11G013700. -----113-116.

**Figura 5.** Perfis de expressão de genes mapeados para processos da via de estresse biótico, pelo software Mapman, a partir do log RQ (quantificação relativa obtida pelo RT-qPCR) nos tempos 0 e 12 horas. Cada quadrado representa um gene diferente mapeado para o mesmo processo. -----117.

**Figura 6.** Perfis de expressão de genes mapeados para processos da via de estresse biótico, pelo software Mapman, a partir do log RQ (quantificação relativa obtida pelo RT-qPCR) nos tempos 24 a 48 horas. Cada quadrado representa um gene diferente mapeado para o mesmo processo.-----119.

**Figura 7.** Perfis de expressão de genes mapeados para processos da via de estresse biótico, pelo software Mapman, a partir do log RQ (quantificação relativa obtida pelo RT-qPCR) nos tempos 72 a 144 horas. Cada quadrado representa um gene diferente mapeado para o mesmo processo.-----120.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

**Tabela 1.** Escala de notas utilizada para avaliação dos sintomas da CBB apresentado pela planta. -----19.

### Capítulo II

**Tabela 1.** Valores de concentração da estreptomicina, controles químicos e indutores de resistência utilizados nos ensaios de antibiograma. ----- 52.

**Tabela 2.** Escala de notas utilizada para avaliação dos sintomas da CBB apresentado pela planta.----- 55.

**Tabela 3.** Doses efetivas do Sulfato de Cobre e Fosfito de Cobre em relação ao DE<sub>50</sub> e DE<sub>100</sub> do Sulfato de Estreptomicina.-----60.

**Tabela 4.** Análise de variância (ANOVA) da Área abaixo da curva (AAC) do ensaio de avaliação da resistência à CBB em ambiente controlado *in vivo*, variedade 'BRS Formosa'-----74.

**Tabela 5.** Análise de variância (ANOVA) da Área abaixo da curva (AAC) do ensaio de avaliação da resistência à CBB em ambiente controlado *in vivo*, variedade 'BRS Kiriris'.----- 74.

**Tabela 6.** Análise de variância (ANOVA) da Taxa de Incremento (TID) da Doença do ensaio de avaliação da resistência à CBB em ambiente controlado *in vivo*, variedade 'BRS Formosa'.-----75.

**Tabela 7.** Análise de variância (ANOVA) da Taxa de Incremento (TID) da Doença do ensaio de avaliação da resistência à CBB em ambiente controlado *in vivo*, variedade 'BRS Kiriris'.-----75.

### Capítulo III

**Tabela 1.** Escore com notas de acordo com as sintomatologias desenvolvidas pelas plantas. ----- 87.

**Tabela 2.** Genes candidatos e endógenos utilizados neste estudo. ----- 90 - 92.

**Tabela 3.** Tabela contendo os dados relacionados aos testes prévios dos primers com o material genético obtido (Slope, R<sup>2</sup> e eficiência).-----94 - 95.



## LISTA DE EQUAÇÕES.

### Capítulo II

**Equação 1.** Equação para cálculo do índice de severidade da doença (MCKINNEY, et al., 1923). ----- 55.

### Capítulo III

**Equação 1.** Equação para cálculo do índice de severidade da doença (MCKINNEY, et al., 1923). ----- 86.

**Equação 2.** Equação de quantificação relativa (RQ). Ct é o limiar de detecção da fluorescência do primer na reação de RT-qPCR (PFAFFL et al., 2002). RQ) Quantificação relativa,  $\Delta\Delta Ct$ , é determinado pelo valor das diferenças de Ct das amostras testes ( $\Delta Ct$  (amostra teste)) subtraído pelo valor Ct das amostras calibradoras ( $\Delta Ct$  (amostras calibradoras)). -----88.

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

cm- centímetro

RT-qPCR- Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa.

PCR – Reação em cadeia da polimerase

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

OD – Densidade ótica

g L<sup>-1</sup> – Gramas por litro

mRNA – RNA mensageiro

°C – graus Celsius

*Xpm* - *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihot*.

CBB – Bacteriose da mandioca (*Cassava Bacterial Blight*).

ISD% - Índice de Severidade da doença.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

DAMP's - Padrões moleculares associados a danos do patógeno.

RRP's - Proteínas de membrana receptoras de reconhecimento de padrões.

PAMP's - Padrões moleculares associados a patógenos.

ERO's - Espécies reativas de oxigênio.

RQ– Quantificação relativa.

Log – Logaritmo.

YPG – Extrato de levedura, peptona e glicose.

TID – Taxa de Incremento da doença.

AAC – Área abaixo da curva.

DE – Dose efetiva

ASM - Acibenzolar-S-Metílico

PR- Proteínas relacionadas a patogênese

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>RESUMO</b> .....  | 13 |
| Introdução Geral .....   | 17 |
| <b>CAPÍTULO I</b> .....  | 23 |
| Revisão de Literatura.....   | 23 |
| Bacteriose da mandioca. ....   | 25 |
| Manejo da bacteriose da mandioca.....  | 28 |
| Seleção de indivíduos resistentes. ....  | 34 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 37 |
| <b>CAPÍTULO II</b> .....   | 46 |
| Efeitos de indutores de resistência e agentes de controle químico e biológico no controle da bacteriose ( <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i> ) da mandioca. .... | 46 |
| Resumo. ....   | 47 |
| Abstract. ....   | 49 |
| Introdução.....  | 51 |
| Materiais e métodos. ....  | 52 |
| Ensaio de antibiograma.....  | 53 |
| Dose efetiva. ....   | 54 |
| Ensaio de antagonismo biológico por metabólitos secundários. ....  | 54 |
| Testes de resistência contra a CBB <i>in vivo</i> . ....   | 56 |
| Resultados.....  | 59 |
| Ensaio de Antibiograma .....   | 59 |
| Dose efetiva. ....   | 61 |
| Ensaio de antagonismo biológico por metabolitos secundários.....   | 62 |
| Ensaio de controle químico e biológico <i>in vivo</i> .....  | 63 |
| Área abaixo da curva (AAC).....  | 63 |
| Taxa de Incremento do ISD% .....   | 66 |
| Discussão.....   | 68 |
| Ensaio de Antibiograma. ....   | 68 |
| Ensaio de Antagonismo por metabolitos secundários.....   | 69 |
| Avaliação da resistência à CBB em ambiente controlado <i>in vivo</i> .....   | 70 |
| Conclusão.....   | 74 |

|   |            |
|---|------------|
| Material Complementar. ....   | 75         |
| Referências. ....   | 77         |
| <b>CAPÍTULO III</b> .....   | <b>81</b>  |
| Avaliação da expressão de genes candidatos à resistência de genótipos contrastantes de mandioca contra a bacteriose ( <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i> )..... | 81         |
| Resumo. ....  | 82         |
| Abstract. ....  | 83         |
| Introdução.....   | 84         |
| Materiais e Métodos. ....   | 87         |
| Ensaio de resistência vegetal.....  | 87         |
| Extração do RNA total.....  | 88         |
| Tratamento do RNA e síntese de cDNA.....  | 88         |
| Reação de RT-qPCR .....   | 89         |
| Curva de Calibração.....  | 90         |
| Avaliação de respostas contra o estresse biótico .....  | 90         |
| Escolha de genes candidatos .....   | 91         |
| Resultados.....   | 94         |
| Ensaio de Resistência vegetal .....   | 94         |
| Curva de eficiência.....  | 95         |
| Ensaio de RT-qPCR.....  | 96         |
| Discussão .....   | 102        |
| Ensaio de Resistência.....  | 102        |
| RT-qPCR.....  | 103        |
| Conclusão .....   | 112        |
| Agradecimentos.....   | 113        |
| Material complementar. ....   | 114        |
| Avaliação de estresse biótico.....  | 118        |
| Referências. ....   | 124        |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   | <b>130</b> |

## RESUMO

### **Gonzalez, F.L.M. Avaliação de agentes químicos, biológicos e expressão gênica na resistência à bacteriose da mandioca (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*).**

Por se tratar de uma cultura de fácil manejo, rústica e de grande produtividade, a mandioca (*Manihot esculenta*) se difundiu pelo mundo sendo cultivada em quase todos os países em desenvolvimento. Por sua abrangência e agressividade, a bacteriose (CBB) é considerada como uma das principais doenças de parte aérea da mandioca. O agente causal da CBB é a bactéria gram negativa *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihoti* (*Xpm*). O controle da CBB é muito difícil, pois manivas destinadas ao plantio oriundas de plantas aparentemente saudáveis, podem conter o patógeno. Além disso, o patógeno se dispersa facilmente pelo ambiente. O presente trabalho teve por objetivo identificar entre agentes de controle químico, indutores de resistência e agentes biológicos, aqueles com potencial para utilização no manejo da CBB. Os indutores de resistência utilizados foram o Fosfito de Cobre e Acibenzolar-S-Metílico, os controles químicos utilizados foram Oxidocloreto de cobre e Sulfato de cobre. Como agentes de controle biológico, foram utilizados organismos isolados do fertilizante orgânico Vitaflex (VT-F1) e duas cepas de *Bacillus* sp., TRA 058895 e TRA 058893. Estes tratamentos foram aplicados sobre duas variedades de mandioca 'BRS Formosa' (resistente a CBB) e 'BRS Kiriris' (Suscetível a CBB). Dos controles químicos e indutores de resistência testados *in vivo*, o Sulfato de cobre e Fosfito de cobre foram os únicos que apresentaram resultados consistentes no controle da CBB. Neste estudo também foi avaliada a expressão de genes para resistência à CBB a fim de se mensurar genes candidatos associados à resistência da CBB em mandioca. Este estudo foi conduzido com duas variedades de mandioca com diferenças de resposta contra a CBB que foram previamente inoculadas com *Xpm*. A quantificação da expressão gênica via RT-qPCR foi realizada nos tempos 0, 12, 24, 48, 72, e 144 horas após a inoculação. Genes associados à resistência da parede celular (MANES.04G096600), proteína possivelmente relacionada ao amadurecimento (MANES.14G034600), à expressão do fitohormônio Etileno (MANES.11G013700) e à regulação positiva do citocromo P450 (MANES.12G132900), demonstraram expressão condizente ao desenvolvimento da doença.

**Palavras Chaves.** *Xpm*, resistência vegetal, genes candidatos, controle químico, controle biológico, indução de resistência.

## ABSTRACT

**Gonzalez, F.L.M. Evaluation of chemical, biological agents and gene expression in the resistance to cassava bacterial blight (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*).**

Because it is a crop of easy management, rustic and high yield, cassava (*Manihot esculenta*) spread throughout the world being cultivated in almost all developing countries. Due to its distribution and aggressiveness, bacterial blight (CBB) is considered one of the main diseases of cassava shoots. The causative agent of CBB is a Gram-negative bacterium, *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihot* (Xpm). Control measures of CBB is very difficult, because cuttings destined for planting from apparently healthy plants can contain the pathogen. In addition, the pathogen disperses easily throughout the environment. Therefore, the present work aimed to identify among chemical control agents, resistance inducers and biological agents with potential use in the management of CBB. The resistance inducers used were Copper Phosphite and Acibenzolar-S-Methyl and the chemical controls used were Copper Oxychloride and Copper Sulfate. Organisms isolated from the organic fertilizer Vitaflex (VT-F1), were used as biological control agents, along with two *Bacillus* sp. strains, TRA 058895 and TRA 058893. These treatments were applied on two cassava varieties 'BRS Formosa' (resistant to CBB) and 'BRS Kiriris' (Susceptible to CBB). Among the chemical controls and resistance inducers tested *in vivo*, copper sulfate and copper phosphite were the only ones that presented consistent results in the control of CBB. In this study, the expression of genes for resistance to CBB was also evaluated to identify candidate genes associated with CBB resistance in cassava. This study was conducted with two varieties of cassava with different responses against CBB, previously inoculated with *Xpm*. The quantification of gene expression via RT-qPCR was performed at 0, 12, 24, 48, 72, and 144 hours after inoculation. Genes associated with cell wall resistance (MANES.04G096600), possible protein related to ripening (MANES.14G034600), expression of phytohormone ethylene (MANES.11G013700) and positive regulation of cytochrome P450 (MANES.12G132900), demonstrated expression consistent with the development of the disease.

**Keywords.** Xpm, plant resistance, candidate genes, chemical control, biological control, resistance induction.



## Introdução Geral

A Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta nativa da América do Sul e Central (FAO, 2013). O seu principal produto são suas raízes tuberosas, que possuem grande quantidade de amido, podendo ser consumido cozida (aipim/macaxeira) em forma de farinhas, ou amido purificado para uso industrial (DA SILVA, et al., 2014). O amido de mandioca tem grande importância econômica, sendo aplicado em diferentes setores como, na indústria petroleira, farmacêutica, cosmética, alimentícia e química (FERNANDES, et al., 2017). Além das raízes, as suas folhas com devidos tratamentos são incluídas na alimentação humana e em ração animal (SANTOS, et al., 2014).

A mandioca é considerada pela FAO como um alimento essencial para o combate à fome e nos países em desenvolvimento figura-se como a terceira fonte mais abundante de carboidrato atrás apenas do milho (*Zea mays*) e arroz (*Oryza sativa*) (DERAL-PR, 2019). O Brasil já figurou como líder mundial da produção, no entanto, vem perdendo espaço para países Africanos e Asiáticos, que passaram a implementar mais aparatos tecnológicos no cultivo, emprego de variedades de maior produtividade e maiores áreas destinadas ao cultivo (GROXKO, 2019).

A principal forma de plantio e multiplicação da mandioca é via propagação vegetativa, por meio de seções do caule, conhecidas popularmente como manivas (TATIS, et al., 2014). Por ser considerada uma cultura rústica e de fácil manejo, a mesma é largamente cultivada por pequenos agricultores e agricultores familiares, sendo em muitas das vezes, considerada como agricultura de subsistência (FILHO, et al., 2012).

Apesar de dispor de grandes áreas destinadas ao plantio da mandioca, o Brasil vem apresentando baixa produtividade em estados das Regiões Norte e Nordeste (CONAB, 2019). Vários fatores contribuem ao longo do tempo com esta baixa produtividade, como uso excessivo do solo, baixa utilização de insumos agrícolas, manejo inadequado da cultura e incidência de doenças e pragas (ISHIDA, et al., 2016). A mandioca é acometida por diferentes doenças que atingem diferentes tecidos da planta como podridão radicular, cercosporiose, antracnose entre outros (SILVA, et al.,

2009). Uma das doenças mais importantes que atinge a cultura é a bacteriose da mandioca (CBB - *Cassava Bacterial Blight*), atualmente difundida por todo o mundo, sendo classificada como uma das doenças com maior potencial destrutivo para a cultura da mandioca (FARNOU, et al., 2018).

A bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), é o agente causal da CBB (MORA, et al., 2019). A *Xpm* é uma bactéria Gram negativa, aeróbia estrita, que pode colonizar os vasos condutores da planta sem provocar sintomas de infecção, podendo sobreviver no solo e em tecidos mortos (ISHIDA, et al., 2016). O patógeno pode ser disperso por respingos de água provenientes de gotas da chuva ou da irrigação que colidiram com folhas infectadas e pelo uso de manivas infectadas (LÓPEZ, et al. 2012). Em estágios mais avançados da infecção, ocorre a exsudação de goma ao longo da nervura de folhas infectadas, em hastes e pecíolos e fissuras no caule, sendo que essa goma possui grande quantidade de matriz extracelular, células e metabólitos secundários do patógeno (GOMES, 2005).

Por se tratar de um patógeno de movimentação sistêmica, não existem medidas curativas contra o mesmo, assim a melhor forma de controle é pelo uso de variedades resistentes de mandioca associado ao rígido controle fitossanitário de ferramentas utilizadas no manejo (FANOUE, et al., 2018; RAMIREZ, et al. 2020). Uma vez que não existem produtos químicos aprovados no Brasil para o manejo da bacteriose com efeito protetor ou sistêmico, justifica-se a investigação de produtos que possam auxiliar no manejo dessa enfermidade (ISHIDA, et al., 2016). Dentre as possibilidades de uso, sabe-se que em as bactérias do gênero *Xanthomonas* possuem certa sensibilidade a produtos baseados em cobre. Os íons de cobre são muito utilizados pela sua ação de largo espectro, baixa toxicidade, solubilidade em água e estabilidade no meio (SWINGS, et al, 1993).

Outra forma de controlar a propagação da doença se dá pelo uso de indutores de resistência, como o Fosfito de cobre e Acibenzolar-S-Metílico (ASM) (DIAS, et al., 2019). Os indutores não atuam diretamente sobre o patógeno, mas ativam respostas da planta contra o patógeno. O ASM por exemplo, atua ativando respostas associadas ao ácido salicílico e assim induz a produção de proteínas relacionadas a patogênese (PRP) e moléculas de defesa como fenóis (ISHIGA, et al., 2019).

O Fosfito de cobre atua de forma local ativando a produção de moléculas de defesa como fitoalexinas além disso por conter íons cúpricos, o mesmo pode atuar de forma branda sobre o patógeno (CARDUCCI, et al. 2019). Além destas ações, o Fosfito de Cobre atua no desenvolvimento foliar da planta ao fornecer fósforo, e além de indutor de resistência, o mesmo é um fertilizante foliar (SANTOS, et al., 2017)

Além destas metodologias apresentadas, outra que desponta pelo seu interesse ambiental e econômico, é o uso de agentes de controle biológico (LIU, et al, 2016). O controle biológico apresenta interesse econômico e agrônômico devido aos baixos riscos de contaminação e baixo custo a longo prazo (FILHO, et al. 1995). Os agentes de controle biológico têm a capacidade de proteger a planta de diferentes patógenos, prover um aporte nutricional considerável e sintetizar fatores de crescimento essenciais para a planta (KHOL, et al., 2019).

Apesar de ser uma forma de controle promissora, não existem muitos organismos indicados ao manejo da bacteriose da mandioca (BANITO, 2003; FANOU, et al., 2018). Os controles biológicos podem desempenhar diferentes papéis, podendo induzir resistência, ou atuar diretamente sobre o patógeno por mecanismos antagonistas ou de competição (FARNOU, et al., 2018). Já existem controles biológicos baseados em *Bacillus* sp. contra doenças causadas por patógenos pertencentes ao gênero *Xanthomonas*, o que indica a possibilidade de se estabelecer controles biológicos contra a CBB (NEWMAN, et al., 2017).

Em vista das necessidades de novos mecanismos para controle da CBB, o presente estudo buscou testar potenciais agentes de controle químicos, agentes de controle biológico e indutores de resistência quanto a sua ação. Os controles químicos testados foram o Sulfato de cobre, Oxidocloreto de cobre. Os indutores de resistência testados foram o Acibenzolar-S-Metílico e o Fosfito de cobre. Como controles biológicos testamos isolados de *Bacillus* spp. TRA 058895 e TRA 058893. Também foram testados organismos isolados do fertilizante orgânico Vitaflex, como potenciais agentes de controle biológico.

Foram conduzidos ensaios *in vitro* a fim de testar a ação dos compostos supracitados diretamente sobre o patógeno. Os indutores de resistência e controles químicos foram empregados em ensaios de antibiograma. Os agentes de controle

biológico foram avaliados quanto suas potências de biocontrole de *Xpm* por meio da produção de metabólitos secundários. Afirmado a eficiência desses agentes *in vitro*, foram conduzidos ensaios *in vivo*.

Para determinar a ação protetora, erradicante e curativa dos agentes, os mesmos foram pulverizados em plantas inoculadas por *Xpm*. A fim de mensurar a ação dos agentes, foram pulverizados manualmente sobre as plantas em diferentes tempos: -7) uma semana antes da inoculação, 0) no dia da inoculação e +7) uma semana após a inoculação da *Xpm*. Neste ensaio foram utilizados 5 tratamentos e 2 controles. Foram analisados os indutores de resistência ASM e Fosfito de cobre, o controle químico Sulfato de cobre, e como agentes biológicos, os isolados TRA 058893 e TRA 058895 de *Bacillus* sp. fornecidos pelo banco de microrganismos da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura.

O ensaio foi dividido em 4 grupos, estes grupos foram divididos de acordo ao momento da aplicação dos tratamentos que foram os dois tratamentos de natureza de controle biológico por indução de resistência (*Bacillus* sp. isolados TRA 058893 e TRA 058895) dois indutores de resistência Acibenzolar-S-Metílico (ASM) e Fosfito de Cobre e um controle químico o Sulfato de Cobre. Os grupos foram divididos em (-7, 0 e 7) o primeiro grupo foram aqueles tratados uma semana antes da inoculação (-7); (0) no momento da inoculação e (7) sete dias após a inoculação. Em cada grupo um total de cinco tratamentos foram testados, em 12 plantas de cada variedade.

Foram utilizadas duas variedades de mandioca, 'BRS Formosa' (resistente a CBB) e 'BRS Kiriris' (suscetível a CBB); ambas fornecidas pelo campo de cultivo da Embrapa mandioca e fruticultura. As plantas foram inoculadas com o isolado *Xpm* 1502 4.1 provenientes do banco de microrganismos Embrapa Mandioca e Fruticultura. Visando determinar o impacto dos tratamentos sobre o desenvolvimento das doenças, as plantas foram avaliadas com base em escala de notas a cada 48h, por um total de 30 dias. Para a determinação da severidade, a seguinte escala de notas foi utilizada (Tabela 1).

**Tabela 1.** Escala de notas utilizada para avaliação dos sintomas da CBB apresentados pela planta.

| <b>Escore</b> | <b>Parâmetros para avaliação</b>                                      |
|---------------|---|
| <b>0</b>      | Plantas saudias   |
| <b>1</b>      | Amarelecimento no terço inferior                                      |
| <b>2</b>      | Amarelecimento do terço médio – lesões de requeima ou manchas aquosas |
| <b>3</b>      | Amarelecimento de toda a planta com necrose                           |
| <b>4</b>      | Murcha de toda planta com necrose                                     |
| <b>5</b>      | Murcha acompanhada de morte   |

A seleção de variedades resistentes é algo muito comum para o combate de doenças e pragas (ISHIDA, et al., 2016). Já existem várias variedades comerciais de mandiocas indicadas para locais em que a doença, CBB é endêmica (OLIVEIRA, et al., 2016; MATTOS, et al., 2006). Apesar disso, estudos que investiguem mecanismos moleculares responsáveis em promover resistência à CBB são necessários, pois facilitarão futuramente a seleção de variedades resistentes com base no genótipo (OLIVEIRA, et al., 2016).

Como uma estratégia complementar à utilização de agentes de controle químico, biológicos e indutores de resistência, um segundo trabalho foi realizado visando a avaliação de genes candidatos com possível associação com a resistência genética da mandioca à bacteriose. Para tanto, duas variedades sabidamente contrastantes quanto à resistência à CBB, sendo uma suscetível ('BRS Kiriris') e outra resistente ('BRS Formosa'), foram desafiadas com o isolado *Xpm* 1502 4.1 provenientes do banco de microrganismos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Neste ensaio também foram utilizadas plantas não inoculadas de ambas as variedades. As plantas foram avaliadas pelo período de 48 horas durante 30 dias, com base na escala de notas de sintomatologia presentes na tabela 1. Essas notas foram usadas nos cálculos na determinação do índice de severidade da doença, equação 1.

Amostras foliares foram colhidas nos tempos, 0, 12, 24, 48, 72 e 144 horas para avaliação da expressão gênica de forma quantitativa. Neste ensaio foi empregada a

técnica de RT-qPCR. Primers provenientes dos ensaios de López (2005) e Lima (2018), foram utilizados. Estes primers foram avaliados via BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) quanto às suas compatibilidades e alinhamento com o material genético da mandioca. Estes primers estão relacionados a inúmeros mecanismos e podem estar potencialmente associados a resistência contra a CBB, pois em organismos modelos são responsáveis por ativação de mecanismos de resistência.

Este trabalho foi dividido em três capítulos. No primeiro capítulo foi realizado a revisão da literatura onde foram abordados temas pertinentes ao trabalho embasando-o teoricamente. No segundo capítulo demonstrou-se os métodos, resultados e discussões dos ensaios realizados na averiguação da ação contra a CBB dos controles químicos e biológicos e indutores de resistência. No terceiro e último capítulo, os métodos e resultados discutidos em relação ao estudo de transcrição de genes candidatos das plantas desafiados pela CBB, foram abordados.

---

# **CAPÍTULO I**

## **Revisão de Literatura**

---

## 1. A MANDIOCA.

A mandioca (*Manihot esculenta*) pertencente à família das Euforbiáceas possui inúmeros fins alimentícios. As suas raízes tuberosas ricas em amido podem ser consumidas *in natura*, com diferentes preparos, ou em farinhas (GONZALEZ, et al., 2002). A mandioca é comumente cultivada com o uso de pequenas secções do caule, popularmente conhecidas como manivas (FAO, 2013). Esta cultura é responsável diretamente pela alimentação de mais 500 milhões de pessoas ao redor do mundo (MORA et al., 2019). Devido a sua resiliência e rusticidade, a mandioca passou a ser cultivada pelos continentes asiático, africano e americano, sendo tratada pela FAO (2013) como um dos alimentos essenciais para o combate à fome. A mandioca adapta-se com bons rendimentos em diferentes climas e solos, com maior desempenho em climas tropicais e em solos arenosos de boa drenagem (LIMA, et al., 2015).

A produção mundial da mandioca encontra-se estagnada quanto ao acréscimo de produtividade, mesmo que a cada ano maiores áreas sejam dedicadas à sua produção (FAO, 2020). No continente asiático, onde houve um grande emprego de recursos financeiros e tecnológicos, além de condições climáticas favoráveis, houve também crescimento considerável da produtividade, onde no ano de 2019 alcançou cerca de 21.000 Kg/ha contra 13.000 Kg/ha produzidos pela África e 14.000 Kg/ha no Brasil (FAOSTAT, 2019).

O Brasil já foi o maior produtor mundial de mandioca e atualmente figura-se como quinto, estando atrás da Nigéria e Tailândia, República Democrática do Congo e Gana (ALVES, et al. 2019). No Brasil, as principais regiões produtoras da mandioca são a Região Norte e Nordeste produzindo no ano de 2019, 7.467 e 4.580 milhões de toneladas de raízes tuberosas, respectivamente (IBGE, 2019).

Atualmente o estado brasileiro que apresentou maior crescimento na produção foi o Paraná, com 3.483 milhões de toneladas produzidas (IBGE, 2019). Este aumento da produção correspondeu a 10% a partir do ano de 2015 (IBGE, 2019). No estado do Paraná, a mandioca é utilizada na produção de insumos para indústria, portanto, há mais investimentos dos produtores em busca de implementação de novas



tecnologias, justificando a alta produtividade alcançada de 24,528 kg/ha no ano de 2019 (IBGE, 2019).

As doenças e pragas são responsáveis atualmente por quase 65% das perdas na produção de mandioca no Brasil (GROXKO, 2019). Um dos principais fatores que levam às grandes perdas de produção da cultura são as doenças (PERUCH, et al., 2013). A cultura da mandioca é acometida por diferentes doenças oriundas dos mais diversos patógenos que infectam diferentes tecidos (MODESTO, et al., 2014). Doenças virais como o mosaico da mandioca e fúngicas, como as podridões radiculares, podem levar a perdas de 30% na produção (MCCALLUM, et al., 2017). Das doenças de origem bacteriana, a bacteriose é uma das principais e por isso há inúmeros estudos que visam o seu controle no campo (TOURE, et al., 2020).

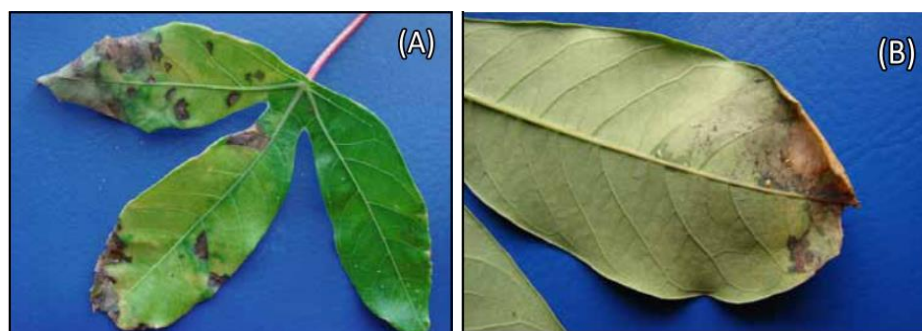
## **2. Bacteriose da mandioca.**

A bacteriose da mandioca (CBB) é uma doença bacteriana que atinge a parte aérea da planta. Atualmente, encontra-se difundida mundialmente e é tida como uma das principais doenças bacterianas devido os prejuízos significativos causados à cultura (MORA, et al., 2019). O agente causal da doença é a *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), bactéria Gram negativa, monoflagelada, de comportamento epífita e sistêmico (BOTERO, et al., 2020). Apesar de se tratar de uma bactéria pertencente ao gênero *Xanthomonas*, a mesma produz colônias hialinas sem a pigmentação amarela típica do gênero (FARNOU, et al., 2018; VERDIER, 2012).

A principal forma de entrada do patógeno em plantas sadias se dá por aberturas naturais como estômatos e hidatódios e aberturas não naturais oriundas de feridas (ANTOINE, et al., 2017). Nos primeiros estágios da infecção, o patógeno assume comportamento endofítico nos tecidos foliares, colonizando feixes vasculares das folhas e até mesmo vasos condutores como o xilema, podendo sobreviver nestes por 6 meses (BOTERO, et al., 2020; VÉRDIER, 2012). O patógeno pode colonizar a planta sem manifestação de sintomas, passando a apresentar sintomatologia quando ocorrem condições ambientais favoráveis como climas úmidos e temperaturas entre 22°C e 30°C (ISHIDA, et al., 2016).

A doença pode se manifestar de duas formas, a sistêmica e não sistêmica (GOMES, 2005). A forma sistêmica é característica do plantio de material contaminado, onde nestes há dificuldade de germinação, murcha das folhas novas e morte descendente das plantas ainda em estágio de muda (VÉRDIER, 2012). A forma não sistêmica é muito comum na planta desenvolvida que contrai a doença no campo no início da infecção e é comum o surgimento de pequenas manchas foliares com aspecto aquoso e angulares, e na medida que a doença se desenvolve, estas fundem-se e ocupam toda a lâmina foliar (ISHIDA, et al., 2016). Ao longo do desenvolvimento da doença é comum que as folhas atacadas sequem e se destaquem da planta e em momentos mais avançados da infecção, é muito comum a gomose presente em hastes e nos pecíolos infectados (KEMP, et al., 2004).

A bactéria se move sistematicamente na planta infectado por diferentes tecidos e em estágios mais avançados da doença coloniza vasos condutores como o Xilema (FARNOU, et al., 2018). Em casos que a doença ocorre em consequência da presença do patógeno nas manivas e em variedades altamente susceptíveis as raízes podem ser infectadas exibindo descolorações dos feixes vasculares e apodrecimento (RUBIO, et al., 2017).



**Figura 1.** Sintomas característicos da infecção por bacteriose. (A) Lesões angulares com presença anasarca (encharcamento), características do início da infecção. (B) Requeima das folhas, de formato irregular, característico de estágios mais avançados da doença (PERUCH, et al., 2013).

São relatados diferentes níveis de agressividade em isolados de *Xpm* (BOTERO, et al., 2020). Vários mecanismos moleculares podem implicar nesta variação de sintomas, como ação lítica da bactéria, níveis de metabolismos de matriz

extracelular, capacidade de motilidade inferida pelos flagelos, entre outros (BOTERO, et al., 2020).

A produção de exopolissacarídeos (EPS) são fundamentais para permitir que a bactéria propague a infecção pelos tecidos. Estes são os principais componentes da matriz extracelular sendo compostos majoritariamente por diferentes sacarídeos e proteínas (GRAMMBITTER; et al., 2019). A constituição da matriz extracelular da *Xpm* se distingue de vários indivíduos do gênero *Xanthomonas*, visto que esta bactéria não produz xantomonadina, uma molécula orgânica de tom amarelado insolúvel em água e que agrega resistência à matriz (HE, et al, 2020). Em *Xpm* é relatado que os genes associados à síntese de EPS estão diretamente associados à modulação de genes de patogenicidade, assim, a síntese de EPS é essencial para o estabelecimento da infecção (RESTREPO, et al., 2000). A matriz extracelular durante a entrada do patógeno na célula vegetal forma uma espécie de arcabouço na qual uma serie de toxinas e enzimas atuam rompendo a parede e membrana celular. Além disto, a mesma protege o patógeno de eventuais respostas da planta contra ele mesmo (KEMP, et al., 2004).

O gênero *Xanthomonas* possui regiões genéticas conservadas responsáveis pela tolerância às respostas imunes inatas das plantas. Este conjunto de genes associados à patogenicidade são regulados pelo *Quorum Sensing* (QS) (BOTERO, et al., 2020). O 'QS' regula genes associados à produção de toxinas, enzimas extracelulares, produção de EPS e a síntese flagelar e que quando presente em uma cepa bacteriana, agrega à mesma, capacidade de resistência ao estresse oxidativo e moléculas de defesa da planta (KEMP, et al., 2004). Além de acionar mecanismos fundamentais para o estabelecimento da infecção, o QS Pode regular de forma negativa genes de reposta da planta, assim há a supressão da resposta imune efetora ao transloucar para a interior célula do hospedeiro proteínas efetoras (DÍAZ-TATIS, et al., 2004).

O outro fator de patogenicidade altamente conservado no gênero *Xanthomonas* são os efetores semelhantes a ativadores de transcrição (TALEs) (RODRIGUEZ-MORENO, et al., 2017). Os TALEs atuam como fatores de transcrição para genes específicos da planta e quando injetados no meio intracelular e consecutivamente para o núcleo e modificam a expressão de genes do hospedeiro (MORA, et al., 2019).

As modificações acionadas pelos TALEs são fundamentais na mobilização das reservas energéticas das plantas que passam a transportar de forma apoplástica a sacarose, tornando os carboidratos mais disponíveis para a *Xpm* (RODRIGUEZ-MORENO, et al., 2017).

Similar aos TALEs, a *Xpm* possui outro fator de virulência bastante conservado, que é o sistema secreto tipo IV (T6SS). Este sistema secretor possui diferentes papéis e produz várias proteínas efetoras na célula vegetal que podem desencadear inúmeros eventos, como supressão de resposta contra patógeno, mobilização de tecidos de reserva energética e indução de respostas a outros organismos hospedeiros presentes nas plantas (BENAVIDES, et al., 2021). Este sistema também permite a comunicação entre as células do patógeno e as sequências gênicas associadas a este sistema, contem em *Xpm* 15 componentes altamente conservados (MEDINA, et al., 2017).

A principal forma de transmissão da doença se dá pela dispersão de células bacterianas pela ação de gotas de água ao se chocarem contra tecidos infectados, sobretudo, nas folhas (BOHER, et al, 1997). A gomose expelida por fissuras no caule, também possui grande potencial infectante devido à grande concentração de células da bactéria (YODEE, et al., 2018). Outra forma importante de disseminação da doença se dá pelo manejo sem o controle fitossanitário adequado e pelo cultivo de manivas infectadas, e em casos mais isolados, por insetos (VÉRDIER, 2012). Outro fator considerável associado à manutenção da doença no campo, é a resistência da bactéria no meio ambiente, podendo sobreviver por até 90 dias no solo (ISHIDA, et al., 2016). A versatilidade da bactéria é um dos principais desafios no que diz respeito ao combate à bacteriose.

### **3. Manejo da bacteriose da mandioca**

Atualmente não existem tratamentos curativos para a CBB, assim, a principal forma de controle da bacteriose é pelo uso de variedades resistentes associado a boas práticas fitossanitárias e retirada de plantas ou parte destas com sintomas da doença. Tais práticas quando associadas, podem reduzir as perdas em até 80% (LÓPEZ, et al., 2012; RUBIO, et al., 2017). Características fenotípicas como tamanho

da abertura dos estômatos, nível de desenvolvimento foliar, depósitos de lignina, entre outros, são fatores consideráveis para a resistência da mandioca contra a CBB (WYDRA, et al., 2004).

As plantas normalmente possuem defesas pré-formadas contra os patógenos, que são basicamente barreiras físicas e químicas que impedem ou atenuam inicialmente os efeitos da infecção (JONES, et al., 2006). Este tipo de defesa, como o nome sugere, não é ativado pela presença do patógeno e já é um ente comum da fisiologia da planta. Um exemplo deste tipo de barreira é a composição da parede celular, que em variedades mais resistentes a patógenos biocidas, tende a ser mais grossa (MENEZES, 2009). A presença do acúmulo de cera na lamina celular e número de células guardas nas aberturas estomatais, são exemplos de mecanismos de defesa pré-formados que conseguem virtualmente evitar a infecção (JONES, et al., 2006).

Apesar de sugerirem ser respostas constantes, estas podem sofrer modulações pela expressão genica por estresses bióticos e abióticos. Um exemplo claro da modulação destas respostas provendo resistência em mandioca contra a CBB, são os estudos desenvolvidos por Li e equipe (2018) com proteínas DELLA. As proteínas DELLAs são repressoras da síntese do hormônio Giberelina (GA) e interagem com múltiplos fatores de transcrição modulando também a síntese de outro hormônio, o Ácido abscísico (LI, et al., 2018). Além de ser promotor da germinação e crescimento foliar, vários estudos sugerem que o GA está associado em resposta de estresse abiótico e biótico (TAN, et al., 2014). Em plantas que tiveram os genes da proteína DELLA suprimidos, foi relatado que houve uma superexpressão do Ácido salicílico e silenciamento do Jasmonato, e com isso as plantas tornaram-se mais resistentes a patógenos bacterianos e susceptíveis a patógenos fúngicos (NAVARRO, et al., 2008). Outro fator interessante associado a estas proteínas é que plantas em que o gene MeDELLAs foi super expresso, apresentaram enrijecimento de parede celular, calose e super expressão de proteínas de resposta ao patógeno, evidenciando que este gene pode ser um fator positivo de resistência em mandioca contra a CBB (LI, et al., 2018)

Além destas respostas pré-formadas, as plantas possuem um sistema imune complexo e intricado, possibilitando diferentes respostas ao patógeno (JONES, et al., 2006). Ao ser infectada, a primeira resposta a ser acionada é a de hipersensibilidade

(HR). A resposta HR é local, sendo acionada nos momentos iniciais da infecção e consiste no isolamento do patógeno pela morte programada dos tecidos ao redor do local de infecção (FERNANDES, et al., 2009 WYDRA, et al., 2004). Essa resposta é fundamental nos primeiros momentos da infecção, pois isola o patógeno, impedindo sua propagação por tecidos saudáveis, e essa resposta pode ser acionada por diferentes fatores como toxinas, proteínas ou polissacarídeos liberados pelo patógeno (FERNANDES, et al., 2009). O precursor desta resposta se faz pela detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – pathogen-associated molecular patterns) por proteínas de membranas que são os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs – pattern recognition receptor) (DALIO, et al., 2017). Há também o acionamento de respostas mediadas por padrões moleculares associados a perigo (DAMPs – danger associated molecular patterns), estas oriundas de lesões do próprio hospedeiro (HOVATH, et al., 2007). As PRRs induzem à produção de moléculas de defesa como fitoalexinas e moléculas sinalizadoras como o Ácido salicílico, que é o principal promotor da resposta do tipo SAR (Resistência sistêmica adquirida) (GOYAL, et al., 2014).

A resposta do tipo SAR inclui a sintetização de agentes de defesa como as proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), que são, na sua maioria, enzimas hidrolíticas (FERNANDES, et al., 2009). As PRPs são um grande grupo variado de proteínas, que são respostas específicas da planta ao patógeno e embora de resposta mais tardia, é considerada bastante efetiva (RAMIREZ, et al., 2020). Apesar das respostas serem acionadas pelo processo infeccioso, estes agentes de defesa são mantidos em pequenas concentrações nos diversos tecidos vegetais, atuando contra possíveis novas infecções (JONES, et al., 2006). Este tipo de resposta além de ser acionada pela presença do patógeno, pode ser também modulada por alguns produtos químicos, como por exemplo, o Cloreto de mercúrio, bromo, Acidebenzolar-S-metil e Fosfito de cobre (SILVA, et al., 2008). A resposta do tipo SAR, também promove mudanças estruturais na planta, como depósitos de lignina e enrijecimento da parede celular. (FERNANDES, et al., 2009).

Outro tipo de resposta acionada pelas PRRs, são as respostas sistêmicas induzidas (ISR), que são mediadas pelas moléculas sinalizadoras etileno e jasmonato (CAVALCANTI, et al., 2005). Este tipo de resposta pode ser desencadeado por outros

fatores bióticos e abióticos. além dos organismos patogênicos (RUAN, 2019). A ISR pode induzir uma série de mecanismos moleculares e fisiológicos que visem inibir a propagação da infecção. Uma destas ações é a inibição da biossíntese da Rubisco, mobilização de reservas energéticas e acúmulo de moléculas de defesa como fitoalexinas (WASTERNACK, et al., 2013). Assim como a resposta do tipo SAR, esta pode ser acionada de forma artificial por substâncias químicas indutoras de respostas e pela microbiota presente no solo (BARBOSA, et al., 2007).

Além destas respostas que ocorrem em momentos pós infecção, as plantas ainda possuem outros mecanismos intracelulares de resistência como a superexpressão de enzimas redutoras do estresse oxidativo e enzimas de restrições, entre outros (LIU, et al., 2009). As enzimas de restrição são responsáveis por detectar e destruir material genético exógeno, que se mantidos, podem acarretar mudanças danosas à planta e favoráveis ao desenvolvimento da doença (RAMIREZ, et al., 2020). Apesar da eficácia no controle da CBB pelo uso de variedades resistentes, a cultura carece de protocolos para o combate à CBB com o uso de agentes químicos e biológicos, pois em alguns tipos de plantios não há controle quanto ao uso de variedades resistentes no cultivo (LÓPEZ, et al., 2012).

O Fosfito de cobre, que é um fertilizante foliar e indutor de resistência, demonstra eficácia contra doenças foliares pelo acionamento de defesas de respostas da planta contra o patógeno (PERUCH, et al., 2008). O Fosfito de cobre é um indutor de resistência, quando pulverizado diretamente sobre as folhas e ativa resposta imunes locais que levam à produção de moléculas de defesa como fitoalexinas, e por ser composto de íons cúpricos, se deposita nos tecidos diminuindo a capacidade de colonização futura do patógeno em tecidos da planta hospedeira (CARMONA, et al., 2019). Os íons cúpricos presentes na composição do Fosfito de cobre, também desempenham um papel secundário como inibidor de crescimento e além disso pode auxiliar no desenvolvimento foliar ao disponibilizar à planta, grandes quantidades de fósforo (PERUCH, et al., 2008).

Esses indutores de resistência são utilizados em diversas culturas para o controle de várias doenças, pois possuem uma ação de largo espectro e não interferem sobre a microbiota do ambiente, evitando a seleção e o possível surgimento de organismos potencialmente patogênicos (CAVALCANTI, et al. 2006). Outro indutor

de resistência da planta largamente utilizado, é o Acibenzolar-S-Metílico (ASM), conhecido comercialmente como BION (PERUCH, et al., 2008). O ASM é uma molécula similar ao Ácido Salicílico e atua na planta ativando respostas do tipo SAR) aumentando com isto, o acúmulo de PRPs (BIANCHI, et al., 2019). O ASM é utilizado em inúmeras culturas e nas mais diversas doenças pelo fato de desencadear uma resposta de proteção sistêmica na planta (DALLAGNOL et al., 2005). O seu uso vem crescendo nos últimos anos em diversas culturas devido a sua pouca interferência com a microbiota componente do meio e ao contrário dos controles químicos, este não causa pressão seletiva, que leva ao surgimento de microrganismos mais resistentes (LOON, et al., 2001).

Outra abordagem que pode ser utilizada contra a CBB são os controles químicos (LIMA, et al., 2015). A CBB é uma doença bastante conhecida, no entanto abordagens com controles químicos ainda são bastante escassos (TREMACOLDI, 2014). O controle químico ideal é aquele que promove baixa toxicidade, estabilidade no meio ambiente e ação de biocida de largo espectro (HIROOKA, et al. 2013). Os controles químicos podem atuar diretamente sobre o patógeno resultando no decréscimo de sua população, podem inibir toxinas diminuindo sua patogenicidade e podem atuar sobre organismos oportunistas, reduzindo assim, a severidade da doença (HIROOKA, et al., 2013).

Os controles químicos baseados em soluções de íons metálicos são utilizados há anos e um bom exemplo deste é a calda bordalesa, composta pela mistura de cal hidratada e sulfato de cobre (ROLANDO, et al., 2019). Os íons metálicos, principalmente os íons cúpricos, atuam de diversas formas sobre microrganismos, destruindo sua parede celular, reduzindo e oxidando biomoléculas e inibindo ações enzimáticas (DONG, et al., 2020). Compostos envolvendo estes íons ainda apresentam como característica o acúmulo em tecidos da planta resultando em uma ação protetora, No entanto, em grandes doses, podem promover manchas, principalmente em tecidos fotossintetizantes (DONALD, et al., 1992). No mercado atualmente existem vários produtos comerciais deste tipo e a sua difusão deve-se a seu preço acessivo, baixa toxicidade quando comparado a agentes orgânicos e grande estabilidade no meio ambiente diminuindo a necessidade de sucessivas aplicações (LA TORRE, et al, 2018).



Um destes controles químicos é o Oxiclureto de cobre, largamente utilizado em doenças fúngicas e bacterianas, como por exemplo, o míldio da videira (*Plasmopara vitícola*) (PERUCH, et al., 2008). Apesar de ser considerado um antifúngico, o Oxiclureto de cobre também é indicado para o tratamento de infecções bacterianas, principalmente do gênero *Pseudomonas*. (DONALD, et al. 1992). Quanto ao uso contra a CBB, este possui duas ações de interesse, a primeira, sua ação biocida, atuando diretamente sobre o crescimento da população de *Xpm* e a outra é por meio da diminuição da população de organismos oportunistas (ROLANDO, et al., 2020). O Oxiclureto de cobre é classificado como um fungicida de largo espectro e estudos indicam que ele atua diretamente na oxidação das paredes de quitina do fungo, levando assim à degradação desta. No entanto, dos sais cúpricos mais utilizados, este apresenta uma das maiores fitotoxicidade (GOES, et al., 2004).

Outro controle químico de largo espectro e utilizado no manejo de doenças em diversas culturas é o Sulfato de cobre; um sal cúprico que devido a seu alto grau de dissociação, libera grandes doses de íons cúpricos (CAVALCANTI, et al., 2006). Devido à alta solubilidade em água, os íons cúpricos são facilmente lixiviados e permanecem pouco sobre os tecidos da planta. No entanto, pela sua difusão, este é capaz de cobrir de forma plena os tecidos da planta (LA TORRE, et al., 2018).

Com um novo panorama quanto a agricultura, o uso de agentes de controle biológico vêm ganhando espaço, sobretudo, pelas suas qualidades que são, baixa toxicidade, baixo custo a longo prazo, menores riscos ambientais dentre outros (SUN, et al., 2019). Um bom agente biológico é aquele que atua diretamente sobre o patógeno, seja no meio ambiente, ou nos tecidos da planta, ou indiretamente por meio do fornecimento de fatores de crescimento e nutrientes e ativação de mecanismos de defesa (ALABOUVETTE, et al., 2006).

Além destas características, um microrganismo utilizado como controle biológico não deve apresentar riscos à planta nem se comportar como organismo oportunista durante uma infecção (ALABOUVETTE, et al., 2006). Em relação à CBB, alguns estudos revelaram o comportamento de antagonismo da bactéria *Pseudomonas putida* quando pulverizadas sobre as folhas da mandioca (VÉRDIER, et al. 2012). Existem vários estudos que corroboram com a eficiência de bactérias do gênero *Bacillus* spp. como agentes de controle biológico nas mais diversas doenças

(RAIS, et al., 2017). Os *Bacillus* spp. são muito eficientes contra patógenos com tropismo por tecidos radiculares e inibem o crescimento de organismos patogênicos ao colonizarem a rizosfera (AHMED, et al., 2003). Os *Bacillus* spp. promovem modificações na rizosfera, liberam enzimas bacteriostáticas, suprem necessidades nutricionais da planta e fornecem fatores de crescimento, tornando-se essenciais para o sucesso no controle das mais variadas doenças (FIRA, et al., 2018).

### **3. 1 Seleção de indivíduos resistentes.**

A seleção de indivíduos resistentes é ainda majoritariamente baseada em ensaios de resistência convencionais (SU, et al., 2019). Um bom ensaio de resistência é aquele que é confiável e consistente quanto aos seus resultados, reprodutível, de fácil aplicação e que possa ser aplicado a qualquer estágio de desenvolvimento da doença (OLIVEIRA, et al., 2016). Existem várias abordagens e estratégias para se identificar fonte de resistência contra um determinado patógeno (SVÁBOVÁ, et al., 2004). Estas estratégias devem se basear nas características da cultura e sobretudo nas características do patógeno (SVÁBOVÁ, et al., 2004).

Estes ensaios são baseados no cultivo de plantas em ambientes controlados, como casa de vegetação ou em campo, onde as plantas são infectadas e o desenvolvimento da doença é analisado e quantificado (OLIVEIRA, et al., 2016). Neste tipo de ensaio as plantas ficam expostas às mais diferentes variáveis, como a microbiota do solo, mudanças de temperatura e umidade e diferenças de clima (BOTERO, et al., 2020). Estes ensaios baseiam-se na mensuração da sintomatologia desenvolvida pela planta, na apresentação fenotípica e comportamento fisiológico, dando-se notas que podem determinar o quão resistente é uma variável contra um patógeno (FISCHER, et al., 2005).

Com o progresso das ferramentas moleculares surgiram novas abordagens para se avaliar a resistência de plantas contra doenças, onde o foco passa a ser análise de genótipos e expressão gênica de plantas submetidas a uma determinada doença (ARINAITWE, et al., 2018). A identificação de genes candidatos para resistência, norteia cada vez mais as práticas de melhoramento em plantas (GURURANI, et al., 2012).

A melhor forma de analisar o comportamento de possíveis genes candidatos é avaliar se estes são responsáveis por mecanismos de resistência em plantas. Uma das formas dessa avaliação é por meio de ensaios de RT-qPCR (LOPEZ, et al, 2005). Atualmente, técnicas de RT-qPCR são fundamentais para o esclarecer a maquinaria biomolecular por trás da resistência vegetal por meio da avaliação de níveis de transcrição de diferentes genes associados a resistência traçam perfis genômicos interessantes que colaboram com o controle de doenças vegetais (GURURANI, et al., 2012).

A compreensão dos genes envolvidos na resistência de variedades de plantas a doenças possibilita a aplicação de outras metodologias a fim de se identificar a presença deles nas diferentes variedades de uma espécie permitindo que a determinação de resistência seja mais prática (RAMIREZ, et al., 2020). Uso de marcadores moleculares são indicados para avaliação do componente gênico de resistência em diferentes variedades de uma mesma espécie. Em seus estudos com o vírus do enrolamento da folha amarela do tomate (TYLCV), Nevame e equipe (2018) desenvolveram marcadores baseados em genes de resistência (TY) para analisar a presença em 36 variedades de tomateiro tidas como resistente ao vírus. Este gene presente em variedades selvagens de tomate como *Solanum pennellii* e *Solanum chilense* é determinado como fator de resistência ao vírus TYLCV (NEVAME, et al., 2018). Neste estudo, 88% das variedades resistentes apresentaram o gene TY, indicando assim que o uso desse marcador é adequado para a seleção de variedades potencialmente resistentes ao TYLCV (NEVAME, et al., 2018).

A criação de bancos genéticos compostos por genes associados à resistência possibilitará num futuro próximo na predição de forma ampla e mais assertiva a resistência contra doenças em plantas (SU, et al., 2019). A criação destes bancos permitirá também novas abordagens baseadas em transgenia e edição gênica em plantas, a fim de se estudar e acompanhar a evolução patógeno-planta na busca da superação das plantas ao ataque de patógenos mais virulentos (XU, et al., 2017).

O controle das doenças perpassa por inúmeras técnicas e mecanismos que atendem diversos interesses socioeconômicos. O uso de variedades resistentes ainda

se mostra como a abordagem mais eficaz para o controle da CBB. No entanto, o uso dessas variedades com outros tipos de controles como indutores de resistência, controles químicos e controles biológicos, aparece como uma estratégia interessante e que pode atender diferentes nichos de produção da mandioca.

## REFERÊNCIAS.

ALABOUVETTE, C.; OLIVAIN, C.; STEINBERG, C. Biological plant diseases: The European situation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 114, n. 3, p. 329–341, 2006. DOI.10.1007/s10658-005-0233-0.

ALVAREZ, E.; LOZANO, J. Characteristics of cassava resistance to superelongation disease (*Elsinoë brasiliensis*). **Tropical Pest Management**, v.29, n. 2, p. 148–158, 1983. DOI.10.1080/09670878309370791.

ALVES, L.; FELIPE, F.; PEREIRA, J. Análise perspectiva do mercado de mandioca elaborado pelo CEPEA. **Centro de estudos avançados em economia aplicada – USP**. Disponível em < [www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/mandioca-perspec-2019-tamanho-da-oferta-e-precos-menores-preocupam.aspx](http://www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/mandioca-perspec-2019-tamanho-da-oferta-e-precos-menores-preocupam.aspx) >

ANAND, M.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C.; NOOKARAJU, A. Physiological and Molecular Plant pathology plant disease resistance genes : current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 51–65, 2012. DOI.org/10.1016/j.pmpp.2012.01.002.

BENAVIDES, N.; ALVAREZ, A.; ORTIZ, M.; LUIS, R.; BOTERO, D. The type VI secretion system of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* is involved in virulence and *in vitro* motility. **BMC Microbiology**. v. 21, n. 14, p, 2-12, 2021. DOI.org/10.1186/s12866-020-02066-1

BOHER, B.; NICOLE, M.; POTIN, M. Extracellular polysaccharides from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* interact with cassava cell walls during pathogenesis. **The American Phytopathological Society**. v. 10, n. 7, pg. 803-811, 1997. Disponível em: <[apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/MPMI.1997.10.7.803](http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/MPMI.1997.10.7.803) >

BOTERO, D.; MONK, J.; CUBILLOS, M.; CUBILLOS, A.; RESTREPO, M.; BERNAL-GALEANO, V.; REYES, A. Genome-Scale Metabolic Model of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*: an approach to elucidate pathogenicity at the metabolic level (2020). **Frontiers in genetics**. v.11, n. 837, 2020, DOI.10.3389/fgene.2020.00837 Edited

BUSTIN, A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology, Bristol**, v. 25, p.169-193, 2000.

COÊLHO, J. Produção de Mandioca – Raiz, Farinha e Fécula (2019). **Caderno setorial do escritório Técnico de Estudos econômicos do Nordeste (ETENE)**. Ano 4, n. 102, 2019. Disponível em < [www.bnb.gov.br/documents/80223/6144862/102\\_Mandioca.pdf](http://www.bnb.gov.br/documents/80223/6144862/102_Mandioca.pdf) > .

CONSELHO NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) Mandioca, **Análise Mensal, Abril 2019**. Disponível em: <[www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-mandioca](http://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-mandioca)>

CARMONA, M.; SAUTUA, F.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, O. Copper phosphite enhances efficacy of a strobilurin-triazole fungicide in controlling late season foliar diseases of soybean. **Crop Protection**. v., 115, pg. 130-734, 2019. DOI.org/10.1016/j.cropro.2018.09.019.

COSTA, C. N. M.; BRÍGIDA, A. B. S.; BORGES, B. N, MENEZES NETO, M. A. DE; CARVALHO, L. J. C. B; DE SOUZA, C. R. B. Levels of MeLEA3, a cDNA sequence coding for © atypical late embryogenesis abundant protein in cassava, increase under *in vitro* salt stress. **Treatment Plant Molecular Biology Repórter**, n 29, pg. 997-7005, 2011. DOI.10.1007/s11105-011-0292-7..

DA SILVA, H.; MURRIETA, R.. Mandioca, a rainha do Brasil? Ascensão e queda da manihot esculenta no estado de São Paulo. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi:Ciencias Humanas**, v. 9, n. 1, p. 37–60, 2014. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/bgoeldi/v9n 1/04.pdf >

DALIO, R.; MAGALHÃES, D.; RODRIGUES, C.; ARENA, G.; OLIVEIRA, T.; SOUZA-NETO, R.; PICCHI, S.; MARTINS, P. PAMPs, PRRs, effectors and R-genes associated with citrus–pathogen interactions. **Annals of Botany**. v. 119, p. 749-774, 2017.

DALLAGNOL, L.; NAVARINI, L.; UGALDE, M.; BALARDINI, R.; CATELLAM, R. Utilização de Acibenzolar-S-Methyl para Controle de Doenças Foliaves da Soja (2006). **Summa Phytopathologica**. n. 3, v. 32, pg. 255-259, 2006. Disponível em: </www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0100-54052006000300007 >.

DÍAZ-TATIS, Paula; BELTRÁN, César; GIRALDO, Adriana; CARRASCAL, Camilo. HPAF de *Xanthomonas axonopodis* PV. *manihotis* regula negativamente genes relacionados con metabolismo y defensa en hojas de yuca (2014). **Actualidades Biológicas**. n. 102, v. 37, 2014, disponível em<www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\_abstract&pid=S0304-35842015000100001&lng=pt >

DONG, Hongqiang; XIONG, Renci; LIANG, You; TANG, Gang; YANG, Jiale; TANG, Jingyue. NIU, Junfan; GAO, Yunhao; ZHOU, Zhiyuan; CAO, Yongsong. Development of glycine-copper(II) hydroxide nanoparticles with improved biosafety for sustainable plant disease management (2020). **Royal Society of Chemistry**. n. 10, pg 222-227, 2020. doi.10.1039/D0RA02050H

DOS SANTOS, Hellen; PRIA, Maristella; SILVA, Olavo; MAY-DE-MIO, Louise. Phosphites and acibenzolar-S-methyl alone and combined with fungicides for the control of biotrophic pathogens of wheat (2018). **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 2, p. 132–136, 2018. Doi:10.1590/0100-5405/2213.

FANCINCANI, Agda; MOREIRA, Leandro; SOARES, Márcia; FERREIRA, Cristiano; FERREIRA, Rafael; FERRO, Maria; FERRO, Jesus; GOZZO, Fabio, OLIVEIRA, Julio. Comparative proteomic analysis reveals that T3SS, Tfp, and xanthan gum are key factors in initial stages of *Citrus sinensis* infection by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (2014). **Function Integrated Genomics**. v. 14, n. 2, p. 205 – 217, 2014.

FANOU, André; WYDRA, Kerstin; VALERIEN, Zinsou. Cassava Bacterial Blight: A Devastating Disease of Cassava (2018). **Intech**. v.12, n. 24, 2018. doi.org/10.5772/intechopen.71527

FERNANDES, Clérberson; VIEIRA, José; SILVA, Domingos; REIS, Nidiane; ANTUNES, Hildebrando. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos 2009. **Documentos Embrapa**. n. 133, 2009. Disponível em: < [www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/710939/1/133fitopatogenos.pdf](http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/710939/1/133fitopatogenos.pdf)

FAOSTAT. Produção, Área Colhida e Produtividade de Mandioca no Mundo. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em 27 nov. 2019.

FILHO, Armando; KIMATI, Hitoshi, AMORIM, Lilian Manual de Fitopatologia volume 1: Princípios e Conceitos(1995). **Ceres**. V.1, n. 4, 1995.

FILHO, Washington; SILVEIRA, Gabriel, Cultura da Mandioca, (2012) **Informe digital da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural – Minas Gerais** (2012), Pg. 6-72. Disponível em:< [www.emater.mg.gov.br/doc/site/serevicoesprodutos/livraria/Culturas/Cultura%20da%20Mandioca.pdf](http://www.emater.mg.gov.br/doc/site/serevicoesprodutos/livraria/Culturas/Cultura%20da%20Mandioca.pdf)

GINZINGER, David. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream (2002). **Experimental Hematology**. n. 6, v. 30, p. 503-512. doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00806-8.

GOES, Antonio; MARTINS, Ricardo; REIS, Renato. Efeito de fungicidas cúpricos, aplicados isoladamente ou em combinação com mancozeb, na expressão de sintomas de fitotoxicidade e controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em goiabeira (2004). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 26, n. 2, pg. 237-240, 2004. Disponível em: <[www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0100-29452004000200014&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100-29452004000200014&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)>.

GONZALEZ, Carolina; RESTREPO, Silva; TOHME, Joe. 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.

GOMES, Carlos. Bacteriose da mandioca. **Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, 2005. 1 folder.

GROXKO, Methodio. Mandioca: Análise de Conjuntura (2019). **Departamento de Economia Rural do Estado do Paraná (DERAL-PR)**. Disponível em < [http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/aLogRQuivos\\_restritos/files/documento/2019-72/Mandioca%202020.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/aLogRQuivos_restritos/files/documento/2019-72/Mandioca%202020.pdf) >.

GURURANI, Mayank; VENKATESH, Jelli; UPADHYAY, Chandrama; NOOKARAJU, Akula; PANDEY, Shashank; PARK, Se; Plant disease resistance genes: Current status and future directions (2012). **Physiological and Molecular Plant Pathology**. n. 78, p. 51-65, 2012.. doi:10.1016/j.pmpp.2012.01.002

HAHN, Simon. Breeding cassava for resistance to bacterial blight (1978). **Pans**, v. 24, n. 4, p. 480–485, 1978. Doi:10.1080/09670877809414141.

HIROOKA, Takashi; ISHII, Hideo. Chemical 39biológico39 plant diseases(2013). **Journal of General Plant Pathology**, v. 79, n. 6, p. 390–401, 2013, doi:10.1007/s10327-013-0470-6.

HE, Ya; CAO, Xue; POPLAWSKY, Alan. Chemical Structure, Biological Roles, Biosynthesis and Regulation of the Yellow Xanthomonadin Pigments in the Phytopathogenic Genus *Xanthomonas* (2020). **The American Phytopathological society**. v. 33, n. 5, p.705-714. Doi.org/10.1094/MPMI-11-19-0326-CR

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema de Recuperação Automática de Dados (SIDRA). Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em: 28 nov. 2019.

ISHIDA, Alessandra; CARDOSO, Sandra; ALMEIDA, Crislayne; NORONHA, Aloyséia; CUNHA, Elisa. Incidência da Bacteriose da Mandioca (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*) no Estado do Pará (2016). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (EMBRAPA)**. N. 105, 2016. Disponível em < [www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1052640/incidencia-da-bacteriose-da-mandioca-xanthomonas-axonopodis-pv-manihotis-no-estado-do-para](http://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1052640/incidencia-da-bacteriose-da-mandioca-xanthomonas-axonopodis-pv-manihotis-no-estado-do-para) >

ISHIGA, Takako; LIDA, Yumi; SAKATA, Nanami; UGAJIN, Tsutomu; HIRATA, Tetsuya; TANIGUCHI, Shizuku. Acibenzolar-S-methyl activates stomatal-based defense against *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* in cabbage(2020). **Journal of General Plant Pathology**. n. 86, p. 48-54, 2020. Doi.org/10.1007/s10327-019-00883-5

JONES, Jonathan; DANG, Jeffery. The Plant immune system (2006). **Nature**. v. 444, n. 16, 2006. Doi:10.1038/nature05286.

KEMP, Benjamin, HORNE, Jennifer, BRYANT, Alan, COOPER, Richard. *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* gumD gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*) (2004). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 64, n. 4, p. 209–218, 2004, doi:10.1016/j.pmp.2004.08.007.

KUNWAR, Sanju; PARET, Mathews; FREEMAN, Joshua; RITCHIE, Laura. Foliar applications of acibenzolar-s-methyl negatively affect the yield of grafted 40iológic in fields infested with *Ralstonia solanacearum* (2017). **Plant Disease**, v. 101, n. 6, p. 890–894, 2017. Doi:10.1094/PDIS-03-76-0331-RE.

LA TORRE, Anna; IOVINO, Valéria; CARADONIA, Federica. Copper in plant protection: current situation and prospects (2018). **Phytopathologia Mediterranea**. v.57, n. 2, p. 201-236, 2018. Doi:10.1111/j.201-236X.3404.00722.x.

LÓZANO, Juan. Biocontrol of cassava pathogens: A useful approach (1987). **Coleção histórica do centro Internacional de Agricultura Tropical**. Disponível em:<[cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/71838/30086.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/71838/30086.pdf?sequence=1&isAllowed=y) >

LI, Xiaolin; LIU, Wen; LI, Bing; LIU, Guoyin; WEI, Yunxie; HE, Chaozu; SHI, Haitao. Identification and functional analysis of cassava DELLA proteins in plant disease resistance against cassava bacterial blight (2018). **Plant Physiology and Biochemistry**. n. 124, p. 70-76, 2018. Doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.022 Re

LIMA, Aline; MOURA, Elisa, ISHIDA, Alessandra; PEREIRA, Angelo; REIS, Sávio; SOUZA, Cláudia. Expression profiles of defense genes in cassava storage roots upon exposure to *Phytophthium* sp., causal 40iológ of soft root rot disease(2018).



**Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.104, n. 27 p.23–30, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pmp.2018.09.001>>.

LIMA, Cleene; MONTENEGRO, Abelardo; DOS SANTOS, Thais; ANDRADE, Eunice; MONTEIRO, Adriano. Práticas agrícolas no cultivo da mandioca e suas relações com o escoamento superficial, perdas de solo e água (2015). **Revista ciência agrônômica**. v. 46, n. 4, p. 697-706, 2015. doi.org/10.5935/1806-6690.20150056.

LI, Xiaolin; LIU, Wen; LI, Bing; LIU, Guoyin; WEI, Yunxie; HE, Chaozu; SHI, Haitao. Plant Physiology and Biochemistry Identification and functional analysis of cassava DELLA proteins in plant disease resistance against cassava bacterial blight (2018). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 124, n. 9, p. 70–76, 2018. doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.022

LIU, Ke; NEWMAN, Molli, MCLNROY, Jhon; HUI HU, Chia. Selection and assessment of plant growth-promoting rhizobacteria for biological control of multiple plant diseases (2016). **Phytopathology**. v. 107, p. 928-936, 2016. Doi.org/10.1094/PHTO-02-17-0051-R

LOPEZ, Camilo; SOTO, Mauricio; RASTREPO, Silvia; PIÉGU, Benoit; COOKE, Richard. Gene 41biológico4141 profile in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* infection in cassava using a cDNA microarray(2005). **Plant Molecular Biology**, v. 57, n. 3, p. 393–410, 2005. Doi:10.1007/s11103-004-7819-3.

LOZANO, Joan. Bacterial blight of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Colombia: etiology (1972), **epidemiology and control**. V. 12, n. 7, p. 419 -427, 1972.

LOZANO, Juan. A Cassava Bacterial Blight: A manageable Disease (1986). **The American Phytopathological Society**. v. 70, n. 12, 1986. Disponível em <[https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1986Articles/PlantDisease70n12\\_1089.PDF](https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1986Articles/PlantDisease70n12_1089.PDF) >

MACCALUM, Emily; AJANAPPA, Ravi; GRUISSEM, Wilhelm. Tackling agriculturally relevant diseases in the staple crop cassava (*Manihot esculenta*) (2017). **Plant Biology**. v. 38, p. 50-58, 2017. )

MACKAY, Ian. Real-time PCR in the microbiology laboratory(2004). **Clinical Microbiology and Infection**. V. 10, n. 3, p. 190–212, 2004. Doi:10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x.

MATSUMOTO, Kazum; Barbosa, Maria; SOUZA, Leandro; TEIXEIRA, Joyce. *In vitro* selection for resistance to Fusarium wilt in Banana (2004). **Mass screening techniques for selecting crops resistant to diseases – Nuclear Techniques in Food and Agriculture**. c. 6, p. 101-109, 2004. Disponível em:<[/www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/881021/1/TDL001websplitmerge.pdf](http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/881021/1/TDL001websplitmerge.pdf)>

MATTOS, Pedro; FARIAS, Alba; FILHO, José. O produtor pergunta, a Embrapa responde, Mandioca. **Embrapa Informação Tecnológica**. (2006); Disponível em: <[www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/busca-de-publicacoes/-publicacao/643719/mandioca-o-produtor-pergunta-a-embrapa-responde](http://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/busca-de-publicacoes/-publicacao/643719/mandioca-o-produtor-pergunta-a-embrapa-responde)>.

MEJIA, Cindy; FARFÁN, Diana; MONTANA, José; RESTREPO, Silvia; JIMÉNEZ, Pedro; DANIES, Giovanna; BOCANEGRA, María. Acibenzolar-S-methyl induces protection against the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) (2021). **Journal of Plant Diseases and Protection**. v.12, n. 125, p.112-125, 2021. doi.org/10.1007/s41348-021-00427-0

MELO, Rita; BRAGANÇA, Carlos; PESTANA, Kátia; SILVA, Harllen; FERREIRA, Cláudia; OLIVEIRA, Saulo. Improvement of the specific detection of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* based on the pthB gene. **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 41, pg. 2-9. doi.org/10.4025/actasciagron.v41i1.42708.

MENEZES, Hércules. Imunidade inata e específica em plantas (2009). **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 30, n. 2, p. 195-212, 2009. Disponível em: < www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/4348 >

MODESTO, Moisés; ALVES, Raimundo. Cultura da Mandioca: Aspectos socioeconômicos, Sistemas de Cultivo, Manejo de Pragas e doenças e Agroindústria (2016). **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em < https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/150261/1/LV-Mandioca-cap14.pdf >

MONTEIRO, Luiz; FERNANDES; RESENDE, Mario; COSTA, Bruno; DIAS, Henrique, VILLELA, Gláucia. Ativador de resistência ASM (BION) no CONTROLE DA FERRUGEM (*Hemileia vastatrix*) na cultura do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em campo (2008). **VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil 2008**. Disponível em <www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/2699/304.pdf>.

MORA, Ruben; RODRIGUEZ, Maria; GAYOSSO, Luis; LÓPEZ, Camilo. Using *in vitro* plants to study the cassava response to *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* infection (2019). **Tropical Plant Pathology**. v.44, pg. 423-429, 2019. doi.org/10.1007/s40858-019-00296-x.

MORGANTE, Carolina; BLAWID, Rosana. Análise da Expressão Gênica pela Técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real: Princípios e Fundamentos (2016). **Documentos EMBRAPA Semiárido**, n. 63, 2016. Disponível em: < ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/157145/1/SDC278.pdf >.

NEVAME, Adedze; XIA, Lu; NCHONGBOH, Chofong. Development of a new molecular marker for the resistance to tomato yellow leaf curl virus (2018). **BioMed Research International**. v. 2018, Article ID 8120281, 10 páginas. doi.org/10.1155/2018/8120281

OGUNJOBI, Adeniyi ; DIXON, Adaniel; FAGADE, Obasola. E. Molecular genetic study of cassava bacterial blight causal pathogen in Nigeria using random amplified polymorphic DNA(2007). **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, n. 9, p. 2364–2376, 2007. Disponível em < https://www.researchgate.net/publication/266582895 >.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO (FAO); **Por fazer Mais com Menos** (2013). Disponível em /www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/pt/index.html#:~:text=Como%20o%20modelo%20agrícola%20“Produzir, produção%20e%20aumentar%20sua%20renda.

OLIVEIRA, Saulo; DA SILVA, Marconde; RANGEL, Marco; SANTOS, Vanderlei; RINENBERG, Rudiney; OLIVEIRA, Eder. MetodoLog ia para avaliação da resistência da mandioca à bacteriose, antracnose e superalongamento (2016). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (EMBRAPA)**. N. 78, 2016. Disponível em:< <https://www.researchgate.net/publication/307557901>>.

OLIVEIRA, Saulo; DA SILVA, Marconde; RANGEL, Marco; SANTOS, Vanderlei; RINENBERG, Rudiney; OLIVEIRA, Eder. MetodoLog ia avaliação rápida de genótipos de mandioca quanto a resistência à bacteriose, antracnose e superalongamento (2015). **Anáís do 16º congresso brasileiro de mandioca**. 2015. Disponível em : < [www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1030690/metodoLog\\_ia-avaliacao-rapida-de-genotipos-de-mandioca-quanto-a-resistencia-a-bacteriose-antracnose-e-superalongamento](http://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1030690/metodoLog_ia-avaliacao-rapida-de-genotipos-de-mandioca-quanto-a-resistencia-a-bacteriose-antracnose-e-superalongamento) >

PEREIRA, Filipe; GOODWIN, Paul.; ERICKSON, Larry. Cloning of a peroxidase gene from cassava with potential as a molecular marker for resistance to bacterial blight(2003). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 2, p. 149–154, 2003. Doi:10.1590/s1516-89132003000200002.

PERUCH, Luiz; COLARICCIO, Addolatra; NEUBERT; Enilto, NEUBERT. Sintomas e controle das principais doenças da mandioca em Santa Catarina (2013). **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 26, n. 2, p. 52–54, 2013. Disponível em < <https://www.researchgate.net/publication/298214517>>.

PERUCH, Martins; AUGUSTO, Luiz; BRUNA, Della; Relação entre doses de calda bordalesa e de fosfito potássico na intensidade do míldio e na produtividade da videira cv (2008) . “Goethe,” **Ciencia Rural**. V. 38 (2008) 2413–2418. Doi:10.1590/S0103-84782008000900001.

PFÄFFL, Michael. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, [Oxford], v. 29, n. 9, 2001. Disponível em:< [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11328886/](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11328886/)>. .

RAMAKERS, Christian; RUIJTER, Jan; DEPREEZ, Ronald; MOORM, Antoon. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data (2003). **Neuroscience Letters**. v. 339, n, 1, p. 62-66, 2003. doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4.

RAMIREZ, Edilene; DEREPPER, Alexis; BERNAL, Adriana; SZUREK, Boris; LÓPEZ, Camilo. Resistance and susceptibility to *Xanthomonas phaseoli pv. manihotis* in cassava: A transcriptomic comparison (or two sides of the same coin) (2020). **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 112, 2020. Doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101535

REIS, Sávio; TAVARES, Liliane; COSTA, Carinne; BRÍGIDA, Aílton; SOUZA, Cláudia. Molecular cloning and characterization of a novel RING zinc-finger protein gene up-regulated under *in vitro* salt stress in cassava (2012). **Molecular Biological Reporter**. N. 39, pg. 6513–6519, 2012. Doi. 10.1007/s11033-012-7479-7.

RODRIGUEZ-MORENO, Luis; SONG, Yin; THOMMA, Bart. Transfer and engineering of immune receptors to improve recognition capacities in crops (2017). **Plant Biology**. n. 38, pg., 42-49, 2017.

ROLANDO, Carol; SOMCHIT, Chanadtda; BADER, Martin. Can copper be used to treat foliar *Phytophthora* infections in *Pinus radiata*?(2019). **APS Publications**. v. 103, p. 1828-1834, 2019. Doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1247-RE

SANGIOGO, Maurício; RODRIGUEZ, Daniela; MOCCELIN, Renata; BERMUDEZ, Johan; CORREA, BIANCA; MOURA, Andrea. Foliar spraying with bacterial biocontrol agentes for the control of common bacterial blight of bean (2018). **Pesquisa agropecuária Brasileira**. v. 53, n. 10, p. 1101-7108, 2018. doi: 10.1590/S0100-204X2018001000003.

SANTIN, Elizabeth; MAIORKA, Alex; ZANELLA, Irineo; MAGON, Leandro. Micotoxinas do *Fusarium* spp na avicultura comercial (2001). **Ciência Rural**. v. 31, n. 1, 2001. doi.org/10.1590/S0103-84782001000100030

SANTOS,

SU, Xiaomei; ZHU, Guangtao; WANG, Xiaoxuan; YANMEI, Guo; LI, Baoju; DU, Yongchen. Fine mapping and molecular marker development of the Sm gene conferring resistance to gray leaf spot (*Stemphylium* spp.) in tomato (2019). **Theoretical and Applied Genetics**. n. 132, p. 871–882 (2019). doi.org/10.1007/s00122-018-3242-z.

SUN, Dongling; ZHUO, Tao; FAN, Xiaojing; ZOU, Huasong. Identification of a *Pseudomonas putida* as biocontrol agent for tomato bacterial wilt disease (2017). **Biological Control**. v. 114, n. 02, p. 45-50, 2017. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.015

SUN, Zhuo; YANG, Li-min; HAN, Mei; HAN, Zhong-ming; YANG, Li; Cheng, Lin. BioLog ical control ginseng grey mold and plant colonization by antagonistic bacteria isolated from rhizospheric soil of *Panax ginseng* Meyer (2019). **Biological Control**. v. 138, n. 10, pg. 40-48, Doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104048.

ŠVÁBOVÁ, Luchenk; LEBEDA, Arankthisk. *In vitro* Selection for Improved Plant Resistance to Toxin-Producing Pathogens. **Journal of Phytopathology**. n.15, v. 12, p. 124-132. doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00928.x

TAPPIBAN, Piengtawan; SRAPHET. Supajit; SMITH, Duncan.. Identification and 44biológico4444 of genes in response to cassava bacterial blight infection(2018). **Journal of Applied Genetics**, v. 59, n. 4, p. 391–403, 2018. Doi:10.1007/s13353-018-0457-2.

TATIS, Paula; CORZO, Mariana, CABEZAS. Juan; CIPAGAUTA, Adriana; PRIAS, Monica; The overexpression of Rxam1, a cassava gene coding for © RLK, confers disease resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* (2018), **Planta**. 247 (2018) 1031–1042. Doi:10.1007/s00425-018-2863-4.

TERTIVANIDIS, Konstantinos; GOUDOULA, Catherine; VASILIKIOTIS, Christos. Superoxide dismutase transgenes in sugarbeets confer resistance to oxidative 44iológi and the fungus *C . beticola* (2004). **Transgenic Research**, v.13 p. 225–233, 2004. Disponível em < link.springer.com/article/10.1023/B:TRAG.0000034610.35724.04>.

TREMACOLDI, Célia. Manejo das principais doenças da cultura da mandioca no estado do Pará (2016). **Cultura da Mandioca: Aspectos socioeconômicos, melhoramento genético, manejo de pragas, e doenças e agroindústria (EMBRAPA)**. Cap. 9, 2016. Disponível em <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/150251/1/LV-Mandioca-cap9.pdf> >

VARGAS, Amanda; MOREIRA, Patrícia; ALVES, Kaique; CAMARA, Guilherme; ALVES, Fábio. Efeito do uso de fertilizante orgânico foliar a base de bacillus o desenvolvimento inicial de salsa (2016) . **XXI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VII Encontro de Iniciação à Docência – Universidade do Vale do Paraíba**. P. 1–6, 2016. Disponível em < [www.inicepg.univap.br/cd/INIC\\_2017/anais/aLogRQuivos/RE\\_1055\\_1463\\_01.pdf](http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2017/anais/aLogRQuivos/RE_1055_1463_01.pdf)>.

VERDIER, Valérie. Bacterial blight Vascular (o Añublo Bacteriano) de la Yuca Causada por *Xanthomonas axonopodis* pv *manihots* (2012). **La yuca em el Tercer Milenio**. cap. 9, pg. 148-759. Disponível em :<<https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/55243/capitulo09.pdf;sequence=1>>

VIANA, Jorge, FREGENE, Marta; DUQUE, Marchus. Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)(2000). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 5–6, p. 865–872, 2000. Doi:10.1007/s001220051554.

VIDA, João Batista; ZAMBOLIM, Laércio; TESSMANN, Dauri; FILHO, Usan; VERZIGNASSI, Jaqueline. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido(2004). **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 355–372, 2004. Doi:10.1590/s0100-41582004000400001.

WYDRA, Kinzou; ZINSOU, Wan; VAZ, Jorge; VÉRDIER, Vallérie. Identification of Pathotypes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Africa and Detection of Quantitative Trait Loci and Markers for Resistance to Bacterial Blight of Cassava (2004). **Phitopatology**, n. 10, v., 94, pg. 1084-7093, 2004. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.10.1084.

---

## **CAPÍTULO II**

**Efeitos de indutores de resistência e agentes de controle químico e biológico no controle da bacteriose (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*) da mandioca.**

---

## **EFEITOS DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA E AGENTES DE CONTROLE QUÍMICO E BIOLÓGICO NO CONTROLE DA BACTERIOSE (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*) DA MANDIOCA.**

Fernando Luiz Mattos Gonzalez Junior <sup>a</sup>, Maria Selma Alves Silva Diamantino <sup>b</sup>, Camila Santiago Hohenfeld<sup>b</sup>, Saulo Alves Santos de Oliveira <sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (Rua Rui Barbosa, 710 – Campus Universitário CEP 44380-000, Cruz Das Almas/BA)

<sup>b</sup> Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA – BRASIL.

### **Resumo.**

A Bacteriose da Mandioca (CBB) encontra-se em várias regiões do mundo e seu agente causal é a bactéria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*). A principal forma de controle da doença é pelo uso de manivas livres da presença do patógeno e cultivo de variedades resistentes. Entretanto, novas estratégias de manejo da doença se fazem necessárias. Desta forma, o presente trabalho buscou analisar a ação de controles químicos e biológicos e indutores de resistência contra a CBB. Como agentes de controle biológico, foram utilizadas bactérias isoladas do fertilizante orgânico e bioestimulador Vitaflex e organismos presentes nos bancos de microrganismos da Embrapa Mandioca e Fruticultura *Bacillus* sp. (TRA 058895 e TRA 058893). Como controles químicos foram utilizados o Oxidocloreto de cobre e Sulfato de cobre e como indutores de resistência, foram testados o Fosfito de cobre e o ácido Acibenzolar-S-Metílico (ASM). Foram conduzidos testes *in vitro* e *in vivo* com variedades de mandioca 'BRS Formosa' (resistente a CBB) e 'BRS Kiriris' (suscetível a CBB). Os testes de antibiograma mostraram ações de inibição *in vitro* pelo Sulfato de cobre e Fosfito de cobre. Os isolados de *Bacillus* sp. TRA 058895 e TRA 058893, também mostraram ação de antagonismo nos ensaios *in vitro*. Nos testes *in vivo* foram utilizados cinco tratamentos, Acibenzolar-S-Metílico "ASM", Fosfito de Cobre, Sulfato de Cobre e *Bacillus* sp. (TRA 058895 e TRA 058893). Os tratamentos foram aplicados em 3 diferentes tempos de acordo com o momento da inoculação das plantas com *Xpm*, sendo estes aplicados uma semana antes da inoculação (-7), no dia da inoculação (0) e uma semana após a inoculação (7). Para cada tratamento foram utilizadas 12 plantas de ambas as variedades. Esta diferença quanto aos dias de aplicação, é essencial para se mensurar as capacidades protetoras, erradicantes e curadora dos tratamentos. As sintomatologias desenvolvidas pelas plantas foram avaliadas de forma qualitativa e quantitativa em intervalos de 48 horas por 30 dias.

Estes dados nos permitiram traçar o índice de severidade da doença. Nos ensaios *in vivo*, os isolados microbianos e o ASM não deram resultados de satisfatório, inclusive, aumentando a severidade, principalmente quando aplicados nos tempos (7) (uma semana após a inoculação das plantas por *Xpm*). O Fosfito de cobre e Sulfato de cobre, mostraram-se respectivamente efetivos e moderadamente efetivos no controle da CBB. O Fosfito de cobre e Sulfato de cobre apresentaram melhores respostas quando aplicados no tempo ('-7') (uma semana antes a inoculação das plantas por *Xpm*)

**Palavras chaves:** Controle Biológico, Controle químico, antagonismo biológico, CBB.



## **EFFECTS OF RESISTANCE INDUCERS AND CHEMICAL AND BIOLOGICAL CONTROL AGENTS IN THE CONTROL OF BACTERIOSIS (*Xanthomonas phaseoli* pv. *Manihotis*) IN CASSAVA.**

### **Abstract.**

Cassava bacterial blight (CBB) is found in several regions of the world and is caused by the bacteria *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Xpm). The main strategy for the disease control is by the use of stem-cuttings without the presence of the pathogen and the cultivation of resistant varieties, however, new strategies for disease management are necessary. Therefore, the present work sought to analyze the action of chemical, resistance-inducing and biological controls against CBB. As biological control agents, isolated bacteria were used in the organic fertilizer and bioestimulador Vitaflex and organisms present in the microorganism banks of Embrapa Mandioca e Fruticultura *Bacillus* sp. (TRA 058895 and TRA 058893). As chemical controls, copper oxychloride, copper sulphate were used as resistance inducers and copper phosphite and Acibenzolar-S-methyl (ASM), were tested. In vitro and in vivo tests were conducted with cassava varieties 'BRS Formosa' (resistant to CBB) and 'BRS Kiriris' (susceptible to CBB). The antibiogram tests showed inhibition actions in vitro by copper sulphate and copper phosphite. The isolates of *Bacillus* sp. TRA 058895 and TRA 058893 also showed antagonistic action in in vitro assays. In in vivo tests we used 5 treatments, ASM, Copper Phosphite, Copper Sulfate and *Bacillus* sp. (TRA 058895 and TRA 058893). The treatments were applied at three different time periods according to the time of inoculation of the plants with Xpm, which were applied one week before inoculation (-7), on the day of inoculation (0) and one week after inoculation (7). For each treatment, 12 plants of both varieties were used. This difference in terms of application days is essential to measure the protective, eradicating, and curative capabilities of treatments. The symptoms developed by the plants were evaluated qualitatively and quantitatively at intervals of 48 hours for 30 days. The data provided for the analysis of the disease severity index. In the in vivo tests, the microbial isolates and the ASM were not successful, including, increase in the severity especially at the '+7' time-period (one week after the inoculation of the plants by Xpm). Copper phosphite and copper sulfate were effective and moderately effective in controlling CBB, respectively. Copper phosphite and copper sulphate showed better responses

when applied at the '-7' time-period (one week before the inoculation of the plants by *Xpm*).

**Key words:** Biological Control, Chemical Control, Biological Antagonism, CBB.

## Introdução.

A mandioca (*Manihot esculenta*) é uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo e suas folhas, quando devidamente processadas, podem ser utilizadas como alimentação na ração animal e suas raízes tuberosas, que apresentam altas concentrações de carboidratos, podem ser utilizadas para produção de farinhas e féculas (FAO, 2013). Pelas suas características de simples manejo e resistência, a mandioca é tratada como cultura de subsistência e por isso se disseminou principalmente pelos países em desenvolvimento, sendo atualmente a terceira fonte de carboidrato mais consumida por estes (MBARINGONG et al. 2017). Apesar da sua grande importância socioeconômica, doenças e pragas são responsáveis por grandes perdas na cultura (FARNOU, et al., 2019). Dentre as doenças mais importantes, a bacteriose (CBB) vem se destacando, principalmente pelas perdas que vem causando e por estar presente em quase todas as regiões produtoras (FARNOU, et al., 2019)

O agente causal da CBB é a bactéria Gram negativa *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), (MBARINGONG et al. 2017). A CBB em estágios iniciais acomete tecidos foliares, principal loco de infecção, causando manchas aquosas, desfolha acentuada, lesões necróticas e em estágios avançados, exsudação de goma, murcha da planta e posteriormente a morte (LOPEZ, et al., 2012).

Inúmeros produtores de mandioca não possuem insumos tecnológicos nem controle sobre as variedades que cultivam, assim surge a necessidade de novas abordagens para manejo da doença com o uso controles químicos, indutores de resistência e agentes de controle biológico (VÉRDIER, 2012). Os controles químicos desempenham três tipos de papéis que impedem a propagação da doença, que são curativa, erradicante e protetora (SUNDIN, et al., 2016). Na ação erradicante, o controle atua reduzindo a população do patógeno, na ação protetora, ele atua protegendo a planta de futuras infecções (SUNDIN, et al., 2016). Na ação curativa, é mensurada a capacidade do controle de limitar o desenvolvimento do patógeno no interior dos tecidos da planta que geralmente ocorre após a infecção (TOFOLLI, et al., 2012).

Os indutores de resistência não atuam diretamente sobre o patógeno, mas indiretamente ao ativar vias de sinalização da planta de resposta à doença

(CARMONA, et al., 2019). Os agentes de controle biológico atuam de várias maneiras no controle da doença ativando diferentes mecanismos de defesas da planta (SUN, et al., 2019). Os agentes de controle biológico em alguns casos atuam colonizando a rizosfera e modificam algumas características da rizosfera que inibem o crescimento de patógeno. Além disso, também podem atuar inibindo o patógeno ao competir nessa região por nutrientes (FIRA, et al., 2018). Em alguns casos, os agentes de controle biológico podem desenvolver uma relação endofítica com as plantas, colonizando os tecidos e trazendo benefícios à planta (VARGAS, et al., 2017).

Em vista do panorama atual e da problemática levantada, o presente trabalho buscou avaliar controles químicos, indutores de resistência e agentes de controle biológico quanto a sua ação erradicante, protetora e curativa contra a CBB. A inibição da *Xpm* em ensaios *in vitro* pelos controles químicos, Sulfato de Cobre e Oxiclreto de Cobre, e os indutores de resistência Acibenzolar-S-Metilico (ASM) e Fosfito de Cobre, foram avaliadas. Foram avaliados também a capacidade de antagonismo por metabólitos secundários contra a *Xpm* dos microrganismos dos organismos isolados no fertilizante orgânico Vitaflex (VTF-1) e *Bacillus sp.*, isolados TRA 058893 e TRA 058895, pertencentes ao banco de microrganismos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Os tratamentos bem-sucedidos nos ensaios *in vitro* foram avaliados em ensaios *in vivos* de resistência contra a CBB, a fim de comprovar uma potencial ação curativa, erradicante e protetora e os tratamentos aplicados em diferentes tempos de acordo ao momento da inoculação das plantas por *Xpm*. Os tratamentos foram aplicados uma semana antes da inoculação (-7), no dia da inoculação (0) e uma semana após a inoculação (7). No ensaio *in vivo* foram utilizadas duas variedades de mandioca com níveis contrastantes de resistência à CBB, sendo estas 'BRS Formosa' (resistente) e 'BRS Kiriris' (suscetível).

## **Materiais e métodos.**

As metodologias empregadas neste trabalho foram divididas em ensaios *in vitro* e em ensaios *in vivo*. *In vitro* foi conduzido os ensaios de antibiograma com os indutores de resistência e controles químicos e antagonismo biológico por metabólitos secundários no qual organismos antagonistas VTF-1 e *Bacillus sp.* isolados TRA

058893 e TRA 058895, foram analisados. Com os valores de concentração testados e as respectivas áreas de halo de inibição obtidos no ensaio de antibiograma, calculou-se a dose efetiva dos reagentes. Neste estudo foi mensurado quais as doses levariam à inibição do crescimento da colônia de *Xpm* em 50% e 100%. *In vivo* foi realizado o ensaio de teste de resistência contra a CBB. Nos ensaios *in vivo*, duas variedades de mandioca distintas quanto a sua resistência contra à CBB, a variedade resistente 'BRS Formosa' e suscetível, 'BRS Kiriris', oriundas do campo de cultivo de mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, foram utilizadas.

### **Ensaio de antibiograma.**

Os ensaios de antibiograma foram conduzidos no laboratório de Microbiologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia. Neste ensaio, foi utilizado o isolado *Xpm*-1502, proveniente do banco de microrganismos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Este isolado foi selecionado pela sua agressividade comprovada por trabalhos anteriores. O isolado de *Xpm* foi cultivado em 25 mL de meio líquido YPG a 0,5% (Extrato de levedura, peptona e glicose) por 48 horas a 28 °C  $\pm$  5 °C em estufa sem agitação. Ao final estas foram misturadas em 250 mL de meio YPG 0,5% + Ágar 0,8 % ainda semissólido e após a homogeneização, o meio foi vertido sobre placas de Petri descartáveis com tamanho de 90x15, contendo meio sólido Ágar-Ágar. Após a solidificação do meio foram adicionados discos de papel filtro (1cm de diâmetro) contendo os controles químicos e indutores de resistência.

Os discos foram imergidos na respectiva solução por 10 segundos e após isto adicionados à placa. Foram inseridos seis discos por placa de forma equidistantes, cada disco correspondendo às respectivas concentrações dos reagentes, demonstradas na tabela 1. Como controle relativo foi utilizado o Sulfato de Estreptomicina e como controle absoluto. discos de papel embebidos em água destilada autoclavada. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e separados por placa. As placas foram incubadas por 72 Horas a 28 °C  $\pm$  5 °C em estufa, período o qual foram retiradas e fotografadas e os halos de inibição, mensurados com auxílio do software 'Image J' (Versão 1.08).

**Tabela 1.** Valores de concentração da estreptomicina, controles químicos e indutores de resistência utilizados nos ensaios de antibiograma.

|                | Reagentes                        |                        |            |                         |                            |
|----------------|----------------------------------|------------------------|------------|-------------------------|----------------------------|
|                | Sulfato de Estreptomicina (mg/L) | Fosfito de cobre (v/v) | ASM (mg/L) | Sulfato de cobre (mg/L) | Oxicloreto de cobre (mg/L) |
| Concentração 1 | 0,1                              | 0,1%                   | 0,05       | 0,1                     | 0,084                      |
| Concentração 2 | 1                                | 0,5%                   | 0,5        | 1                       | 0,84                       |
| Concentração 3 | 10                               | 1%                     | 5          | 10                      | 8,4                        |
| Concentração 4 | 100                              | 5%                     | 50         | 100                     | 84                         |
| Concentração 5 | 1000                             | 10%                    | 500        | 1000                    | 840                        |

\*ASM = Acibenzolar-S-Metílico.

### **Dose efetiva.**

Para os cálculos de dose efetiva do Sulfato de Cobre e Fosfito de Cobre foi feita a análise de regressão logarítmica, seguindo a metodologia apresentada por Vargas e equipe (2010). Construída a regressão logarítmica da “dose x resposta” do Sulfato de Estreptomicina, foi obtido 1,71 cm<sup>2</sup> como área de halo de inibição correspondente ao EC<sub>50</sub> do Sulfato de Estreptomicina e 3,42 cm<sup>2</sup> como área de halo de inibição correspondente ao EC<sub>100</sub> do Sulfato de Estreptomicina.

Os valores de dose e resposta do Sulfato de Cobre e Fosfito de Cobre foram plotados em gráficos de dispersão afim de se obter as equações das retas (presentes na Tabela 3) com a equação foram calculados os valores de EC<sub>50</sub> e EC<sub>100</sub> do Sulfato de Cobre e Fosfito de Cobre. Para este cálculo foi utilizado como valor de Y, os valores médios dos Halos de Inibição do Sulfato de Estreptomicina que corresponderam ao EC<sub>50</sub> e EC<sub>100</sub> do antibiótico Sulfato de Estreptomicina.

### **Ensaio de antagonismo biológico por metabólitos secundários.**

Os ensaios de antagonismo biológico por metabólitos secundários foram conduzidos no laboratório de Microbiologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura no município de Cruz das Almas, Bahia. Como controle biológico, foram utilizados os

isolados de *Bacillus* sp. (TRA 058893 e TRA 058895) oriundos do banco de microrganismos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Neste ensaio também foram utilizadas bactérias isoladas no fertilizante orgânico Vitaflex (VTF-1.). Para isto foi realizada uma diluição de 1:100 do Vitaflex, seguido de plaqueamento de 1 mL desta suspensão em placas de Petri descartáveis com tamanho de 90 x15 cm, contendo meio YPG 0,5% - Ágar 0,8%. As placas inoculadas foram incubadas em estufa do tipo BOD por 48 horas a  $28 \pm 5$  °C. As colônias obtidas do fertilizante orgânico Vitaflex apresentaram o mesmo aspecto similar quanto à cor, forma e constituição, portanto não houve a necessidade de se realizar a repicagem destas para o isolamento.

As bactérias VTF-1 e *Bacillus* spp. (TRA 058893 e TRA 058895) foram cultivadas em meio líquido YPG à 0,5% por 24 horas a  $28$  °C  $\pm$   $5$  °C em estufa do tipo BOD. Passado o período de cultivo, as bactérias foram semeadas por meio de discos de papel filtro com diâmetro de 1 cm em meio sólido YPG 0,5% - Ágar 0,8%. As placas então foram incubadas por 48 horas a  $28$  °C  $\pm$   $5$  °C em BOD. Os discos de papel foram adicionados ao centro da placa para melhor crescimento e visualização do halo de inibição. Após o período de incubação foram adicionados às placas algodões embebidos em Clorofórmio P.A. a fim de esterilizar quimicamente através dos seus vapores o meio contendo os organismos antagonistas. Em seguida, as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 24 horas.

Bactérias *Xpm* isolado 1502-4.1 oriundas do banco de microrganismos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, foram cultivadas em 25 mL de meio líquido YPG 0,5%, por 48 horas a  $28$  °C  $\pm$   $5$  °C. Ao fim do processo, estas foram misturadas em 250 mL de meio YPG 0,5%-Ágar 0,8 %, ainda semissólido e após a homogeneização o meio foi vertido sobre placas de Petri que continham os meios esterilizados quimicamente em qual os organismos antagonistas foram cultivados. As placas foram incubadas por 48 horas a  $28$  °C  $\pm$   $5$  °C. Para controle do ensaio, Placas de Petri contendo apenas o meio YPG 0,5%-Ágar 0,8 % não inoculadas, foram esterilizadas quimicamente e em seguida inoculadas com *Xpm*. Ao fim da incubação, as placas foram fotografadas e os halos de inibição foram mensurados pelo software Image J (Versão 1.08). A média, desvio padrão da média e a análise de variância, foram calculados pelo software R Studio (Versão 1.2).

### **Testes de resistência contra a CBB *in vivo*.**

Para este ensaio foi utilizada a metodologia de inoculação desenvolvida por Mbaringong, et al. (2017) com as devidas adequações. Foram utilizadas variedades comerciais de mandioca 'BRS Kiriris' (suscetível à CBB) e 'BRS Formosa' (resistente à CBB) oriundas do campo de cultivo de mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura no município de Cruz das Almas, Bahia. As plantas foram propagadas por via vegetativa com o uso de manivas e cultivadas em casa de vegetação por um período de 60 dias para que houvesse o desenvolvimento pleno das partes aéreas das plantas. Em seguida, as plantas foram removidas para sala climatizada no laboratório de análise de Amido e derivados de Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura onde foram submetidas a controle de temperatura ( $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo (12 horas de iluminação) para o melhor desenvolvimento da bacteriose.

O ensaio foi dividido em 4 grupos e estes grupos foram divididos de acordo com o momento da aplicação dos tratamentos, que foram os dois tratamentos de natureza de controle biológico por indução de resistência (*Bacillus* sp. isolados TRA 058893 e TRA 058895), dois indutores de resistência, Acibenzolar-S-Metílico (ASM) e Fosfito de Cobre, e um controle químico, o Sulfato de Cobre. Os grupos foram divididos em (-7, 0 e 7); O primeiro grupo foi composto por aqueles tratados uma semana antes da inoculação (-7); (0) no momento da inoculação e (7) sete dias após a inoculação. Em cada grupo um total de cinco tratamentos foram testados em 12 plantas de cada variedade.

Desta forma, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizados (DIC), em esquema fatorial 3x5x2, formado por três períodos de inoculação (-7;0; +7), cinco tratamentos (*Bacillus* sp. isolados TRA 058893 e TRA 058895, ASM, Fosfito de Cobre e Sulfato de Cobre água (controle)) e duas variedades de mandioca. Os tratamentos foram aplicados por pulverização manual. Neste ensaio foram utilizadas as concentrações de 1000 mg/L para Sulfato de cobre, 500 mg/L para o ASM, 10% v/v para o Fosfito de cobre. Nos tratamentos baseados em agentes de controles biológicos, utilizou-se os isolados de *Bacillus* sp. TRA 058893, TRA 058895, utilizados na concentração de UFC à  $1 \times 10^7$  padronizadas por meio de espectrofotometria à OD<sub>700</sub> nm, estes apresentaram absorvância de 0,1. O organismo



VTF-1 e Oxiclóreto de cobre não foram utilizados neste ensaio, pois não apresentaram ação antagonista e inibição da *Xpm in vitro*.

As plantas foram avaliadas por um mês em períodos de 48 horas pelos parâmetros estabelecidos na tabela 2. Estes índices foram usados no cálculo do índice de severidade da doença (ISD) representado na equação 1. O ISD (%) foi calculado com auxílio do software Excel Pacote Office 2013. O ISD (%) dos controles que não foram inoculados, foram subtraídos dos demais, a fim de que sintomas de senescência natural não fossem tomados como sintomas da doença. A análise de variância, medias e testes de significância estatística (teste Tukey a  $p > 0,5$ ), foram realizados no software R Studio (Versão 1.2).

$$ISD(\%) = \frac{\sum(n^{\circ} \text{ de plantas adoecidas que apresentaram o mesmo score} \times \text{score desta categoria})}{(n^{\circ} \text{ total de plantas} \times \text{score da categoria máxima}) \times 100}$$

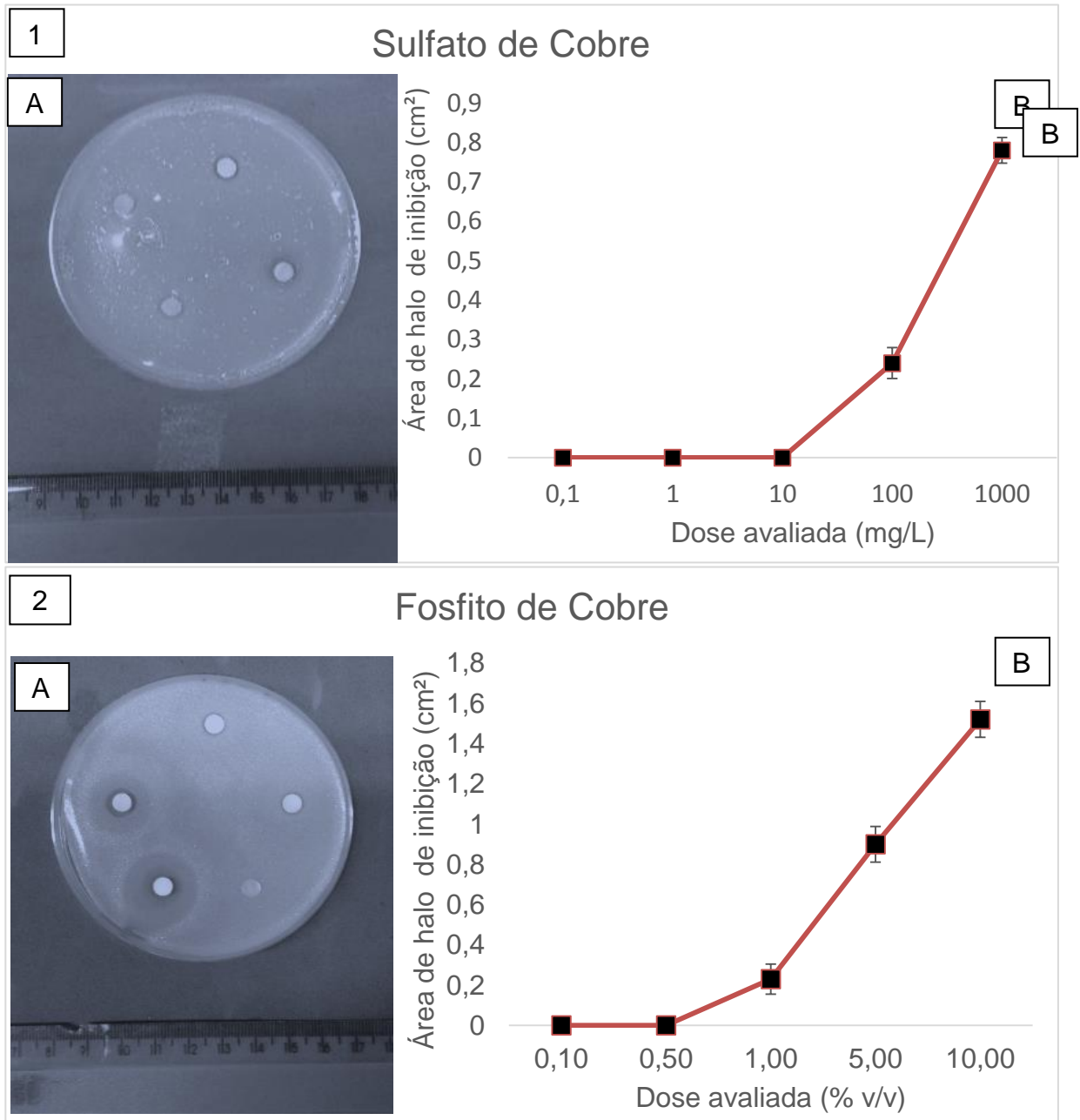
**Equação 1.** Equação para cálculo do índice de severidade da doença (MCKINNEY, et al., 1923).

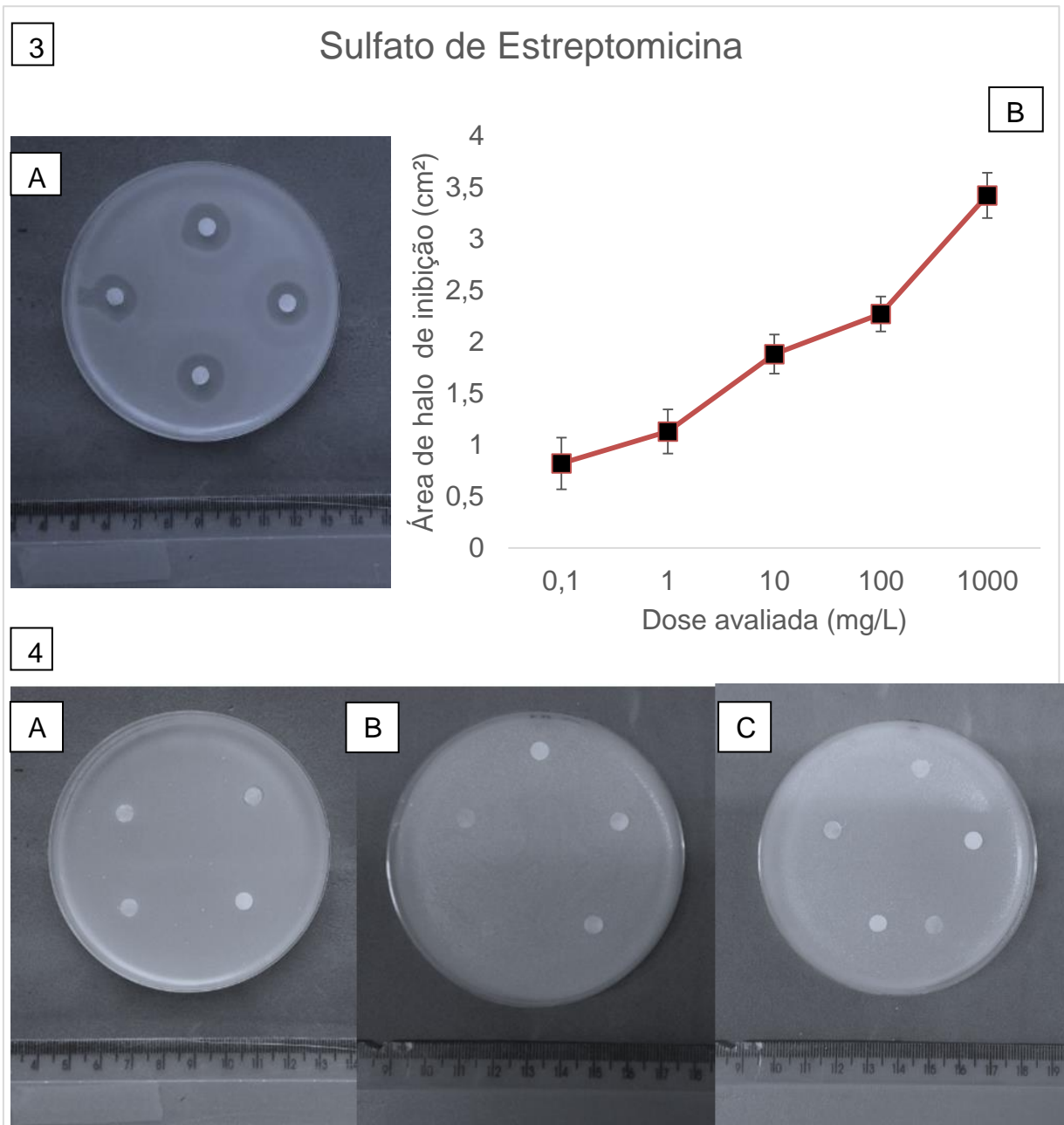
**Tabela 2.** Escala de notas utilizada para avaliação dos sintomas da CBB apresentado pela planta.

| <b>Escore</b> | <b>Parâmetros para avaliação</b>                                      |
|---------------|---|
| <b>0</b>      | Plantas sadias  |
| <b>1</b>      | Amarelecimento no terço inferior                                      |
| <b>2</b>      | Amarelecimento do terço médio – lesões de requeima ou manchas aquosas |
| <b>3</b>      | Amarelecimento de toda a planta com necrose                           |
| <b>4</b>      | Murcha de toda planta com necrose                                     |
| <b>5</b>      | Murcha acompanhada de morte   |

## Resultados

### Ensaio de Antibiograma





**Figura 1.** Placas contendo halos de inibição dos testes de antibiograma e Gráfico com valores médios das áreas de halos obtidos no ensaio de antibiograma. **1)** Ensaio de Antibiograma com o Sulfato de Cobre; **A)** Placa contendo o ensaio de Sulfato de Cobre, **B)** Gráfico contendo os valores médios de halo de inibição obtidos com relação a dose avaliada de Sulfato de Cobre. **2)** Ensaio de Antibiograma com o Fosfito de Cobre; **A)** Placa contendo o ensaio de Fosfito de Cobre, **B)** Gráfico contendo os valores médios de halo de inibição obtidos com relação a dose avaliada de Fosfito de Cobre. **3)** Ensaio de Antibiograma com o Sulfato de Estreptomicina; **A)** Placa contendo o ensaio de Sulfato de Estreptomicina, **B)** Gráfico contendo os valores médios de halo de inibição obtidos com relação a dose avaliada de Sulfato de Estreptomicina. Letras maiúsculas simbolizam diferenças estatísticas pelo teste de

Tukey a  $p > 0,05$ . **4)** Placas utilizadas no ensaio de antibiograma em que os tratamentos não apresentaram formação de halo de inibição; **A)** Oxícloro de Cobre, **B)** Acibenzolar-S-Metílico (ASM), **C)** Controle.

Neste ensaio, apenas os tratamentos Fosfito de Cobre, Sulfato de Cobre e Sulfato de Estreptomicina, apresentaram área de Halo de inibição. O Sulfato de Estreptomicina apresentou maiores valores de Halo com valor máximo de 3,42 cm<sup>2</sup> na concentração de 1000 mg/L. O Fosfito de Cobre e Sulfato de Cobre apresentaram áreas máximas de 1,52 cm<sup>2</sup> e 0,78 cm<sup>2</sup> nas respectivas concentrações 10,00 (% v/v) e 0,78 mg/L. Os tratamentos ASM e Oxícloro de Cobre, não apresentaram halo de inibição.

### Dose efetiva.

**Tabela 3.** Doses efetivas do Sulfato de Cobre e Fosfito de Cobre em relação ao DE<sub>50</sub> e DE<sub>100</sub> do Sulfato de Estreptomicina.

| Dose Efetiva Sulfato de Cobre          |             |                        |
|--|-------------|------------------------|
| DE <sub>50</sub>                       |             |                        |
| Halo cm <sup>2</sup>                   | Dose (mg/L) | Intervalo de Confiança |
| 1,71                                   | 2333,29 B   | $\pm 2,23$             |
| DE <sub>100</sub>                      |             |                        |
| Halo cm <sup>2</sup>                   | Dose (mg/L) | Intervalo de Confiança |
| 3,42                                   | 4776,14 A   | $\pm 2,56$             |
| Equação da reta $y = 0,0007x + 0,0767$ |             | R <sup>2</sup> 0,9512  |

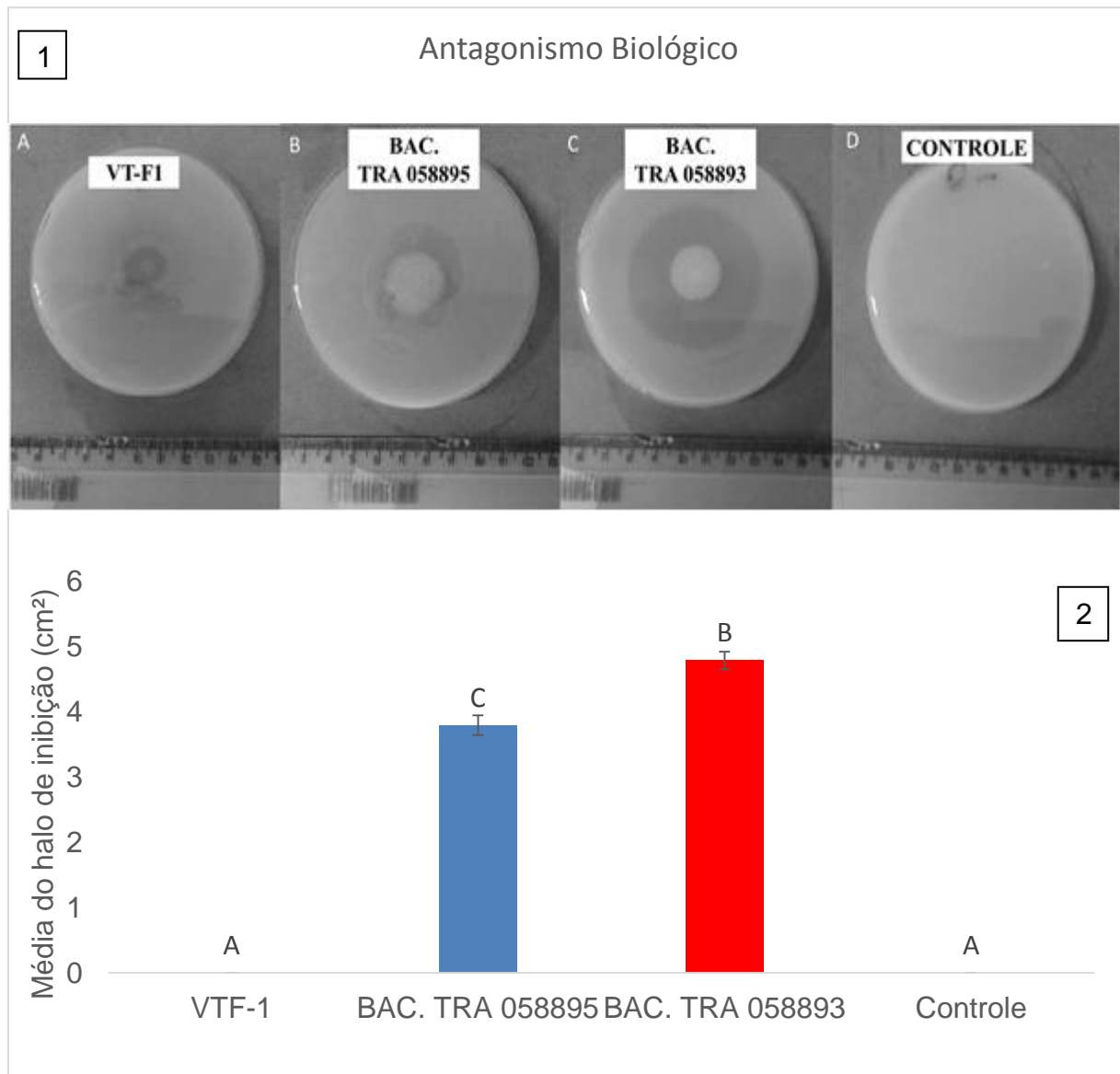
  

| Dose Efetiva Fosfito de Cobre          |              |                        |
|--|--------------|------------------------|
| DE <sub>50</sub>                       |              |                        |
| Halo cm <sup>2</sup>                   | Dose (% v/v) | Intervalo de Confiança |
| 1,71                                   | 10,90 B      | $\pm 2,45$             |
| DE <sub>100</sub>                      |              |                        |
| Halo cm <sup>2</sup>                   | Dose (% v/v) | Intervalo de Confiança |
| 3,42                                   | 21,96 A      | $\pm 2,32$             |
| Equação da reta $y = 15,465x + 0,0246$ |              | R <sup>2</sup> 0,9817  |

Sulfato de Cobre alcançou DE<sub>50</sub> 2333,29 mg/L e DE<sub>100</sub> 4776,14 mg/L, ou seja, estes valores de concentração serão teoricamente os valores de concentração necessários para que o Sulfato de Cobre alcance os mesmos valores de inibição do Sulfato de Estreptomicina.

O Fosfito de Cobre apresentou os valores de  $DE_{50}$  10,90 % (v/v) e  $DE_{100}$  21,96 % (v/v) como dose para alcançar os valores de inibição alcançados respectivamente pelo  $EC_{50}$  e  $EC_{100}$  do Sulfato de Estreptomicina.

### Ensaio de antagonismo biológico por metabólitos secundários.



**Figura 2.** 1. Placas contendo os resultados do ensaio de antagonismo onde se mensurou a área dos halos de inibição. (A) VT-F1, (B) BAC. TRA 058895, (C) BAC. TRA 058893, (D) placa apenas com o *Xpm* (controle), setas com traçado vermelho indicam os halos de inibição. 2. Gráfico com valores médios dos halos de inibição obtidos no ensaio de antagonismo por metabólitos secundários. Letras maiúsculas simbolizam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey a  $p > 0,05$ .

O ensaio de antagonismo por metabólitos secundários revelou que o organismo isolado no Vitaflex (VTF-1.) não apresentou a produção de metabólitos com capacidade de inibição do crescimento do *Xpm* e dentre os organismos candidatos de *Bacillus* sp., o Isolado TRA 058893 apresentou maior capacidade de antagonismo sobre o *Xpm*, tendo área média de halo de inibição alcançando 4,78 cm<sup>2</sup>. O isolado TRA 058895 também apresentou atividade antagonista formando área média de halo de 3,79 cm<sup>2</sup>. Este halo de inibição é marcado pela ausência de crescimento do organismo patogênico (*Xpm*).

### **Ensaio de controle químico e biológico *in vivo*.**

Os valores de ISD (%) foram calculados com base na Equação 1. Os escores foram baseados nos parâmetros de evolução da doença presentes na Tabela 2. Os cálculos foram realizados no software Excel 2013. O Oxicleto de Cobre não foi utilizado nos testes *in vivo*, pois não apresentaram inibição *in vitro*.

Para análises do desenvolvimento da doença, foram utilizados dois parâmetros que foi a área abaixo da Curva (AAC) e a taxa de incremento da doença (TID). A área abaixo da curva mensura a área da curva do gráfico de ISD (%) ao longo dos 30 dias. Este parâmetro é ideal para uma visualização quantitativa da extensão da doença. A taxa de incremento é um parâmetro que mensura de forma quantitativa como a doença se desenvolve, assim podemos determinar o quando de ISD (%) foi adicionado em média a cada avaliação da sintomatologia das plantas; quanto maior a taxa, mais rápida a doença se desenvolveu sobre a planta.

### **Área abaixo da curva (AAC).**

Nos ensaios com a variedade 'BRS Formosa', o tratamento controle apresentou Área abaixo da curva (AAC) de 810 apenas para os tratamentos BAC. TRA 058893 -7, Fosfito de Cobre -7, Fosfito de Cobre (0), apresentaram valores de AAC menores em comparação ao controle. Estes alcançaram respectivamente, 747, 480 e 746 AAC. Os tratamentos Fosfito de Cobre (7) e Sulfato de Cobre (0) não apresentaram diferenças estatísticas segundo o teste estatístico Tukey em relação ao

tratamento controle. Neste ensaio com `BRS Formosa`, os tratamentos que apresentaram grandes valores de AAC foram os tratamentos BAC. TRA 058895 (-7) (1231 AAC) ASM (-7) (1597 AAC), BAC. TRA 058895 (0) (1468 AAC), BAC. TRA 058893(0) (1444 AAC), ASM (0) (1519 AAC), BAC. TRA 058895 (7) (1339 AAC), BAC. TRA 058893 (7) (1534 AAC), ASM (7) (1130 AAC), e Sulfato de Cobre (7) (1101 AAC). Os demais tratamentos apresentaram valores de AAC no intervalo entre 917 e 1000 AAC.

Analisando os tratamentos nos diferentes tempos, o tratamento BAC. TRA 058895 apresentou maior valor de AAC no tempo 0 (1445 AAC), e no tempo 7 (1334 AAC), estes não apresentaram diferenças estatísticas entre si. O tratamento BAC. TRA 058895 apresentou o menor valor de AAC em -7, alcançando 1223. O tratamento BAC. TRA 058893 apresentou maiores valores de AAC nos tempos 7 e 0, com AAC de 1455 e 1537, respectivamente. O menor valor de AAC alcançado pelo tratamento TRA 058893 foi no tempo -7, com AAC de 752. O tratamento ASM alcançou o maior valor de AAC nos tempos -7 e 0 com valores de 1602 AAC e 1570 AAC, respectivamente. A menor área do tratamento ASM foi em 7, com AAC de 1123.

O Fosfito de Cobre alcançou a maior área em 7, com 917 AAC. Este tratamento apresentou os menores valores de AAC nos tempos -7 e 0 alcançando 487 AAC e 773 AAC, valores que apresentaram diferenças estatísticas entre si. O Sulfato de Cobre apresentou maior área no tempo 7 obtendo 1114 AAC. A menor área alcançada pelo tratamento Sulfato de Cobre foi nos tempos -7 e 0, com 980 e 887 AAC, respectivamente e apresentaram diferenças estatísticas entre si.

A variedade `BRS Kiriris` em seu tratamento controle, apresentou AAC de 1361. Os tratamentos que apresentaram valores menores que o controle, foram os tratamentos BAC. TRA 058895 (-7) (922 AAC), BAC. TRA 058893 (-7) (842 AAC), Fosfito de Cobre (-7) (710 AAC), Fosfito de Cobre (0) (766 AAC), BAC. TRA 058893 (7) (899 AAC), ASM (7) (1208 AAC), Fosfito de Cobre (7) (988 AAC) e Sulfato de Cobre (7) (1182 AAC). Os tratamentos que apresentaram valores maiores que o tratamento controle, foram, ASM (-7) (1801 AAC), BAC. TRA 058895 (0) (1435 AAC), BAC. TRA 058893(0) (1416 AAC), ASM (0) (2223 AAC), TRA 058895 (7) (1562 AAC). Os demais tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle.

Analisando os valores de AAC dos tratamentos em diferentes tempos de aplicação sobre a variedade `BRS Kiriris`, o tratamento BAC. TRA 058895 apresentou a maior área quando aplicado no tempo 0 e 7, com valores de ACC de 1413 e 1211, respectivamente, com diferenças estatísticas significativas entre si. O menor valor de AAC apresentando pelo tratamento BAC. TRA 058895 foi no tempo -7, com 908 AAC. O tratamento BAC. TRA 058893 apresentou maior área quando aplicado no tempo 0 (1413 AAC) e menores áreas em -7 (825 AAC) e 7 (892 AAC) e não apresentaram diferenças estatísticas entre si com base no teste estatístico Tukey a  $p > 0,5$ .



**Figura 3.** Gráfico de barras representando a AAC do índice de severidade da doença ao longo do tempo (30 dias) dos diferentes tratamentos dentro da mesma variedade. Letras maiúsculas simbolizam diferenças estatísticas entre as médias dos diferentes tratamentos dentro de um mesmo tempo; letras minúsculas simbolizam diferenças



estatísticas de um mesmo tratamento em tempos diferentes com base no teste estatístico Tukey a  $p > 0,5$ . \*ASM = Acibenzolar-S-Metílico.

O ASM apresentou maior área nos tempos -7 (1800 AAC) e 0 (1749 AAC), no entanto, estes valores de AAC não apresentaram diferenças estatísticas entre si e a menor área alcançada pelo tratamento foi no tempo 7 (1211). O Fosfito de Cobre apresentou a maior área no tempo 7 (989 AAC). As menores áreas alcançadas pelo tratamento Fosfito de Cobre foi nos tempos -7 (726 AAC) e 0 (766 AAC) e estes não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. O tratamento Sulfato de Cobre não apresentou diferenças estatísticas quando aplicados nos diferentes tempos (-7, 0 e 7).

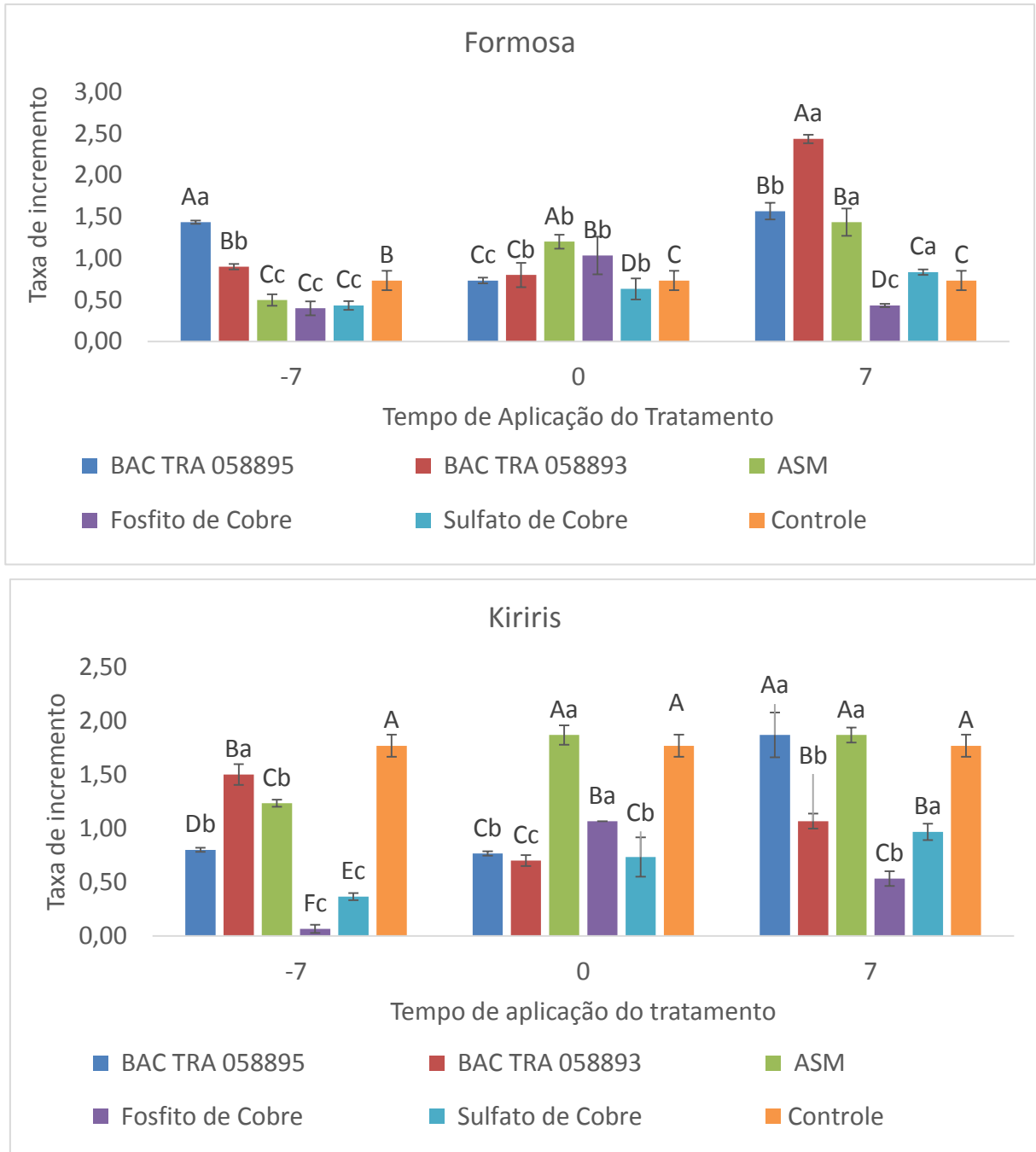
### **Taxa de Incremento do ISD%**

Neste ensaio, a variedade `BRS Formosa` no tratamento controle, apresentou taxa de incremento do índice de severidade da doença (TID) de 0,73. Neste ensaio, apresentaram TID superior ao tratamento Formosa Controle, os tratamentos BAC. TRA058895 (-7) (1,43 TID), BAC. TRA058895 (-7) (0,90 TID), ASM (0) (1,20 TID), Fosfito de Cobre (0) (1,03 TID), BAC. TRA058895 (7) (1,57 TID), BAC. TRA058895(7) (2,43 TID) e ASM (7) (1,43). O único tratamento que apresentou valores inferiores ao controle com diferenças estatísticas, tanto quando comparado dentro de seu tempo, e comparado com todos os tratamentos em todos os tempos, foi o tratamento Fosfito de Cobre (7) (0,43).

Analisando os valores de TID dos mesmos tratamentos aplicados em diferentes tempos sobre a variedade `BRS Formosa` temos o tratamento BAC. TRA058895 apresentando maior valor de TID em -7 (1,43 TID) e os menores valores em 7 (1,57 TID) e 0 (0,73 TID). O tratamento BAC. TRA058893 apresentou o maior valor em 7 (2,43 TID) e os menores valores em -7 (0,90 TID), 0 (0,80 TID); estes últimos valores não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

O Tratamento ASM apresentou a maior área no tempo 7 (1,43 TID) nos tempos 0 (1,20 TID) e -7 (0,50 TID) foram alcançados os menores valores deste tratamento. O Fosfito de Cobre apresentou o maior valor de TID no tempo 0 (1,03 TID). Os menores valores de TID obtidos por este tratamento foram em -7 (0,40 TID) e 7 (0,43

TID) e estes valores não apresentaram diferenças estatísticas entre si com base no teste estatístico Tukey a  $p > 0,5$ . O tratamento Sulfato de Cobre quando aplicado em 7, apresentou os maiores valores de TID obtendo-se 0,83 de TID. Este tratamento apresentou os menores valores em 0 (0,63 TID) e -7 (0,43 TID).



**Figura 5.** Gráfico de barras representando a Taxa de Incremento do ISD% (TID) índice de severidade da doença ao longo do tempo (30 dias) dos diferentes tratamentos dentro da mesma variedade. Letras maiúsculas simbolizam diferenças estatísticas entre as médias dos diferentes tratamentos dentro de um mesmo tempo; letras minúsculas simbolizam diferenças estatísticas de um mesmo tratamento em tempos

diferentes com base no teste estatístico Tukey a  $p > 0,5$ . \*ASM = Acibenzolar-S-Metílico.

Neste ensaio, os tratamentos envolvendo a variedade `BRS Kiriris´ apresentaram maiores flutuações se comparado aos mesmos tratamentos em que a variedade “BRS Formosa “ foi submetida. O tratamento Controle apresentou TID de 1,77. Os tratamentos ASM (0) (1,87 TID), BAC. TRA058895 (7) (1,87 TID) e ASM (1,87 TID), foram os únicos tratamentos a apresentarem valores de TID superiores ao controle, porém, estes tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle segundo teste estatístico Tukey a  $p > 0,05$ . Todos os demais tratamentos apresentaram redução de TID quando comparado ao controle e diferenças estatísticas ao controle.

Analisando os mesmos tratamentos em diferentes tempos quando aplicados sobre a variedade `BRS Kiriris´, o tratamento BAC. TRA058895 alcançou o maior valor de TID quando aplicado no tempo 7 (1,87 TID). O tratamento BAC. TRA058895 apresentou os menores valores de TID nos tempos -7 (0,80 TID) e (0,77 TID), não apresentando diferenças estatísticas entre si. O tratamento BAC. TRA058893 apresentou o maior valor de TID em -7 (1,50 TID), e os menores valores em 0 (0,70 TID) e 7 (1,07 TID).

O tratamento ASM quando aplicado nos tempos 0 e 7, obteve 1,87 TID em ambos os tempos. O menor valor de TID foi obtido no tempo -7 (1,23 TID). O tratamento Fosfito de Cobre alcançou o maior valor de TID em 0 (1,07 TID) e os menores valores alcançados por este tratamento foi nos tempos -7 (0,07 TID) e tempo 7 (0,53 TID). O Sulfato de Cobre apresentou maior valor de TID em 7 (0,97 TID) e os menores valores foram obtidos nos tempos -7 (0,37 TID) e 7 (0,97 TID).

## **Discussão.**

### **Ensaio de Antibiograma.**

No ensaio de antibiograma, os tratamentos que apresentaram melhores resultados foram os reagentes baseados em cobre, exceto o Oxicleto de cobre, que não apresentou formação de halo em nenhuma concentração. Os íons de cobre são largamente conhecidos pela sua ação bactericida, sobretudo em relação ao gênero

*Xanthomonas* (MARQUES, et al. 2009). Além de reagir com a parede celular, os íons de cobre são efetivos na oxidação de EPS, inibindo a formação de biofilmes (DEPNER, et al., 2016). Os íons de cobre atuam oxidando os pentasacarídeos formadores da goma Xantana, inviabilizando a formação desse polissacarídeo que é um dos compostos majoritários do biofilme da *Xpm* (KEMP, et al., 2004). Em seus estudos com sais de cobre envolvendo *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, Maji (2009) demonstrou que há algumas cepas resistentes a estes íons, sobretudo ao Oxidocloreto de cobre. Estudos revelam que a concentração média inibitória mínima de Oxidocloreto de cobre foi 60 mg/L, no entanto, algumas cepas mostraram-se resistentes até a concentrações de 1800 mg/L (MAJI, et al., 2009). A ineficiência da ação de íons de cobre pode ser justificada pela mudança na composição dos biofilmes de algumas cepas de *Xanthomonas* spp. que promovem um meio ácido e inibem a ação de íons cúpricos (MAJI, et al., 2009). Algo que explica a ineficiência do Oxidocloreto de Cobre em relação aos demais sais de cobre envolvidos no estudo, é que este apresenta menor dissociação iônica, assim, este libera mais lentamente os íons de cobre quando comparado ao Sulfato de cobre e Fosfito de cobre (FONSECA, et al. 2019).

O ASM é um indutor de resistência agindo apenas de forma indireta sobre o patógeno, ao contrário do Fosfito de cobre, que apesar de ser considerado um indutor de resistência, libera íons de cobre que possuem ações bactericidas (CAVALCANTI, et al., 2006). Essa ação do ASM explica os resultados de não formação de halo de inibição no ensaio de antibiograma, sendo este o resultado esperado (DALLAGNOL et al., 2006).

### **Ensaio de Antagonismo por metabólitos secundários.**

Os metabólitos secundários são aqueles que não apresentam função no metabolismo primário do organismo, no entanto, podem também desempenhar importantes funções nos organismos que os produzem (KOHL, et al., 2019). Muitos desses metabólitos são tóxicos a outros organismos, porém os de interesse agrícola, são aqueles que não apresentam fitotoxicidade (NEWMAN, et al., 2017). Estes tendem a ser produzidos como mecanismos acessórios na competição pelo meio e apresentam pico de produção a partir do estabelecimento do microrganismo sobre o

meio (KOHL, et al., 2019). Neste estudo ficou claro que o organismo VTF-1 não apresentou metabólitos que inibissem o crescimento do *Xpm*.

*Bacillus* sp. são conhecidos amplamente pela sua capacidade de inibir diferentes espécies de patógenos como fungos do gênero *Fusarium* spp. e bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. (YESID, et a. 2012). No nosso estudo, os isolados de *Bacillus* sp. TRA 058895 e TRA 058895, apresentaram uma atividade de inibição interessante. O crescimento microbiano está associado diretamente à produção destes metabólitos e visualmente pelo ensaio de antagonismo biológico por metabólitos secundários, fica claro que estas culturas apresentaram maior crescimento que o VTF-1 (FIRA, et al., 2018). Bactérias do gênero *Bacillus* sp. são conhecidas pela seu rápido crescimento e alta capacidade de utilizar diferentes substratos. Essa versatilidade também pode ter sido um fator determinante para o sucesso destes isolados no experimento, pois no ensaio, utilizamos meios com fontes de carbono mais complexas, como extrato de levedura e peptona (RAIS, et al., 2017).

As Sufactina é um potente biosurfactante e metabólito secundário produzido por bactérias do gênero *Bacillus* sp.. Este composto auxilia o organismo a solubilizar substancias apolares no meio e em alguns casos, atuam de forma bactericida ao degradar paredes e membranas plasmáticas de outros organismos (ETEBERIAN, et al., 2006). Outro grupo biomolecular produzido em grandes quantidades por *Bacillus* sp. são as Iturinas, que são heptapeptídeos ligados a um ácido graxo e são também potentes biosurfactantes e biocidas (ONGENA, et al., 2008). Esta vasta capacidade de produção de metabólitos secundários associados à sua adaptabilidade aos diferentes meios, pode ter favorecido os *Bacillus* sp., isolados TRA 058895 e TRA 058895, no antagonismo contra a *Xpm*.

### **Avaliação da resistência à CBB em ambiente controlado *in vivo*.**

Neste ensaio, os tratamentos biológicos *Bacillus* sp., Isolados TRA 058895 e TRA 058893, mostraram melhores respostas quando aplicados sobre a variedade 'BRS Kiriris'. Em ambas as variedades ('BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'), estes tratamentos quando aplicados no tempo (-7), mostraram menores valores de AAC, sendo que os Tratamentos Kiriris TRA 058895 (-7) e Kiriris TRA 058893 (-7) apresentaram menores AAC que o tratamento Controle. No ensaio que envolveu a

variedade 'BRS Formosa', apenas o tratamento Formosa TRA 058893 (-7) apresentou AAC menor que o tratamento Formosa Controle. Estes mesmos tratamentos quando aplicados nos tempos (0) e (7) sobre a variedade 'BRS Formosa', aumentaram a AAC. A variedade 'BRS Kiriris' demonstrou mais tolerância quanto a este tratamento não demonstrando aumento de AAC, exceto no tratamento Kiriris TRA 058895 (7). A TID dos tratamentos apresentou resultado diferente, sendo menor quando os tratamentos biológicos foram aplicados no tempo (0). Este resultado foi o mesmo em ambas as variedades. O estudo também mostrou uma tendência de aumento da TID quando os tratamentos biológicos foram aplicados nos tempos (7).

Os dados obtidos com os controles biológicos de indução de resistência corroboram diversos estudos sobre controles biológicos, que estes quando aplicados de forma protetora, tendem a apresentar melhores resultados contra diferentes doenças. Neste estudo fica claro que ambos os tratamentos TRA 058895 e TRA 058893 quando aplicados nos tempos (-7), mostraram menores ISD (%) e consequentemente menores AAC. Na variedade 'BRS Kiriris', os tratamentos TRA 058895 (-7) e TRA 058893 (-7), apresentaram menores AAC em comparação ao controle, indicando assim que estes apresentaram uma ação protetora promissora. Além disso, as taxas de incremento foram menores nos tempos (-7) e (0). Porém no tempo (0), apesar de apresentar uma provável ação que conteve o avanço da doença sobre as plantas, estes não diminuíram a severidade da doença. Os controles biológicos, ao contrário dos agentes de controle químico e indutores de resistência, necessitam de um tempo para adequação ao meio, colonização de tecidos da planta e da rizosfera, produção de metabólitos secundários biocidas e ativação de defesas da planta; atividades fundamentais para inibir o crescimento de organismos patogênico ou atenuar o desenvolvimento da doença (RAIS, et al., 2017). Em contrapartida, os controles biológicos quando aplicados sobre plantas que já apresentam sintomatologia, podem se comportar como saprofíticos ou organismos oportunistas e isto pode explicar o fato dos valores TID e ACC serem maiores em ambas as variedades quando os agentes biológicos foram aplicados em período pós inoculação, tempo (7). Estes valores de taxa de incremento indicam que quando aplicado pós infecção, os controles biológicos testados neste estudo apresentaram tendência de aumentar a velocidade da propagação da doença sobre o hospedeiro.

O ASM não é um agente químico considerado como biocida, assim, não atua diretamente sobre o patógeno, e sim contra o patógeno de forma indireta por meio da ativação de defesas da planta (NASCIMENTO, et al., 2007). As respostas ativadas não são específicas contra um dado patógeno, assim, um dos efeitos fitotóxicos do ASM é que este pode levar a uma sobrecarga metabólica na planta tornando-a mais suscetível à doença nos primeiros momentos pós aplicação (SOBRINHO, et al., 2005). Quando submetida ao ASM as plantas também tendem a um acúmulo e aumento considerado de fenóis que podem, em grande, quantidade lesionar células e tecidos vegetais (FURTADO, et al., 2010).

Por ter uma ação fisiológica similar ao Ácido Salicílico, o ASM atua ativando respostas do tipo SAR e a depender da dose em que for aplicado, pode ativar estas respostas de forma aguda, desencadeando efeitos fitotóxicos (FERNANDES, et al., 2010). Um dos efeitos colaterais do uso do ASM é amarelecimento e desfolha severa. Este composto é utilizado em diferentes culturas, inclusive como a Mancha Bacteriana do Tomateiro (*Xanthomonas vesicatoria*) (CAVALCANTI, et al., 2006). Existem poucos estudos em relação ao uso de ASM em mandioca, no entanto, os existentes recomendam seu uso contra patógenos radiculares, sendo aplicados com um mínimo um mês antes da infecção (MEDEIROS, 2017). O agente químico ASM apresentou acréscimo sensível na severidade da doença, representando o aumento da AAC em quase todos os tempos, exceto no tratamento Kiriris ASM (7), onde não apresentou diferença estatística com o tratamento Kiriris Controle. Entretanto, corroborando os estudos, o ASM quando aplicado no tempo (-7) em ambas variedades, apresentou menores valores de TID sugerindo que quando aplicado de forma protetora, tende ao melhor controle sobre a evolução da doença no hospedeiro.

O Fosfito de Cobre é um indutor de resistência largamente utilizado pela sua ativação de respostas locais através da indução da produção de fitoalexinas, principalmente em tecidos fotossintetizantes (SCHROETTER, et al., 2010). O Fosfito de cobre, além de ser um potencial agente biocida, é um fertilizante foliar, pois repõem a demanda de fósforo na planta de forma facilitada, uma vez que possui fósforo hidrolisado (NASCIMENTO, et al., 2007). Além dessa ação nutricional e de indução de resistência, o Fosfito de cobre pode atuar inibindo o crescimento do patógeno em menor nível por conter íons cúpricos na sua constituição (CARDUCCI, et al., 2019). Neste estudo, o Fosfito de cobre se apresentou promissor principalmente quando

aplicado nos tempos (-7) e (0), apresentando os menores valores de AAC em ambas as variedades. Além disto, apresentou os menores valores de TID em todos os tratamentos, inclusive na variedade suscetível apresentando uma leve ação curativa ao obter valor de TID menor que o tratamento Kiriris Controle.

O Sulfato de Cobre como controle químico, atua diretamente sobre o patógeno inibindo seu crescimento pelas ações provenientes de íons cúpricos, que são a oxidação de parede celular e matriz extracelular e inibição enzimática, entre outros (ROLANDO, et al., 2019). Apesar de sua ação de largo espectro sobre diferentes patógenos, os sais cúpricos não são absorvidos em grandes quantidades pelas plantas, apresentando ação deficitária contra o patógeno, caso este já esteja colonizando tecidos da planta (LA TORRE, et al., 2018). Estas características do Sulfato de Cobre corroboram a sua ineficiência no tempo (7), onde foram obtidos os maiores valores de AAC e TID nas plantas submetidas a este tratamento. Isto sugere que o Sulfato de Cobre não é ideal para o uso de forma curativa. O tratamento Kiriris Sulfato de Cobre (-7) apresentou menores valores de AAC e TID, sugerindo que este é um controle químico com potencial ação protetora contra a CBB. Devido à baixa toxicidade que o Sulfato de cobre alcançou neste estudo, é correto supor que novos estudos com doses mais concentradas de Sulfato de cobre possam apresentar melhores resultados quanto a uma ação protetora e erradicante.



## Conclusão.

- O Fosfito de cobre e Sulfato de cobre mostraram ação inibitória *in vitro* contra a *Xpm*.
- Os isolados *Bacillus* sp. TRA058895 e TRA 058893 mostraram ação antagonista mediada por metabólitos secundários contra a *Xpm*.
- O Ensaio de controle químico e biológico *in vivo* revelaram que o Fosfito de cobre possui ação potencial no controle da CBB atuando de forma satisfatória como erradicante e protetor.
- O Fosfito de Cobre também apresenta uma leve atividade curadora na planta submetida a CBB.
- Os agentes de controle biológico, *Bacillus* sp. TRA058895 e TRA 058893, mostraram uma considerável redução da severidade da doença sobre a Variedade Kiriris, no entanto, estes devem ser mais estudados quanto sua forma de uso e em quais variedades de mandioca estes podem ser aplicados.
- O Sulfato de Cobre mostrou uma possível ação erradicante e protetora devido aos seus valores de TID apresentados neste estudo, no entanto, mais estudos devem ser conduzidos, onde doses mais concentradas do Sulfato de Cobre deverão ser usadas.
- O ASM apresentou acréscimo da severidade da doença, no entanto, por não haver muitos estudos destes aplicados em mandioca, o mesmo pode ser considerado para estudos futuros em que doses de menor concentração de ASM sejam aplicadas na planta.
- As variedades Formosa e Kiriris mostraram-se tolerantes ao Fosfito de cobre e Sulfato de cobre, indicando que estes podem ser aplicados sobre mandioca em estudos futuros podendo ser usados em maiores concentrações.

## Material Complementar.

**Tabela 4.** Análise de variância (ANOVA) da Área abaixo da curva (AAC) do ensaio de avaliação da resistência à CBB em ambiente controlado *in vivo*, variedade 'BRS Formosa'. (FV) Fator de Variação, (GL) Graus de Liberdade, (SQ) Soma total dos Quadrados, (QM) Quadrado médio, (CV) Coeficiente de Variação, (Fc) Razão da variação entre médias e amostra pela variação dentro das amostras, (PR) Valor de P.

| FV                    | GL           | SQ             | QM            | Fc     | Pr > Fc |
|-----------------------|--------------|----------------|---------------|--------|---------|
| Tempo                 | 2            | 832771.534722  | 416385.767361 | 8.153  | 0.0014  |
| Tratamento            | 5            | 4322252.701389 | 864450.540278 | 16.926 | 0.0000  |
| Tempo x<br>Tratamento | 8            | 2152726.909722 | 269090.863715 | 5.269  | 0.0003  |
| Erro                  | 32           | 1634361.333333 | 51073.791667  |        |         |
| Total corrigido:      | 47           | 8942112.479167 |               |        |         |
| CV (%) =              | 18,50        |                |               |        |         |
| Média Geral:          | 1221.7708333 |                |               |        |         |

**Tabela 5.** Análise de variância (ANOVA) da Área abaixo da curva (AAC) do ensaio de avaliação da resistência à CBB em ambiente controlado *in vivo*, variedade Kiriris. (FV) Fator de Variação, (GL) Graus de Liberdade, (SQ) Soma total dos Quadrados, (QM) Quadrado médio, (CV) Coeficiente de Variação, (Fc) Razão da variação entre médias e amostra pela variação dentro das amostras, (PR) Valor de P.

| FV                    | GL           | SQ             | QM            | Fc      | Pr > Fc |
|-----------------------|--------------|----------------|---------------|---------|---------|
| Tempo                 | 2            | 313124.112500  | 156562.056250 | 107.698 | 0.0000  |
| Tratamento            | 5            | 3320614.868056 | 664122.973611 | 456.847 | 0.0000  |
| Tempo x<br>Tratamento | 8            | 1607518.331944 | 200939.791493 | 138.226 | 0.0000  |
| Erro                  | 32           | 46518.666667   | 1453.708333   |         |         |
| Total corrigido:      | 47           | 5287775.979167 |               |         |         |
| CV (%) =              | 3,40         |                |               |         |         |
| Média Geral:          | 1120.5208333 |                |               |         |         |

**Tabela 6.** Análise de variância (ANOVA) da Taxa de Incremento (TID) da Doença do ensaio de avaliação da resistência à CBB em ambiente controlado *in vivo*, variedade Formosa. (FV) Fator de Variação, (GL) Graus de Liberdade, (SQ) Soma total dos Quadrados, (QM) Quadrado médio, (CV) Coeficiente de Variação, (Fc) Razão da variação entre médias e amostra pela variação dentro das amostras, (PR) Valor de P.

| FV                    | GL        | SQ        | QM       | Fc      | Pr > Fc |
|-----------------------|-----------|-----------|----------|---------|---------|
| Tempo                 | 2         | 3.007200  | 1.503600 | 145.568 | 0.0000  |
| Tratamento            | 5         | 4.391992  | 0.878398 | 85.041  | 0.0000  |
| Tempo x<br>Tratamento | 8         | 5.523422  | 0.690428 | 66.843  | 0.0000  |
| Erro                  | 32        | 0.330533  | 0.010329 |         |         |
| Total corrigido:      | 47        | 13.253148 |          |         |         |
| CV (%) =              | 10,56     |           |          |         |         |
| Média Geral:          | 0.9627083 |           |          |         |         |

**Tabela 7.** Análise de variância (ANOVA) da Taxa de Incremento (TID) da Doença do ensaio de avaliação da resistência à CBB em ambiente controlado *in vivo*, variedade Kiriris. (FV) Fator de Variação, (GL) Graus de Liberdade, (SQ) Soma total dos Quadrados, (QM) Quadrado médio, (CV) Coeficiente de Variação, (Fc) Razão da variação entre médias e amostra pela variação dentro das amostras, (PR) Valor de P.

| FV                    | GL        | SQ        | QM       | Fc     | Pr > Fc |
|-----------------------|-----------|-----------|----------|--------|---------|
| Tempo                 | 2         | 1.806681  | 0.903340 | 11.018 | 0.0002  |
| Tratamento            | 5         | 7.595658  | 1.519132 | 18.530 | 0.0000  |
| Tempo x<br>Tratamento | 8         | 2.368569  | 0.338367 | 4.127  | 0.0023  |
| Erro                  | 32        | 2.705483  | 0.081984 |        |         |
| Total corrigido:      | 47        | 14.476392 |          |        |         |
| CV (%) =              | 27,02     |           |          |        |         |
| Média Geral:          | 1.0595833 |           |          |        |         |

## Referências.

- ASLANI, M.; HARIGHI, B.; ABDOLLAHZADEH, J. Screening of endofungal bacteria isolated from wild growing mushrooms as potential biological control agents against brown blotch and internal stipe necrosis diseases of *Agaricus bisporus*. **Biological Control**, v. 119, n. July 2017, p. 20–26, 2018. Disponível em: DOI.10.1016/j.biocontrol.2018.01.006
- AHMED, S.; EZZIYYANI, M.; SÁNCHEZ, C.; CANDELA, M. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. **European Journal of Plant Pathology**. v. 109, p. 633-637, 2003.
- BIANCHI, L.; BATISTA, T.; GERMINO, G.; CARBONARI, C. Ácido salicílico e acibenzolar-S-methyl como atenuadores de fitointoxicação causada pelo chlorimuron-ethyl na cultura da soja (2019). **Revista de Ciências agrárias**. v.42, n.2, 2019 DOI.org/10.19084/rca.16051
- BORIN, R.; POSSENTI, J.; REY, M.; BERNARDI, C.. Fosfitos associados a fungicidas para controle de doenças e sanidade de sementes de milho. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**. v.10, n.1, p.83-92, 2017. DOI.10.5935/PAeT.V10.N1.09
- CARDUCCI, F.; ANDREAZI, E.; PEREIRA, C.; PEREIRA, N.; SILVA, A.. **Resistência parcial da cultivar IPR 103 e Fosfito de cobre no controle integrado da Ferrugem Alaranjada do cafeeiro**. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. n. X, ano. 2019, Vitória, Espírito Santo, Anais do X Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, p. 112-118. Disponível em < [www.consorcioquesquisacafe.com.br/ojs/index.php/SimpósioCafe2019/article/view/555](http://www.consorcioquesquisacafe.com.br/ojs/index.php/SimpósioCafe2019/article/view/555)>.
- CARMONA, M; SAUTUA, F.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, O. Copper phosphite enhances efficacy of a strobilurin-triazole fungicide in controlling late season foliar diseases of soybean (2019). **Crop Protection**. v. 115, p. 130-734, 2019. DOI.org/10.1016/j.cropro.2018.09.019.
- SCHWARTZ; D.. Management of Xanthomonas Leaf Blight of Onion with a Plant Activator, BioLog ical Control Agents, and Copper Bactericides (2007). **The American Phytopathological**. v.1, n. 12, p. 1234-1241, 2007. DOI.org/10.1094/PD-89-0631.
- DALLAGNOL, L.; NAVARINI, L.; UGALDE, M.; BALARDINI, R.; CATELLAM, R. Utilização de Acibenzolar-S-Methyl para Controle de Doenças Foliaves da Soja (2006). **Summa Phytopathologica**. v. 32, n. 3, P. 255-259, 2006. Disponível em: < [/www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-54052006000300007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052006000300007) >.
- FERNANDES, H.; RESENDE, M.; COSTA, B.; BELUTI, H. **Ativador de resistência ASM (BION) no controle da Ferrugem (Hemileia vastatrix) na cultura do cafeeiro ( Coffea arabica L .) em campo**. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. n. IV, ano 2009, Vitória, Espírito Santo, Anais do IV Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, p. 96-112 Disponível em <[www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/2699/304.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/2699/304.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>.

FLORES, C.; ZARATE, C.; TRIPLETT, L.; MAILLOT-LEBON, V.; MOUFID, Y.; KANTÉ, M. 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**. n. 2, v. 12, 2018. DOI:10.1016/j.apsoil.2018.12.011flo.

FONSECA, A. GOES, A.; PEREIRA, F. Copper Oxychloride applied alone to control citrus black spot (2019). **Revista Caatinga**. v. 32, n. 3, p. 616-624, 2019. DOI.org/10.1590/1983-21252019v32n306rc.

FIRA, D.; DIMKIC, I.; TANJA, B.; LOZO, J.; SATANKOVIC, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**. v. 285, n.10, p. 44-55, 2018. DOI.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044.

GARCIA, A.; Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos (1999). **Folheto informativo da EMBRAPA**. Disponível em: <[www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/704072/fungicidas-i-utilizacao-no-controle-quimico-de-doencas-e-sua-acao-contra-os-fitopatogenos](http://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/704072/fungicidas-i-utilizacao-no-controle-quimico-de-doencas-e-sua-acao-contra-os-fitopatogenos)> .

HAN, L.; WANG, Z.; LI, N.; WANG, Y.; *Bacillus amyloliquefa* ciens B1408 suppresses Fusarium wilt in cucumber by regulating the rhizosphere microbial community. **Applied soil ecology**. v. 136 pg.55–66, 2019. DOI.org/10.1016/j.apsoil.2018.12.011.

LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**. v. 6, p. 62-78, 2005. DOI.org/10.1005/j.BMCB.2005.12.011

IFTIKHAR, Y.; SAJID, A.; SHAKELL, Q.; AHMAD, Z.; UL HAQ, Z. Biological Antagonism: A Safe and Sustainable Way to Manage Plant Disease. **Plant Disease Management** v. 12, n. 8, p. 83-109, 2020. DOI.org/10.1007/978-3-030-35955-3\_5

TOFOLLI, J.; MELLO, P.; DOMINGUES, R. Ação protetora, residual, curativa e anti esporulante de fungicidas no controle da requeima e da pinta preta da batata em condições controladas (2012). **Instituto de biologia – USP**. v. 79, n. 2, p.209-221, 2012. Disponível em: <[www.scielo.br/pdf/aib/v79n2/a09v79n2.pdf](http://www.scielo.br/pdf/aib/v79n2/a09v79n2.pdf)>

KEMP, B.; HORNE, J.; BRYANT, A.; COOPER, R. *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* gumD gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 64, n. 4, p. 209–218, 2004, DOI.10.1016/j.pmpp.2004.08.007.

KOHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSVBERG, W. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. **Plant science**. v. 10, n. 845, 2019. DOI.org/10.3389/fpls.2019.00845

LA TORRE, A.; IOVINO, V.; CARADONIA, F. Copper in plant protection: current situation and prospects. **Phytopathologia Mediterranea**. v.57, n. 2, p. 201-236, 2018. DOI:10.1111/j.201-236X.3404.00722.x.

LE MAY, C.; POTAGE, G.; ANDRIVON, D.; TIVOLI, B.; OUTREMAN, Y. Plant Disease Complex: Antagonism and Synergism Between Pathogens of the *Ascochyta blight complex* on Pea (2009). **Journal of Phytopathology**. v. 157; n. 12, p. 456-462, 2009. DOI.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01546.x.

McKINNEY, H.; ECKERSON, S.; WEBB, R. The intracelular bodies associated with the rosette disease and a mosaic like leaf mottling of wheat. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, p.605-608, 1923.

MELNICK, R.; ZIDACK, N.; BAILEY, B.; MAXIMOVA, S.; GUILTINAN, M. BACKMAN, P. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. **Biological Control**. v. 46, n. 1, pp. 46-56, 2008. DOI.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.022.

MEJIA, C.; FARFÁN, D.; MONTANA, J.; RESTREPO, S.; JIMÉNEZ, P.; DANIES, G.; BOCANEGRA, M.. Acibenzolar-S-methyl induces protection against the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **Journal of Plant Diseases and Protection**. v. 12, n. 125, p.112-125, 2021. DOI.org/10.1007/s41348-021-00427-0

MCCALLUM, E.; ANJANAPPA, R.; GRUISSEM, W. Tackling agriculturally relevant diseases in the staple crop cassava (*Manihot esculenta*). **Current Opinion in Plant Biology**, v. 38, p. 50–58, 2017. DOI.org/10.1016/j.pbi.2017.04.008.

MBARINGONG, G., NYABOGA, E.; WANG, V.; KANDUMA, E.. Evaluation of Selected Cassava ( *Manihot esculenta* Crantz ) Cultivars Grown in Kenya for Resistance to Bacterial Blight Disease. **World Journal of Agricultural Research**. v. 5, n. 2, p. 94–101, 2017. DOI.org/10.1017/j.wjar.2017.02.012.

MONTEIRO, L.; MARIANO, R.; MAIOR, A.. Antagonism of *Bacillus* spp. Against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.48, n. 1, p. 23-29, 2006. Disponível em: < [www.scielo.br/pdf/babt/v48n1/a04v48n1.pdf](http://www.scielo.br/pdf/babt/v48n1/a04v48n1.pdf)>

NASCIMENTO, Abadia; FERNANDES, Paulo; ROCHA, Mara; SILVA, Edgar. Source of Potassium Phosphite and Acibenzolar-S-Metil on the Disease Control and Yield of the Tomato Crop. **Journal of Bioscience**. v. 24, n. 1, p. 53–59, 2008. DOI.org/12.1022/j.jb.2008.02.032.

OLIVEIRA, S.; SILVA, M.; SANTOS, V.; OLIVEIRA, J. Metodologia de seleção rápida para a avaliação da resistência de genótipos de mandioca a doenças foliares incitadas pelo complexo *Passalora* spp. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – EMBRAPA**. n. 79, 2016. Disponível em: < [www.researchgate.net/publication/307557985](http://www.researchgate.net/publication/307557985)>.

OLIVEIRA, S.; SANTOS, J.; GUZZO, S. Efeito da chuva sobre a tenacidade e eficiência de fungicidas cúpricos associados ao óleo vegetal no controle da ferrugem do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 27, n. 6, 2002. DOI.10.1007/978-3-030-35955-3\_5.

Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), Produzir mais com menos: Mandioca. [www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/pt/index.html](http://www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/pt/index.html), 2018.

PEREIRA, V.; RESENDE, M.; JÚNIOR, P.; REGINA, M.; MOTA, R.; VITORINO, L. Fosfito de potássio no controle do míldio da videira e características físico-químicas

de uvas Merlot. **Pesquisa agropecuária Brasileira**. v. 47, n. 11, p. 1581-1588, 2012. Disponível em: <[www.scielo.br/pdf/pab/v47n11/47n11a04](http://www.scielo.br/pdf/pab/v47n11/47n11a04)>.

PERUCH, L.; BRUNA, E., Relação entre doses de calda bordalesa e de fosfito potássico na intensidade do míldio e na produtividade da videira cv. **Ciência Rural de Santa Mária**. v. 38, n.9, p2413-2418. DOI.org/10.1590/S0103-84782008000900001

RAIS, Á.; JABEEN, Z.; SHAIR, F.; HAFEEZ, F.; HASSAN, M. *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. **Plos one**. n. 21, 2017. DOI.org/10.1371/journal.pone.0187412.

ROLANDO, C.; SOMCHIT, C.; BADER, M.. Can copper be used to treat foliar *Phytophthora* infections in *Pinus radiata*?. **APS Publications**. v. 103, p. 1828-1834, 2019. DOI.org/10.1094/PDIS-07-18-1247-RE

QUINTERO, A.; PÉREZ-QUINTERO, A. L.; LÓPEZ, C. Identification of ta-siRNAs and Cis-nat-siRNAs in Cassava and their roles in response to Cassava Bacterial Blight. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 11, n. 3, p. 172–181, 2013. DOI.10.1016/j.gpb.2013.03.001

STURZ, A.; CARTER, M.; JOHNSTON, H. A review of plant disease, pathogen interactions and microbial antagonism under conservation tillage in temperate humid agriculture. **Soil and Tillage Research**. v. 41, n. 4, p. 169-189. DOI.org/10.1016/S0167-1987(96)01095-1.

SUN, Z.; YANG, L.; HAN, Z.; YANG, L.; CHENG, L. Biological control ginseng grey mold and plant colonization by antagonistic bacteria isolated from rhizospheric soil of *Panax ginseng* Meyer(2019). **Biological Control**. n. 138, (2019) DOI.10.1016/j.apsoil.2018.11.104048.

SYNGENTA, Bula BION 500WG. 2020. Disponível em: < [www.syngenta.com.br/sites/g/files/zhg256/f/bion\\_500\\_wg\\_0.pdf?token=1601297191](http://www.syngenta.com.br/sites/g/files/zhg256/f/bion_500_wg_0.pdf?token=1601297191)>.

WULFF, E.; MGUNI, C.; MORTENSEN, C.; KESWANI, C.; HOCKENHULL, J. Biological control of Black Rot (*Xanthomonas Campestris* pv. *campestris*) of Brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus Subtilis* in Zim babwe (2002). **European Journal of Plant Pathology**. v. 108, n. 14, p. 317-325. DOI.10.1023/A:1015671031906

YESID, A.; LIGIA, S. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. **Publicación Científica en Ciencias Biomédicas**. v.10, n. 18, p.149-150. Disponível em:<[hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/1003/1001](http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/1003/1001)>.

VAGAS, Luis; MARTINEZ, Sandra. Importancia del método estadístico para el cálculo de la CE50 y CE95 de algunos isotiocianatos evaluados contra *Rhizoctonia solani* Kühn. **Agronomía Colombiana**. v. 28, n 2, 235-244, 2010. Disponível em:<[www.scielo.org.co/pdf/agc/v28n2/v28n2a13.pdf](http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v28n2/v28n2a13.pdf)>

---

### **CAPÍTULO III**

**Avaliação da expressão de genes candidatos à resistência de  
genótipos contrastantes de mandioca contra a bacteriose  
(*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*)**

---



**Avaliação da expressão de genes candidatos à resistência de genótipos contrastantes de mandioca contra a bacteriose (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*).**

**Fernando Mattos Gonzalez<sup>a,b</sup>(Brasil, fernandoluizm@ufrb.edu.br), Saulo Alves Santos de Oliveira<sup>a,c</sup>(Brasil, Saulo.oliveira@embrapa.br), Claudia Fortes Ferreira<sup>c</sup>(Brasil, claudia.ferreira@embrapa.br).**

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, CEP 44300-000, Brasil

<sup>b</sup> Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas BA, CEP 44300-000, Brasil

<sup>c</sup> Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000, Brasil.

## **Resumo.**

A Bacteriose da mandioca (CBB), é uma das doenças mais importantes da parte aérea da mandioca (*Manihot esculenta*). O agente causal da CBB é a *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*), onde a principal forma de controle desta doença, é pelo uso de variedades resistentes. Avaliar genes possivelmente associados à resistência é extremamente importante para o entendimento dos mecanismos que levam uma dada variedade a superar uma doença. Este tipo de avaliação demonstra de forma quantitativa, os mecanismos moleculares envolvidos na resistência. No presente estudo foram avaliadas a expressão gênica das variedades comerciais, 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris' consideradas respectivamente, resistente e suscetível à CBB. As plantas foram inoculadas com *Xpm* e avaliadas pelo período de 30 dias, com avaliações quanto à sintomatologia executadas em intervalos de 48 horas. Foram colhidas amostras foliares nos tempos 0, 12, 24, 48, 72 e 144 horas. Foram analisados diferentes genes candidatos via RT-qPCR. Genes associados à resistência da parede celular (MANES.04G096600), à indução do amadurecimento (MANES.14G034600), a expressão do fitohormônio Etileno (MANES.11G013700) e à regulação positiva do citocromo P450 (MANES.12G132900), apresentaram diferenças de expressão entre a variedade suscetível e resistente.

**Palavras chaves.** *Xpm*, resistência vegetal, resistência celular, indução de amadurecimento, citocromo P450.

## **Evaluation of the expression of candidate genes for resistance of contrasting cassava genotypes against bacteriosis (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*).**

### **Abstract.**

Cassava Bacterial blight (CBB) is one of the most important diseases of the aerial part of cassava (*Manihot esculenta*). The causative agent of CBB is *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Xpm). The main form of control of this disease is by the use of resistant varieties. Assessing genes possibly associated with resistance is extremely important to understand the mechanisms that lead a given variety to overcome a disease. This type of evaluation traces in a quantitative way of the molecular mechanisms involved in resistance. In the present study, the gene expression of the commercial varieties, 'BRS Formosa' and 'BRS Kiriris', resistant and susceptible to CBB, respectively, were evaluated. The plants were inoculated with Xpm and evaluated for a period of 30 days and observed for symptoms at intervals of 48 hours. Leaf samples were collected at times 0, 12, 24, 48, 72 and 144 hours. Different candidate genes were analyzed via RT-qPCR. Genes associated with cell wall resistance (MANES.04G096600), maturation induction (MANES.14G034600), ethylene phytohormone expression (CK64951) and positive regulation of cytochrome P450 (MANES.12G132900) showed differences in expression between the susceptible and resistant variety.

**Keywords.** Xpm, plant resistance, cell resistance, ripening induction, cytochrome P450.

## Introdução.

Pela sua grande produtividade por área, grande capacidade nutricional e manejo rústico, a mandioca, (*Manihot esculenta*), é uma das culturas mais importantes do mundo, sobretudo em países em desenvolvimento onde é essencial para o combate à fome (FAO, 2013). Apesar da sua grande importância, a cultura ainda enfrenta grandes perdas causadas pela exaustão do solo, pragas e doenças, sendo estes os principais desafios a serem vencidos para a retomada do crescimento da produção mundial (GROXKO, 2019). Uma das principais doenças de parte aérea da mandioca é a Bacteriose (CBB) (FARNOU, et al., 2018). O agente causal da bacteriose é *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (*Xpm*) (FARNOU, et al., 2019). As vias de entrada da bactéria na planta são por aberturas naturais como estômatos, hidatódios ou feridas. Patógeno primeiramente coloniza as folhas podendo colonizar até tecidos vasculares em estágios mais desenvolvidos da doença (DANIA, et al., 2019). A planta infectada pode não apresentar os sintomas característicos da CBB e seu material pode ser utilizado no cultivo, aumentando assim, a disseminação da doença no campo (MELO, et al., 2019). A principal forma de controle da doença é pelo uso de variedades resistentes associado a boas práticas de manejo cultural (VÉRDIER, 2012)

Atualmente a principal forma de seleção de variedades resistentes à CBB é baseada em ensaios fisiológicos na qual plantas de mandioca são submetidas ao patógeno, com posterior avaliação da sintomatologia desenvolvida pela planta (OLIVEIRA, et al., 2017). Nestes ensaios são avaliadas características fenotípicas e a fisiologia da planta. Apesar de serem avaliações confiáveis. Estas não possibilitam a demonstração dos mecanismos moleculares associados à resistência (NYABOGA, et al., 2017). Com o avanço de novas técnicas de avaliação moleculares cresce a tendência da avaliação de resistência em nível molecular e assim esta passa a se basear na análise da expressão de genes associados a resistência em plantas submetidas a uma dada doença (LI, et al., 2017).

Existem vários mecanismos de resistência em plantas contra a doenças, como defesas pré-formadas, respostas de hipersensibilidade e respostas ativadas pelo patógeno entre outros (GOYAL, et al, 2014). Genes descritos em organismos modelos

como CK648501 (MANES.16G007300), regulador do estresse oxidativo ou o CK646852 (MANES.12G132900), associado à regulação da enzima Citocromo P450 que atua na inibição de toxinas, são fundamentais para impedir os processos infecciosos e inibição de danos a tecidos de plantas. Outro fator que pode conferir resistência, é o controle de hormônios associados ao amadurecimento e mobilização de reservas energéticas, como o gene CK647182 (MANES.14G034600), associado à indução de amadurecimento e o gene CK649651 (MANES.11G013700) que é um fator de ativação da via de síntese do fitohormônio Etileno (LOPEZ, et al., 2015).

Mudanças estruturais também podem ser decisivas para complementação da resistência, principalmente em se tratando de patógenos intracelulares (LOPEZ, et al., 2015). Um gene associado a este comportamento fisiológico, é o gene CK643002 (MANES.04G096600), que é um regulador positivo da enzima Xiloglucano endotransglicosilase, que atua afrouxando as fibras de celulose constituintes da parede celular (NIRAULA, et al., 2021). As respostas que conferem resistência a parede celular permitem as células constituintes de um tecido inibir a entrada do patógeno e conter danos oriundos de desequilíbrio osmótico. Além dos genes de resposta indireta, enzimas direcionadas a patógenos são fundamentais para redução da infecção do patógeno e inibição de organismos oportunistas (COSTA, et al., 2010). O gene CK645438 (MANES.06G155600) é um regulador positivo da síntese da Quitinase III, enzima que é acionada mediante uma resposta mais tardia e atua principalmente sobre patógenos fúngicos, porém, pode atuar também contra patógenos bacterianos (LOPEZ, et al., 2015)

É crescente o interesse na busca de novos genes associados a resistência a fim de se montar bancos de informações gênicas que possibilitem a seleção de variedades resistentes de uma forma mais rápida e precisa (ALZATE-MARIN, et al., 2005). Com estes bancos de informações genéticas, técnicas como o uso de marcadores moleculares podem ser utilizadas a fim de se avaliar de forma direcionada o conteúdo gênico de uma dada variedade e a presença ou não de genes candidatos à resistência (NARESH, et al., 2019). Pela sua versatilidade, os marcadores moleculares podem ser utilizados para diferentes fins, como identificar sequências genéticas, proteínas e enzimas, entre outros (ALZATE-MARIN, et al., 2005).

Apesar da sua versatilidade, os marcadores moleculares não são os mais adequados para estudar flutuações de expressão dos genes; informação fundamental para se entender o comportamento destes e determinar a sua associação com uma possível resistência (NARESH, et al., 2019). Para um estudo minucioso da expressão gênica, utiliza-se a técnica de RT-qPCR. Esta técnica traça um perfil interessante de expressão gênica na validação da associação de um genoma com a resistência (HOUNGUE, et al., 2019).

O estudo do comportamento destes genes em plantas inoculadas ao longo do tempo é essencial para determinar genes com possíveis ações protetoras e entender como a planta se comporta sob a infecção (LOPEZ, et al., 2005). O presente estudo visa mensurar, por RT-qPCR, o perfil de expressão de genes candidatos em plantas que desenvolveram sintomas característicos da CBB. Esta mensuração é essencial como estudos prévios, e pode revelar possíveis genes candidatos associados à resistência à CBB. Estes genes, futuramente, ao compor bancos de informações genéticas, podem ser utilizados na predição de resistência através de técnicas de análise do genótipo e da transcriptômica, poupando tempo e permitindo a produção variedades cada vez mais resistentes à CBB. Bancos de informação genética são fundamentais para estudos de melhoramento e de resistência pois permitem a melhor identificação de variedades e espécies resistentes a uma doença mediante ao seu conteúdo gênico (PAULA, et al., 2010).

Neste estudo, duas variedades de mandioca com diferentes níveis de resistência à CBB, BRS Kiriris (suscetível) e BRS Formosa (resistente), foram cultivadas e inoculadas com *Xpm* com posterior avaliação qualitativa da evolução da doença ao longo de 30 dias em intervalos de 48 horas. Amostras de tecido foliar foram colhidas nos tempos, 0h, 12h, 24h, 48h, 72h e 144h e a expressão genica analisada via RT-qPCR. Neste estudo foram avaliados os genes MANES.12G132900, MANES.14G034600, MANES.11G013700, MANES.04G096600, MANES.06G155600 possivelmente associados a diferentes mecanismos de resistência contra a CBB (LIMA, et al., 2018; LOPEZ, et al., 2005; REIS, et al., 2012).

## **Materiais e Métodos.**

### **Ensaio de resistência vegetal**

Para este ensaio foi utilizada a metodologia desenvolvida por Mbaringong, et al. (2017) com as devidas adequações. Variedades comerciais de mandioca `BRS Kiriris´ e `BRS Formosa´ oriundas do campo de cultivo de mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura no município de Cruz das Almas, Bahia, foram utilizadas. As plantas foram propagadas por via vegetativa com o uso de manivas e cultivadas em casa de vegetação por um período de 2 meses para que houvesse o desenvolvimento pleno das partes aéreas das plantas. Em seguida, as plantas foram removidas para sala climatizada no Laboratório de Análise de Amido e Derivados de Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, onde foram submetidas a controle de temperatura ( $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo (12 horas de iluminação) para o melhor desenvolvimento da bacteriose.

As plantas foram inoculadas com a bactéria *Xpm* isolado 1502 4.1, cedidas pelo banco de bactérias fitopatogênicas da Embrapa Mandioca e Fruticultura. A suspensão do inóculo foi preparada com absorvância a 0,01 DO<sub>600</sub> de *Xpm* e com concentração de 20 Mmol de MgCl<sub>2</sub>. A inoculação foi realizada por perfuração com ponteira autoclavada na base da terceira folha contada de cima para baixo e em cada planta foram injetados 200 µL da suspensão bacteriana.

O ensaio de resistência vegetal foi conduzido por 30 dias. Os delineamentos experimentais foram em blocos casualizados e os blocos divididos em plantas inoculadas e plantas não inoculadas. Em cada bloco foram utilizadas duas variedades de mandioca, `BRS Formosa´ e `BRS Kiriris, com dose plantas de cada variedade em esquema fatorial 4x3. As plantas foram avaliadas em intervalos de 48 horas. Foram avaliados diferentes parâmetros (Tabela 1) cujos valores foram usados no cálculo do índice de severidade da doença (ISD%) (Equação 1).

$$ISD(\%) = \frac{\sum(n \text{ de plantas adoecidas que apresentaram o mesmo score} \times \text{score desta categoria})}{(n^{\circ} \text{ total de plantas} \times \text{score da categoria máxima}) \times 100}$$

**Equação 1.** Equação para cálculo do índice de severidade da doença (MCKINNEY, et al., 1923).

**Tabela 1.** Escala de notas de acordo com a sintomatologia desenvolvida pelas plantas.

| <b>Escore</b> | <b>Parâmetros para avaliação</b>                                      |
|---------------|---|
| <b>0</b>      | Plantas saudias   |
| <b>1</b>      | Amarelecimento no terço inferior                                      |
| <b>2</b>      | Amarelecimento do terço médio – lesões de requeima ou manchas aquosas |
| <b>3</b>      | Amarelecimento de toda a planta com necrose                           |
| <b>4</b>      | Murcha de toda planta com necrose                                     |
| <b>5</b>      | Murcha acompanhada de morte   |

### **Extração do RNA total**

Amostras foliares foram coletadas nos tempos, 0h, 12h, 24h, 48h, 72h, 144h após a inoculação. As folhas foram colocadas individualmente em envelopes de folhas de alumínio e armazenadas em ultra freezer -80°C. Os materiais dos controles foram colhidos nos mesmos períodos das plantas inoculadas. Utilizou-se a metodologia desenvolvida Zhao (2011), com as devidas modificações. Cerca de 0,2 g da folha foi macerado em nitrogênio líquido e para a extração utilizado o tampão SSTE (CTAB, PVP-40, NaCl, Tris-HCl pH 8,0, EDTA, pH 8,0 e p-mercaptoetanol). A purificação do extrato foi feita mediante uso de solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 1:1:2. Para a precipitação total do RNA foi utilizado solução de Cloreto de lítio e para lavagem e purificação do precipitado, foi utilizado etanol a 70%. O RNA foi ressuspendido em água livre de nucleases e quantificado via eletroforese em gel de agarose 1%.

### **Tratamento do RNA e síntese de cDNA.**

As amostras de RNA foram tratadas com o kit DNA *Turbo Free* seguindo a metodologia fornecida pelo fabricante. Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o *Kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ (Kit Applied Biosystems™)*. As amostras de cDNA foram quantificadas e avaliadas quanto a sua contaminação pelo aparelho

Nanovue (GE Healthcare, 2017). Foram realizadas reações prévias de RT-qPCR para verificar a viabilidade dos primers e das amostras. Também foram construídas curvas de eficiência de todos os primers. Reações para determinar a taxa de eficiência foram realizadas com os primers que apresentaram amplificação satisfatória.

## Reação de RT-qPCR

Para a reação de RT-qPCR foram utilizados o kit SYBR™ Select Master e o equipamento de RT-qPCR (ABI 7500 Fast Real-Time PCR System). O volume final utilizado na reação foi de 10µL, com o primer na concentração final de 3ng, e o cDNA 100ng. A temperatura de anelamento utilizada foi de 59 °C em 40 ciclos de reação. As análises foram feitas no software 7500 v2.3 neste software obtivemos os valores de CT das reações. Neste estudo foi utilizada a análise baseada em quantificação relativa (RQ) para determinar os níveis de expressão das amostras. A quantificação relativa é baseada na comparação das expressões gênicas das amostras com expressões gênicas das amostras de referência (CIKOS, et al., 2007). No nosso estudo, as amostras de referência foram baseadas nas expressões de genes constitutivos da mandioca (PP2A e 25s) (MORENO, et al., 2011.). O valor de RQ foi obtido com base na Equação 2. Neste ensaio foi utilizado a metodologia desenvolvida por Livak e Schmittgen (2001), baseada no Ct comparativo. Os genes constitutivos utilizados no estudo foram o 25S, associado ao RNA Ribossomal e o PP2A, sequência codante da enzima Serina-theorina fosfatase 2A, responsável pela desfosforilação de resíduos de Fosfoserina (HU, et al., 2016). a fim de melhor padronização dos valores finais de RQ, utilizou-se o Log da RQ. Os cálculos foram realizados no software Excel Pacote Office 2013.

$$RQ = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

**Equação 2.** Equação de quantificação relativa (RQ). Ct é o limiar de detecção da fluorescência do primer na reação de RT-qPCR (PFAFFL et al., 2002). RQ) Quantificação relativa,  $\Delta\Delta Ct$ , é determinado pelo valor das diferenças de Ct das amostras testes ( $\Delta Ct$  (amostra teste)) subtraído pelo valor Ct das amostras calibradoras ( $\Delta Ct$  (amostras calibradoras)).



## **Curva de Calibração**

A curva de eficiência é utilizada para determinar a eficiência do primer e principalmente avaliar a viabilidade desses primers quanto ao cDNA submetido a ensaios de RT-qPCR. Para este ensaio, as curvas foram realizadas com o cDNA nas seguintes concentrações 5, 10, 25, 50 e 100 ng e os primers utilizados na concentração de 3  $\mu$ M. Esta curva é utilizada a fim de averiguar contaminantes e certificar a especificidade dos primers com relação às moléculas alvo. A curva de eficiência também revela outro parâmetro gráfico, que é a curva de *melting*, ou curva de dissociação, que é realizada pelo equipamento e obtida no software do mesmo (7500 softwares V.2.3). Quando os amplicons resultantes da reação são de tamanhos semelhantes, a desnaturação ocorrerá na mesma temperatura, assim, haverá um pico único e quanto maior a qualidade das amostras e dos primers, mais uniforme os picos de emissão de fluorescência (MORGANTE, et al., 2016).

## **Avaliação de respostas contra o estresse biótico**

Neste estudo foram realizadas as avaliações da resposta de estresse biótico nos tempos 0h, 24h, 48h, 72h e 144h. O programa utilizado para avaliação foi o Mapman versão 3.6.0, que avalia em cada tempo todos os genes envolvidos no ensaio e seu comportamento quanto ativação de respostas contra patógeno, como ativação de sinalizações direcionadas, produção de PR-Proteínas, metabólitos secundários, entre outros (BUENO, et al., 2019). Estes dados são mensurados pela paleta de cor dada pelo programa que vai do azul (valores positivos indicando repressão da via sinalizada) ao vermelho (valores negativos indicando a expressão ou superexpressão da via sinalizada). Para melhor avaliação e tratamento dos dados, utilizou-se o valor de Log RQ obtido pela subtração do valor de Log RQ do tratamento controle, pelo valor de Log RQ do tratamento inoculado.

## Escolha de genes candidatos

Os genes potencialmente candidatos à resistência à CBB utilizados no ensaio foram obtidos na literatura com base nos trabalhos de Lima (2018) e Lopez (2005) (Tabela 2). Foi feita análise de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (NCBI) para avaliar o alinhamento dos primers nos genes da Mandioca, evidenciando assim sua viabilidade para o ensaio de RT-qPCR.

**Tabela 2.** Genes candidatos e endógenos utilizados neste estudo.

| Codificação de identificação gênica  | Gene           | Sequência (5' - 3')   | Função  | Referência                                     |
|--------------------------------------|----------------|---|---|--|
| Manes.08G125400 /<br>Manes.09G160400 | MeCu/znS<br>OD | 5´GGCTTCATGGGTTCCACGTCCATG`3 - F<br>3´GCTACCCTGCCACCAGCATTTCAG`5 - R  | Superóxido desmutase, enzima ligada ao combate ao estresse oxidativo                        | LIMA, et al. 2018; TERTIVANIDIS, et al., 2004. |
| Manes.05G061400.<br>1                | MeLEA3         | 5´ATGGCTCGCTCTTTCTCAGACG`3 - F<br>3´TTAATGCTTCTTCAACAGCATAGCCCT`5 - R | Proteína abundante em embriogenese tardia, família LEA3.                                    | COSTA, et al., 2011; LIMA, et al. 2018.        |
| Manes.08G1345<br>00.1                | MebZIP         | 5´GAATTGCTCAAGAGAGTCAGCTAGACG`3 -F<br>3´CGGACATAGGGTTGGAGGCTGAT`5 - R | Fator de transcrição ligado à expressão de enzimas percussoras da rota de síntese de fenóis | LIMA, et al., 2018.                            |
|                                      | MeCPI          | 5´CGCCGCCGTAGGTTCTGCTG`3 - F  |   | LIMA, et al., 2018.                            |

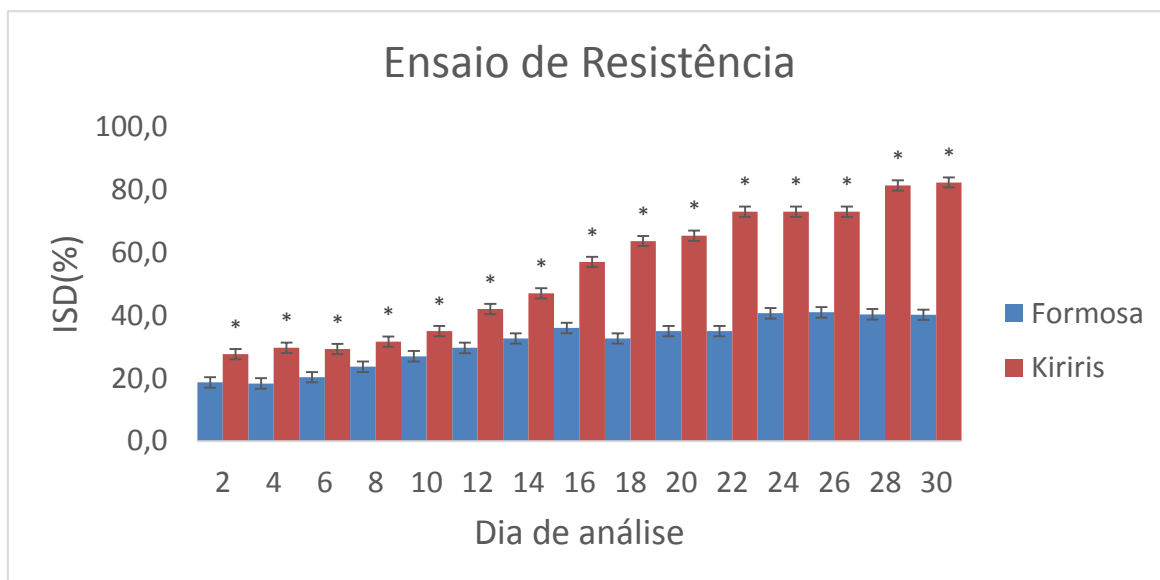
|                       |          |  |  |  |
|-----------------------|----------|--|--|--|
| Manes.09G039400.<br>1 |          | 3'TACCCTTGCACAGGGACAAACGATG`5 - R  | Inibidor da protease<br>cisteína proteinase  |  |
| Manes.04G018000.<br>1 | MePAL    | 5'CATTTGACACATAAATTGAAGCAACTG`3 - F<br>3'TAACAAGCTCAGAGAATTGAGCAAGAG`5 - R | Codificante da<br>enzima Fenilalanina<br>amônia-liase  | LIMA, et al., 2018.                        |
| Manes.06G025800.<br>2 | MeRZF    | 5'TCCTTCTCAAGGGCAGCAAGAT`3 - F<br>3'ACATGGAAAGTACATGGCCTGCTG`5 - R         | Codante da proteína<br>Dedo de Zinco   | LIMA, et al., 2018;<br>REIS, et al., 2012. |
| Manes.06G155600       | CK645438 | 5'AGGCCCTTAATGGGTTTAGC`3 - R<br>3'AGATGAGCATCAGGGAATGG`5 - F               | Codante para enzima<br>Quitinase E3.2.1.14 /<br>Poli-beta-<br>glucosaminidase //<br>Lisozima /<br>Muramidase | LOPEZ, et al., 2015                        |
| Manes.11G013700       | CK649651 | 5'TGGCCTGATCTGAAGAAACC`3 - F<br>3'TCATCGGCATCAGACTCATC `5 - R              | Fator de Transcrição<br>(ERF071)<br>Responsivo ao<br>Etileno.  | LOPEZ, et al., 2005                        |
| Manes.16G007300       | CK648501 | 5'CCGTGGAACACCCATGATAC`3 - F<br>3'GGCTTTGTTCTCTTGTCTGTGG`5 - R             | Regulação negativa<br>da peroxidase<br>catiônica   | LOPEZ, et al. 2005.                        |
| Manes.04G096600       | CK643002 | 5'GCAACTATGCACCAACATGG`3 - F<br>3'CCTTGGATTGAAAGCCAGTC`5 - R               | Precursor da enzima<br>Xiloglucano<br>endotransglicosilase   | LOPEZ, et al. 2005.                        |

|                       |          |  |   |                          |
|-----------------------|----------|--|---|--------------------------|
| Manes.14G034600       | CK647182 | 5´CAGCCATCAAGGACTGCTTAG`3 - F<br>3´AACCCAAGTCTCCACATTGC`5 - R  | Inibidor da enzima<br>Pectina Metilesterase   | LOPEZ, et al. 2005.      |
| Manes.12G132900       | CK646852 | 5´ATGTCAAGGCCAAGATCCAG´3 - F<br>3´CCATCTTCAAGCTGCTTTCC`5 - R   | Enzima bifuncional<br>relacionado a síntese<br>da fitoalexina<br>Camalexina         | LOPEZ, et al. 2005.      |
| Manes.09G039900.<br>1 | PP2A     | 5´TGCAAGGCTCACACTTTCATC`3 – F<br>3´CTGAGCGTAAAGCAGGGAAG`5 - R  | Codante da<br>subunidade catalítica<br>da enzima<br>Serina/Theonina<br>fosfatase 2A | MORENO, et al.,<br>2011. |
| Manes.06G038900.<br>2 | 25s      | 5´AATGCGCTCCTACAACAAGC `3 – F<br>3´GATCATCCGTAGCAGCCTCT `5 - R | Proteína Ribossomal<br>L2   | MORENO, et al.,<br>2011. |

## Resultados

### Ensaio de Resistência vegetal

Ambas as variedades desenvolveram sintomatologias características da CBB, como amarelecimento das folhas, no entanto apenas a variedade 'BRS Kiriris' apresentou desfolha severa, necrose e em alguns casos morte apical, principalmente devido à necrose no ponto de inoculação (MBARINGONG, et al. 2017). Neste estudo, os sintomas de senescência presentes nos tratamentos controles foram avaliados e o valor de ISD (%) foi calculado, onde os valores de ISD (%) dos controles foram subtraídos dos valores de ISD (%) dos tratamentos inoculados. Neste ensaio, o tratamento Kiriris inoculada obteve maiores valores de ISD (%) em todos os tempos em comparação ao tratamento Formosa Inoculada. Ao fim do ensaio (Dia 30) o tratamento Formosa inoculada obteve ISD (%) de 40,2 enquanto que neste mesmo período, o tratamento Kiriris inoculada obteve ISD (%) de 82,3, sendo que estes valores apresentaram diferenças estatísticas entre si baseado no teste McNemar.



**Figura 1.** Gráfico representando os valores de ISD (%) ao longo do tempo (30) dias. Linhas pontilhadas indicam a média móvel. \* Simbolizam diferenças estatísticas entre pares dos valores de ISD (%) dos tratamentos obtidos no mesmo tempo baseado no teste F a 5% de significância.

## Curva de eficiência

Alguns primers não foram considerados para aplicação no ensaio de RT-qPCR, pois não apresentaram parâmetros como Slope,  $R^2$  e eficiência de amplificação satisfatórios. Slope é um parâmetro de paralelismo entre as curvas apresentadas pelos genes alvo e endógeno. Considera-se um bom Slope valores próximos a -3,42 (SÁ, et al., 2014). A eficiência é calculada conforme a equação  $E = (10^{-1/\text{Slope}} - 1) \times 100$ . A eficiência é um valor utilizado no cálculo para determinação do valor de quantificação relativa (RQ). O  $R^2$  é um parâmetro que avalia qualidade da curva de quantificação, quanto mais próximo de um (1), melhor a curva de quantificação (SÁ, et al., 2014).

Os valores destes parâmetros obtidos pela curva de eficiência estão presentes na Tabela 3 e a curva de *melting* presente na Figura 6 no material complementar. Os genes que se mostraram interessantes para os ensaios de RT-qPCR foram escolhidos de acordo com os valores de Slope e eficiência. Estes parâmetros são essenciais para cálculos de quantificação relativa (RQ) os intervalos de interesse destes parâmetros foram escolhidos pelas indicações do fabricante e por trabalhos que estudam a qualidade dos dados de RT-qPCR. Para Slope os valores aconselhados são de -2,200 até -3,400 e eficiência da amplificação os valores aconselhados são de 80% até 120% (SVEC, et al., 2015). Os genes que se encontraram dentro de ao menos um desse intervalos foram selecionados para os ensaios de quantificação.

**Tabela 3.** Tabela contendo os dados relacionados aos testes prévios dos primers com o material genético obtido (Slope,  $R^2$  e eficiência).

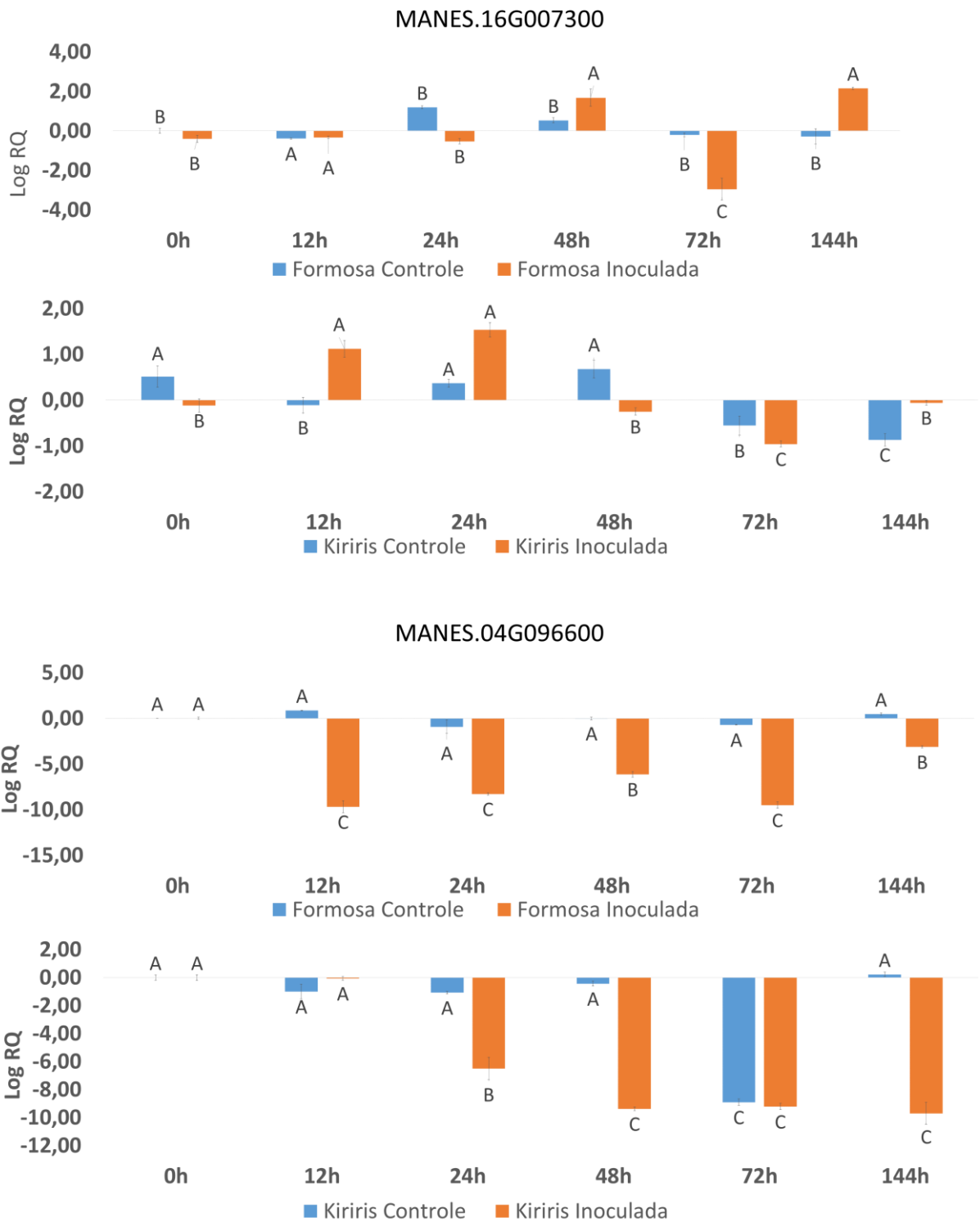
| Gene       | Slope* | $R^2$ ** | Eficiência da Amplificação*** (%) | Observação          |
|------------|--------|----------|-----------------------------------|---------------------|
| MeCu/znSOD | 0      | 0        | 0                                 | Não houve expressão |
| MebZIP     | 0      | 0        | 0                                 | Não houve expressão |
| MeRZF      | 0      | 0        | 0                                 | Não houve expressão |

|                 |        |        |                         |                                  |
|-----------------|--------|--------|-------------------------|----------------------------------|
| MeCPI           | -0,113 | 0,001  | 65,92 x 10 <sup>9</sup> | Inviável para ensaios de RT-qPCR |
| MeLEA           | -0,287 | 0,062  | 30,7 x 10 <sup>7</sup>  | Inviável para ensaios de RT-qPCR |
| MePAL           | 20,39  | 0,269  | 10,679                  | Inviável para ensaios de RT-qPCR |
| MANES.14G034600 | -2,34  | 0,984  | 145,574                 | Viável para ensaio de RT-qPCR    |
| MANES.16G007300 | -2,523 | 0,994  | 149,061                 | Viável para ensaios de RT-qPCR   |
| MANES.06G155600 | -2,54  | 0,645  | 457,574                 | Viável para ensaios de RT-qPCR   |
| MANES.04G096600 | -2,587 | 0,9719 | 144,28                  | Viável para ensaio de RT-qPCR    |
| PP2A            | -3,086 | 0,966  | 110,89                  | Viável para ensaio de RT-qPCR    |
| Manes.12G132900 | -3,199 | 0,922  | 105,394                 | Viável para ensaio de RT-qPCR    |
| MANES.11G013700 | -3,199 | 0,922  | 105,394                 | Viável para ensaio de RT-qPCR    |
| 25s             | -3,362 | 0,991  | 98,342                  | Viável para ensaio de RT-qPCR    |

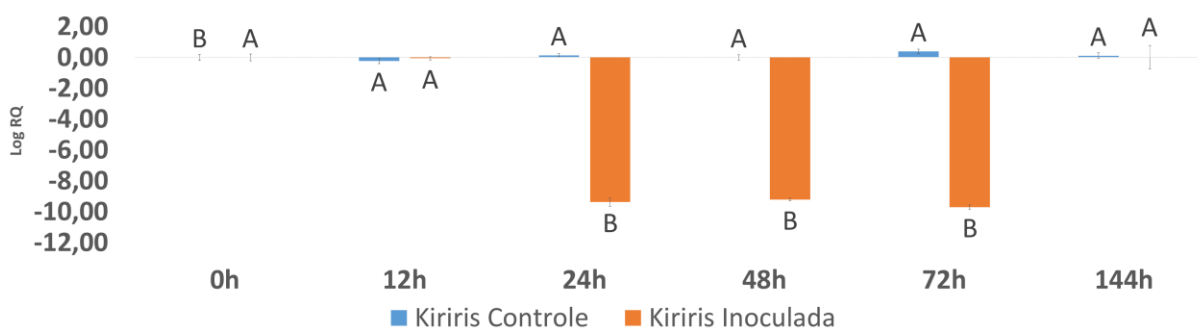
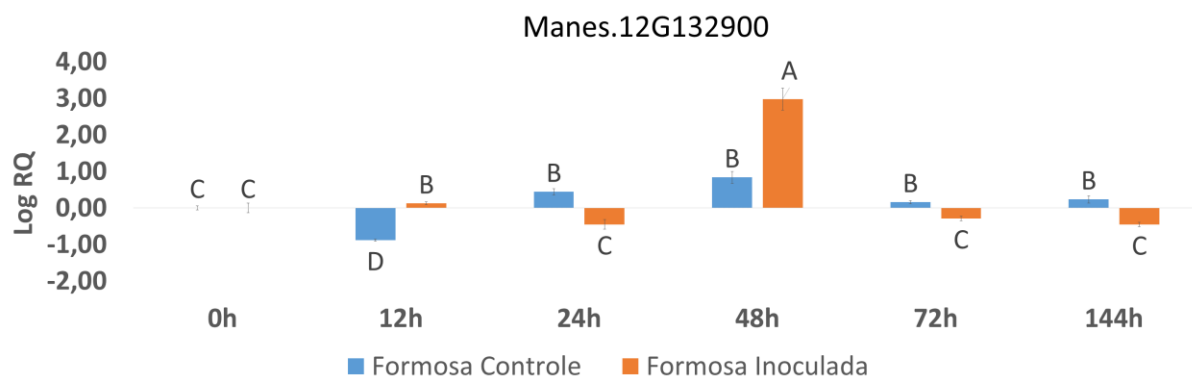
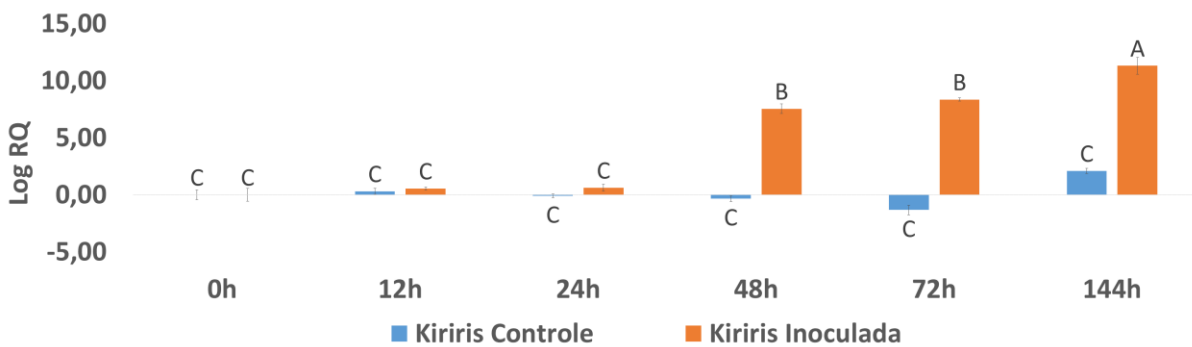
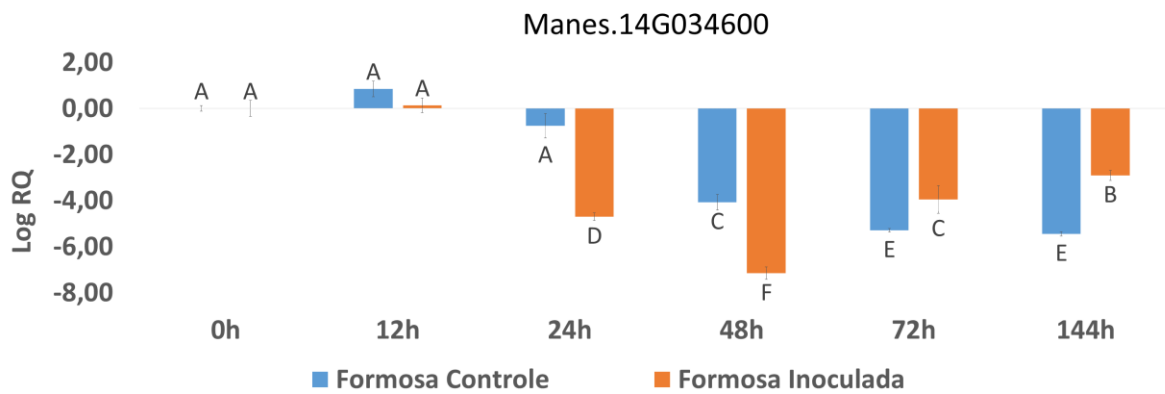
### Ensaio de RT-qPCR

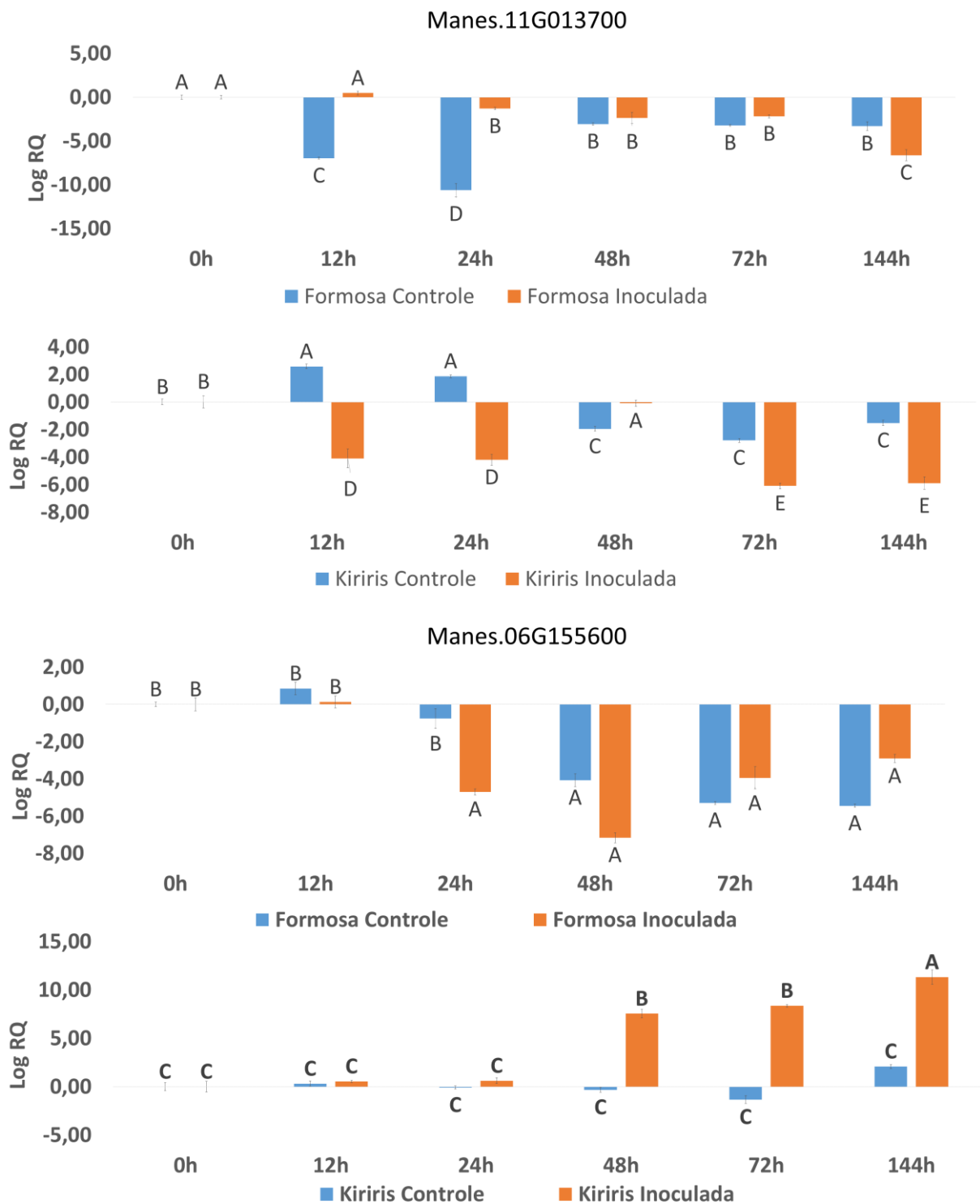
Analisando a expressão do Gene MANES.16G007300, obteve-se Log RQ próximo a zero nos ensaios controles, exceto para o ensaio Formosa Controle, que apresentou em 24h, 1,19 Log RQ, sendo o único a apresentar diferença estatística em relação aos demais tempos. O ensaio Formosa Inoculada apresentou diferenças estatísticas em relação ao ensaio Formosa Controle nos tempos 24, 48, 72 e 144 horas. Nestes tempos, o ensaio Formosa Inoculada apresentou respectivamente os valores -0,53, 1,68, -2,94 e 2,16 Log RQ. Nestes mesmos tempos, o ensaio Formosa Controle apresentou 1,19, 0,53, -0,21 e -0,28 Log RQ. O ensaio Kiriris Inoculada

apresentou diferenças estatísticas em relação ao tratamento Kiriris Controle nos tempos 0, 12, 48, 72 e 144 horas apresentando respectivamente -0,12, 1,12, -0,25, -0,96 e -0,06 Log RQ. Nestes tempos, o tratamento Kiriris Controle apresentou 0,51, -0,11, 0,68, -0,56 e -0,87 Log RQ. O valor máximo apresentado pelo ensaio Kiriris Inoculada foi no tempo 24 horas, onde foi quantificado 1,94 Log RQ e mínimo em 72 horas, onde foi quantificado -0,96 Log RQ.









**Figura 2.** Gráficos do Log da Quantificação Relativa (Log RQ) dos genes candidatos. Letras maiúsculas determinadas com base no teste estatístico Tukey em  $p > 0,5$ .

A análise da expressão do gene MANES.04G096600 foi marcada pela obtenção de valores de Log RQ negativos. O tratamento Formosa Inoculada

apresentou valores menores quando comparados ao controle, tendo diferenças estatísticas nos tempos 12, 24, 48, 72 e 144 horas. Nestes tempos, o tratamento Formosa inoculada apresentou respectivamente -9,69, -8,29, -6,13, -9,50, -3,13. Nos mesmos tempos, o tratamento Formosa Controle apresentou 0,87, -0,92, -0,02, -0,71, 0,46 Log RQ. O tratamento Kiriris Inoculada apresentou diferenças estatísticas em relação ao tratamento Kiriris Controle nos tempos 24, 48 e 144 horas. Nestes tempos, o tratamento Kiriris Inoculada apresentou -6,50, -9,37, -9,70 Log RQ. O tratamento Kiriris Controle apresentou -1,08, -0,44, 0,22 Log RQ. Os tratamentos Formosa Inoculada e Kiriris Inoculada, apresentaram valores próximos nos tempos 24 e 72 horas. No tempo de 24 e 72 horas, o tratamento Kiriris Inoculada apresentou -6,50 e -9,22 Log RQ. Nos mesmos tempos, o tratamento Formosa Inoculada apresentou -8,29 e -9,50 Log RQ.

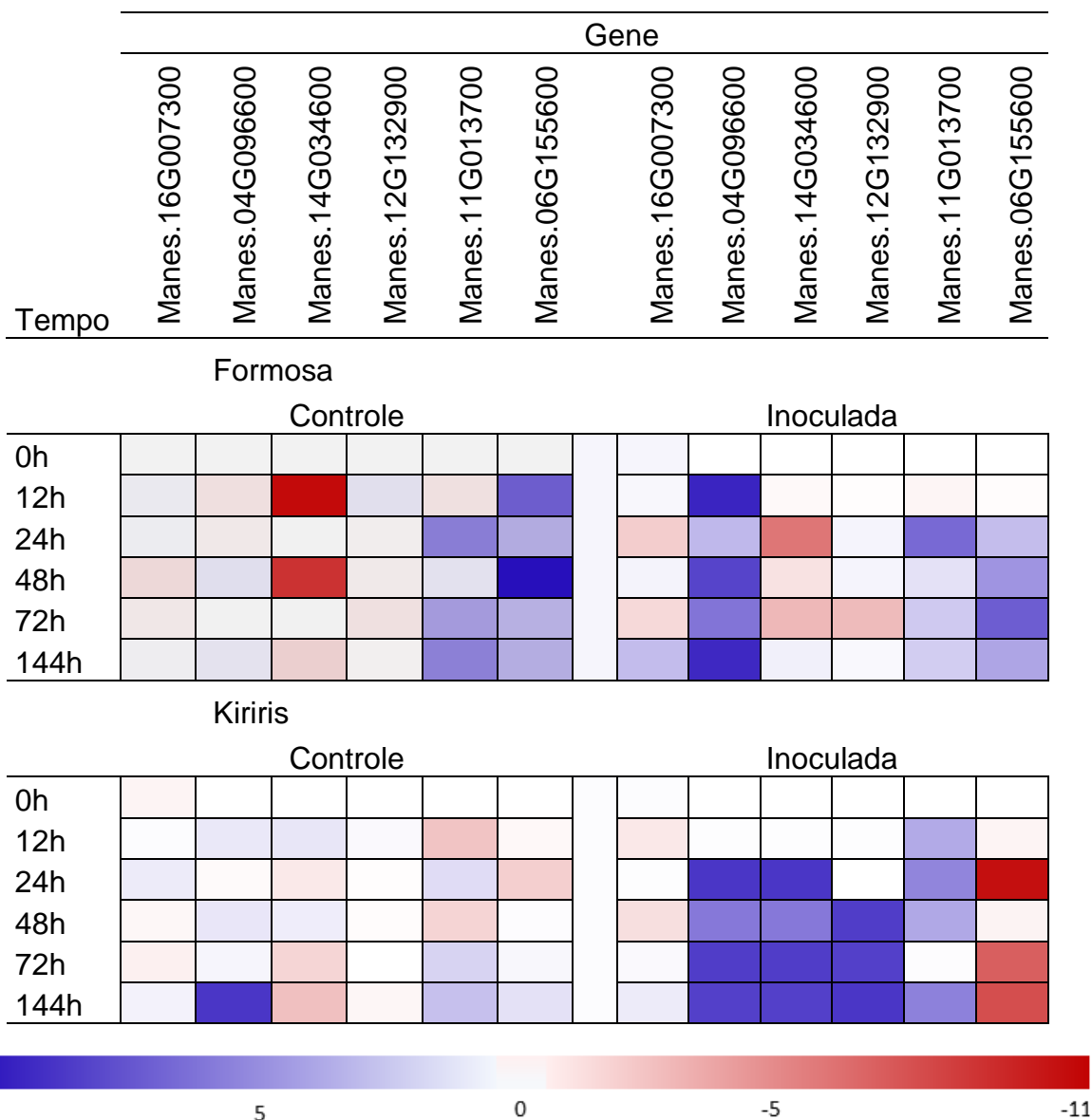
Neste ensaio, a expressão do gene MANES.14G034600, foi marcada por diferenças de expressão entre os tratamentos Formosa Inoculada e Kiriris Inoculada. O tratamento Formosa Inoculada apresentou na maioria dos tempos, Log RQ positivos, enquanto que o ensaio Kiriris Inoculada apresentou valores expressivamente negativos de Log RQ. Os tratamentos Formosa Controle e Formosa Inoculada, apresentaram expressivas diferenças de Log RQ nos tempos 24, 48, 72 e 144 horas. Nestes tempos, o tratamento Formosa Inoculada apresentou respectivamente -4,70, -7,16, -3,95, -2,91 Log RQ e o tratamento Formosa Controle apresentou -0,75, -4,07, -5,29 e -5,45 Log RQ. O ensaio Kiriris Inoculada apresentou diferenças estatísticas em relação ao tratamento Kiriris Controle nos tempos 48, 72, 144 horas. Nestes tempos, o tratamento Kiriris Inoculada apresentou 7,54, 8,35 e 11,31 Log RQ. Nos mesmos tempos, o tratamento Kiriris Controle apresentou respectivamente -0,33, -1,33, 2,09 Log RQ.

A análise da expressão do gene MANES.12G132900 demonstrou grandes diferenças de expressão entre os Formosa Inoculada e Kiriris Inocula. O tratamento Formosa Inoculada apresentou em sua maior parte, valores negativos e próximos a zero, enquanto o tratamento Kiriris inoculada alcançou valores sensivelmente negativos de Log RQ. Os tratamentos Formosa Controle e Formosa Inoculada apresentaram diferenças estatísticas nos tempos 12, 24, 48, 72 e 144 horas, nestes mesmos tempos, o tratamento Formosa inoculada apresentou 0,12, -0,45, 2,97, -0,29,

-0,46 Log RQ. Igualmente para o tratamento Formosa Controle, que apresentou -0,88, 0,44, 0,84, 0,16 e 0,23 Log RQ. Os tratamentos envolvendo Kiriris apresentaram muitas diferenças entre si. O tratamento Kiriris Controle apresentou valores positivos e próximos de zero, enquanto que o tratamento Kiriris Inoculado, apresentou valores expressivamente negativos, houveram diferenças estatísticas entre os tratamentos nos tempos 24, 48 e 72 horas. Nestes tempos, o tratamento Kiriris Inoculada obteve -9,37, -9,22 e -9,70 Log RQ. Nestes mesmos tempos, o tratamento Kiriris Controle, apresentou respectivamente 0,14, 0,00, 0,39 Log RQ.

Quanto à expressão do gene MANES.11G013700, o tratamento Formosa Inoculada apresentou em 144 horas, o menor valor de Log RQ, sendo este 6,65. O ensaio Formosa Inoculada apresentou valor positivo de 0,47 Log RQ apenas em 12 horas. Neste ensaio houve diferenças estatísticas nos tempos 12, 24, 144 entre os tratamentos Formosa Inoculada e Formosa Controle. Os valores apresentados neste tempo pelo tratamento Formosa Inoculada foram 0,47, -1,31, -6,62 Log RQ. O tratamento Formosa Controle apresentou nestes tempos os seguintes valores de Log RQ, -6,97, -10,60, -3,30. O tratamento Kiriris Inoculada apresentou diferenças estatísticas em todos os tempos, exceto em 0h, em relação ao tratamento Kiriris Controle. Nos tempos, 12, 24, 48, 72 e 144 horas o tratamento Kiriris inoculada apresentou -4,09, -4,20, -0,10, -6,09, -5,89 Log RQ. Nestes mesmos tempos, o tratamento Kiriris Controle apresentou 2,57, 1,86, 1,95, -2,78, -1,53 Log RQ.

A análise da expressão do gene MANES.06G155600 revelou um comportamento de expressão com diferença significativa entre os tratamentos envolvendo Formosa e Kiriris. O tratamento Formosa inoculada apresentou diferenças estatísticas em relação ao controle nos tempos 24 e 48 horas apresentando -4,70, -7,16 Log RQ. Neste mesmo tempo, o tratamento Formosa Controle apresentou -0,75 e -4,07 Log RQ. O tratamento Kiriris Inoculada apresentou diferenças estatísticas em relação ao tratamento Kiriris Controle nos tempos 48, 72 e 144 horas apresentando respectivamente, 7,54, 8,35 e 11,31 Log RQ. Nestes mesmos tempos o tratamento Kiriris Controle apresentou -0,33, -1,33, 2,09 Log RQ.



**Figura 3.** Grafico de HeatMap baseado nos valores de Log da Quantificação Relativa (Log RQ) dos genes candidatos. Cores azuis indicam valores positivos de Log RQ ou superexpressão do gene enquanto que as cores vermelhas indicam valores negativos de Log RQ e repressão do gene.

### Discussão

#### Ensaio de Resistência.

Ambas as variedades inoculadas apresentaram sintomatologia inerentes à CBB, como amarelecimento das folhas, desfolha severa, gomose e morte apical. A

variedade resistente, 'BRS Formosa' como esperado, desenvolveu os sintomas de forma mais branda, apresentando apenas amarelecimento, desfolha além de necrose no local da inoculação (MBARINGONG et al., 2017).

O ensaio de resistência com a variedade suscetível, 'BRS Kiriris', apresentou características comum aos ensaios envolvendo variedades suscetíveis à CBB (citar referências). Neste ensaio, a variedade suscetível apresentou sintomas inerentes à CBB, no entanto, estes evoluíram para manchas necróticas, gomose e morte apical. O desenvolvimento destes sintomas associado aos valores de ISD (%) próximo aos 90%, revelam um comportamento de suscetibilidade à CBB (RUBIO, et al., 2017).

## **RT-qPCR**

O gene MANES.16G007300 é um regulador negativo da enzima extracelular peroxidase catiônica, pertencente ao grupo (E.C. 1.11.1.7) (YANG, et al, 2015). Este tipo de peroxidase tem como função catalisar a transferência do hidrogênio de um doador para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (OGANA, et al., 2017). Esta enzima é ligada diretamente à mitigação do estresse oxidativo em plantas ao catalisar a transferência do hidrogênio, de um doador de prótons, para o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (MOHAMED, et al., 2017). Além disto, a enzima está associada a outros mecanismos de resistência como a síntese de fitoalexinas e formação de lignina (WALLY, et al., 2010). Nos primeiros estágios, o controle do estresse oxidativo é essencial para resposta contra patógeno, pois além de coibir toxinas da mesma, esta ação mantém a maquinaria celular funcional e impede a morte celular (MOHAMED, et al., 2017).

O gene MANES.16G007300 quando expresso em quantidades satisfatórias, regula negativamente a transcrição da peroxidase catiônica, assim espera-se que quando suprimido, haja o decréscimo do estresse oxidativo no interior das células vegetais (LOPEZ, et al., 2005). O controle do estresse oxidativo é um importante fator de resistência, e apesar de se acreditar que este seja uma resposta imediata contra patógenos, estudos demonstram que algumas peroxidases são expressas tardiamente e acionadas pela via de sinalização do Ácido salicílico (AS) (COEGO, et al., 2005). Estas enzimas expressas de forma tardia, na grande maioria dos casos, são enzimas extracelulares e podem desempenhar papéis contra o patógeno e

sobretudo contra organismos necróficos, assim a expressão destes é mais tardia do que os demais genes associados à contenção do estresse oxidativo (RAUYAREE, et al., 2020). Essa característica pode explicar a resposta da variedade Formosa que apresentou uma acentuada expressão negativa em 72 horas, momento este em que as rotas do (AS) estão mais ativas (DELGADO, et al., 2007). A Kiriris apresentou uma possível resposta via o gene MANES.16G007300 no mesmo tempo, porém, mais branda quando comparada à Formosa. No tempo 72 horas, os tratamentos Formosa Inoculada e Kiriris Inoculada, apresentaram respectivamente, -2,94 e -0,96 Log RQ.

Ao compararmos a expressão do gene MANES.16G007300 entre as variedades 'BRS Formosa' (resistente) e 'BRS Kiriris' (suscetível), fica claro que este pode desempenhar um papel associado à resistência contra a CBB, visto que foram obtidos valores de Log RQ consideravelmente negativos em 72 horas para o ensaio Formosa inoculada e em 48 e 72 horas para o ensaio Kiriris Inoculada. Como o gene MANES.16G007300 é um gene de regulação negativa, nos tempos citados, acreditamos que houve uma maior taxa de síntese da enzima extracelular peroxidase catiônica. Este resultado corrobora estudos que demonstram que respostas extracelulares direcionadas a coibir o estresse oxidativo tendem a ser mais tardias (YAN, et al., 2018). Além do tempo das respostas, algo que indica a corroboração deste gene para a resistência detectada na variedade 'BRS Formosa', é que esta, quando exposta ao patógeno, manteve a expressão desse gene mais suprimida ao longo do tempo e além disto, a mesma pode modular de forma aguda uma resposta mediada por este gene visto que há uma grande variação dos valores de Log RQ obtido entre os tempos 48, 72 e 144 horas. Em contrapartida, a variedade 'BRS Kiriris' quando exposta ao patógeno, não demonstrou a capacidade de uma resposta mais aguda pela modulação deste gene, visto que houve pouca variação entre os tempos 48, 72 e 144 horas e manteve a expressão positiva em períodos mais iniciais da doença (12 e 24 horas).

No estudo fica claro que as variações de expressão do gene Manes.16G007300 foram ativadas em momentos chaves do desenvolvimento da doença e que quando comparado o perfil da expressão entre os tratamentos Formosa Inoculada e Kiriris Inoculada há um contraste significativo da resposta. Estas respostas contrastantes podem indicar uma possível ação de resistência visto que a

inibição deste gene atuaria na produção de enzimas que atuariam diretamente sobre a infecção.

O gene MANES.04G096600 está ligado diretamente à regulação positiva do precursor da enzima de Xiloglucano endotransglicosilase (XTH) (LOPEZ, et al. 2005). A enzima XTH está diretamente associada ao afrouxamento das paredes celulares ao clivar o Xiloglucano, que é uma hemicelulose responsável por ancorar as fibras de celulose na parede celular (NIRAULA, et al., 2021). O Xiloglucano é responsável por atuar na resistência da parede celular e a XTH atua sobre esse principalmente em eventos de divisão celular (XUAN, et al., 2016). Acredita-se também que a enzima XTH assuma papel importante em mecanismos de sinalização extracelular, pois é muito comum que vesículas oriundas do retículo endoplasmático contenham neles a XTH associada a moléculas sinalizadoras, assim esta enzima além de desempenhar papel estrutural, pode também estar envolvida na resposta extracelular contra o patógeno (VAN SANDT et al., 2007). Como um patógeno biocida, respostas que visem agregar resistência à parede celular, tendem a surtir efeitos contra a *Xpm*, pois evitam diretamente a entrada na célula pelo patógeno e auxiliam as células vegetais no controle osmótico. Assim, a supressão do gene MANES.04G096600, é potencialmente interessante para a resposta contra patógeno (LI, et al., 2019). Em nosso ensaio, ambas as variedades mostraram respostas potencialmente correlacionadas ao desenvolvimento da doença que em seus primeiros estágios tem o patógeno infectando células do hospedeiro (MORA, et al., 2019)

Respostas envolvendo a estrutura da parede celular são essenciais para a resistência, principalmente em estágios iniciais de estresses bióticos e abióticos (YAN, et al., 2019). Neste estudo ficou claro que os tratamentos de ambas as variedades quando submetidos à CBB, apresentaram flutuações de valores de Log RQ que demonstram uma resposta de resistência mediada por este gene. Neste ensaio, ambos tratamentos controles mantiveram o valor de Log RQ próximo a zero em basicamente todos os tempos, enquanto que os tratamentos inoculados alcançaram valores significativamente negativos, indicando que ao constatar a infecção, as plantas tendem a silenciar rotas de síntese da XTH.



Neste ensaio, a variedade resistente 'BRS Formosa', mostrou flutuações de valores negativos de Log RQ no início da infecção (12 horas), alcançando neste tempo -9,69 Log RQ. No mesmo tempo, o tratamento Kiriris Inoculada, apresentou -0,07 Log RQ, não apresentando diferença estatística em relação ao tratamento Kiriris inoculada. Este dado demonstra que apesar de acionar este gene para coibir o processo de infecção, o tratamento Kiriris inoculada o fez de forma mais branda e tardia, algo que pode ter permitido o avanço da doença e maior ISD (%) em comparação à variedade resistente 'BRS Formosa'. Vários estudos demonstram que as modulações de genes associados a mudanças estruturais são fundamentais para o sucesso sobre a infecção, assim, variedades resistentes ao patógeno tendem a empregar estas rotas de forma aguda e concomitante à infecção (PHAN, et al., 2019).

A clara supressão do gene MANES.04G096600 em ambas as variedades infectadas pela a *Xpm* indica que este gene é um possível agente de resistência. Outro dado que corrobora com ação deste gene mediada pelo processo infeccioso é a comparação entre os tratamentos controles e inoculadas, pois ambas as variedades no tratamento controle mantiveram expressões próximo a zero enquanto que as variedades inoculadas apresentaram forte repressão deste gene algo que era esperado mediante os estudos prévios sobre a atuação do gene

O gene MANES.14G034600 está associado a vias potencialmente indutoras de amadurecimento (LOPEZ, et al., 2005). Este gene é responsável pela ação inibidora sobre a enzima Pectina Metilesterase, esta enzima atua principalmente no amadurecimento promovendo a hidrólise da pectina tornando os tecidos, principalmente dos frutos mais moles (USADEL, et al., 2018). Genes associados a esta via metabólica são estudados em várias espécies de plantas, pois estão associados à conversão de amido em frutose, depósitos, movimentação de reservas energéticas e sobretudo ao amadurecimento e conseqüentemente apodrecimento de tecidos vegetais (FABI, et al., 2012). O gene MANES.14G034600 é um gene de regulação negativa, assim, quando expresso, manifesta-se silenciando a síntese de enzimas pertencentes a família Pectina Metilesterase (LOPEZ, et al., 2005). Quando silenciado, a rota de indução ao amadurecimento mantém a integridade celular e das reservas energéticas (FABI, et al., 2012). Neste ensaio, os tratamentos Formosa Inoculada e Kiriris Inoculada exibiram comportamento inverso, tendo o tratamento com

variedade resistente ('BRS Formosa') apresentando valores pequenos positivos de Log RQ, enquanto que o tratamento com a variedade suscetível ('BRS Kiriris') apresentou acentuados valores negativos de Log RQ quando comparado aos seus respectivos tratamentos controles. Em basicamente todos os tempos, o tratamento Formosa Inoculada obteve expressão negativa, algo que pode estar potencialmente associado à tentativa de regular o amadurecimento. O maior valor obtido de Log RQ foi em 144 horas, onde o tratamento Formosa Inoculada obteve 5,93 Log RQ. Neste mesmo tempo, o tratamento Kiriris Inoculada alcançou o menor valor de Log RQ, obtendo valor de -9,70 Log RQ. Quando se compara os tratamentos Kiriris Inoculada e Kiriris Controle, verifica-se uma potencial resposta acionada pela doença, pois a Kiriris Controle não exibiu variação estatística ao longo do tempo, mantendo praticamente em todos os tempos, valores positivos de Log RQ.

As mobilizações de reservas são essenciais para o aumento de metabolismo que é comum durante estágios iniciais da infecção onde há a síntese de inúmeras moléculas que atuam sobre o patógeno, porém o estudo demonstra que esta resposta quando acionada de forma aguda, acarreta malefícios (MANNING, et al., 2001). No tratamento Kiriris Inoculada houve repressão acentuada deste gene. Esta repressão é um comportamento teoricamente anômalo e pode ter sido acionado pelo patógeno e esta ação é sugerida por estudos que descrevem em patógenos mecanismos que atuam sobre genes ligados à mobilização de reservas energéticas (BENAVIDES, et al., 2021). Algumas bactérias patogênicas possuem como fator de virulência o sistema secretor do tipo IV (T6SS), que permite ao patógeno inserir no interior da célula vegetal fatores de transcrição que modulam o metabolismo do hospedeiro de forma interessante ao crescimento do patógeno (ABENDROTH; et al., 2017). Em *Xpm* o T6SS está bastante associado à modulação das vias de sinalização associadas ao controle metabólico do hospedeiro, inclusive uma das rotas que pode ser modulada está associada à indução de amadurecimento (BENAVIDES, et al., 2021).

Em vista dos resultados obtidos em nosso estudo associado ao conhecimento prévio sobre rotas associadas à indução de amadurecimento, pode-se pressupor que este gene contribui para o quadro de suscetível da variedade 'BRS Kiriris' contra a CBB. A expressão acentuadamente negativa pode ter exposto as reservas energéticas da planta associado ao amolecimento do tecido quebra a homeostasia

dos tecidos. A expressão negativa é perceptível principalmente nos tempos 24, 48, 72 e 144 horas. Nestes mesmos tempos, o ensaio Formosa inoculada manteve valores positivos e próximos a zero. Outro fator que demonstra uma possível associação deste gene com a resistência, são os valores de Log RQ obtidos entre os controles, onde o tratamento Kiriris Inoculada não apresenta flutuações mantendo uma suposta expressão basal deste gene, ao passo que o tratamento Formosa Inoculada apresenta flutuações com aumentos e recuos no valor de Log RQ deste gene. Esta modulação ao longo do tempo pode indicar que a variedade 'BRS Formosa' possui um controle maior nas enzimas associadas ao amadurecimento algo que é fundamental para o controle de possíveis infecções (PERATO, et al., 2018).

Apesar de ao longo do estudo os tratamentos Inoculados e Controles apresentaram diferenças significativas entre si apenas os tratamentos com a variedade 'BRS Kiriris' apresentaram flutuações interessantes para a presunção da ação deste gene em decorrência do processo infeccioso. O tratamento Kiriris Controle manteve valores próximo a zero ao longo do estudo enquanto que o tratamento Kiriris Inoculada apresentou crescimento linear dos níveis de expressão alcançando o ápice em 144 horas. Esta flutuação pode indicar que o gene foi responsivo a presença do patógeno, porém, atuou de forma contrária ao imaginado, visto que, era esperado que a planta inoculada apresentasse repressão do gene dada a ação do mesmo. Essa repressão foi constatada de forma marcante pela variedade resistente, 'BRS Formosa' algo que sugere um possível mecanismo de resistência, porém, em vista dos dados obtidos pelo estudo não é possível afirmar que a ação deste gene foi em decorrência do desenvolvimento da CBB.

O gene MANES.12G132900 é o codante da enzima bifuncional responsável pela síntese da fitoalexina Camalexina (GAUR, et al., 2018). Camalexina é originada do triptofano e sua biossíntese envolve as enzimas do citocromo P450 CYP79B2 e CYP71B15 e sua síntese é ativada pela presença de espécies reativas do oxigênio (ROS) e Ácido salicílico (ZHOU, et al., 2020). A Camalexina é bastante conhecida pela sua ação contra microrganismos, atuando em destruição de parede celular, ativação da morte programada e mal funcionamento de proteínas de membrana e do retículo endoplasmático (GAUR, et al., 2018). Este gene assim demonstra um papel proeminente como possível gene de resistência.

Neste estudo, as variedades apresentaram grande contraste com relação ao perfil da expressão deste gene. Enquanto o tratamento Kiriris Inoculada apresentou valores de Log RQ negativos em basicamente todos os tempos, o tratamento Formosa Inoculada apresentou um valor positivo em 48 horas obtendo o maior valor de Log RQ (2,97) deste gene no estudo. A síntese dessa enzima é mantida expressa de forma constante, pois esta comumente acumulada em tecidos da planta (MUCHA, et al., 2019). Além disto, a mesma possui papel de destaque na inativação de toxinas provenientes do patógeno (KOCH, et al., 2018). Apesar de mostrar um comportamento interessante em 48 horas no tratamento Formosa Inoculada, este gene apresentou um comportamento inesperado visto que mecanismos celulares que visam coibir a presença do patógeno e toxinas do mesmo, tendem ser ativos momentos após a infecção e são mantidos ativos por um longo período de tempo; algo que não aconteceu em nosso estudo (GUNUPURU, et al., 2018). Quanto ao gene MANES.12G132900, o que este estudo pode sugerir, é que as plantas podem utilizar de outros genes para a produção de outros grupos de fitoalexinas, pois apesar da grande gama de estudos sobre a Camalexina ainda não ficou claro seu grau de importância em mandioca.

O tratamento Formosa Inoculada apresentou valores próximo a zero ao longo dos tempos analisados, no entanto, em 48 horas, apresentou um aumento considerável de Log RQ obtendo 2,97. Neste mesmo tempo, o tratamento Formosa Controle apresentou 0,84 Log RQ e Kiriris Inoculada apresentou -9,22 Log RQ. Esta resposta pode estar potencialmente relacionada à presença do patógeno, haja vista que neste tempo há ainda o estabelecimento da bactéria no meio intracelular e uma superprodução de toxinas (GUNUPURU, et al. 2018).

Analisando de forma direta ambas as variedades ficaram claro um perfil de resposta diametralmente oposto, pois a variedade resistente 'BRS Formosa' exibiu pelo menos em um tempo (48 horas) forte expressão do gene MANES.12G132900 enquanto que a variedade 'BRS Kiriris' exibiu forte repressão sobretudo nos tempos 24, 48 e 72 horas. Apesar da ação contrária ao esperado visto a ação do transcrito desse gene é bem provável que esta resposta foi desencadeada pela presença do patógeno, pois o tratamento Kiriris Controle apresentou respostas próximo a zero. Outro dado que pode ser interpretado como uma possível associação a resistência

contra a CBB é que a variedade resistente 'BRS Formosa' apresentou taxas basais positivas da expressão deste gene até mesmo no tratamento Controle.

O gene MANES.11G013700 Fator de Transcrição Responsivo ao Etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) (ERF071) (LOPEZ, et al., 2005). O etileno em plantas é responsável pelo amadurecimento de frutos, quebra de dormência, senescência e morte programada (MCGRATH, et al., 2005). Ao serem acionados pelo etileno os fatores de transcrição do tipo ERF071 desencadeiam eventos transcripcionais responsáveis por diferentes mecanismos de defesa principalmente contra o estresse hídrico (AHN, et al., 2017) São vários mecanismos fisiológicos acionados pela planta como abertura estomatal, floração, acúmulo de cera no limbo foliar e outros (YAO, et al., 2017).

Neste ensaio, ambos os tratamentos mostraram uma provável supressão do gene MANES.11G013700. Esta supressão pode ter sido motivada pelo processo infeccioso no qual a planta tentou suprimir processos hormonais que ativassem a senescência mediados pelo etileno (LU, et al., 2018). Com a provável supressão do hormônio etileno por conta do processo infeccioso é possível que as respostas mediadas pelo gene MANES.11G013700, tenham sido silenciadas.

Comparando a expressão entre os tratamentos controle e inoculados de ambas as variedades, fica relativamente claro que a exposição à CBB implicou em mudanças quanto a expressão do Gene MANES.11G013700. Apesar do comportamento similar em comparação aos controles, os tratamentos Kiriris Inoculada e Formosa Inoculada também apresentaram diferenças interessantes entre si. Os tratamentos Formosa Inoculada e Kiriris Inoculada mostraram uma tendência de Log RQ negativo. No entanto, o tratamento Kiriris Inoculada manteve este comportamento basicamente em todos os tempos. O silenciamento de rotas associadas à produção de etileno é comum em plantas expostas ao estresse biótico e isto pode ter interferido diretamente na expressão do gene MANES.11G013700. (YAN, et al., 2015).

Atualmente acredita-se que em pequenos níveis o Etileno tende a reforçar respostas sistêmicas contra o patógeno, assim uma planta ou variedade resistente quando exposta ao patógeno, tende de suprimir esta rota. Entretanto, não de forma aguda, mantendo taxas basais de expressão de genes associados à síntese do Etileno (TANG, et al., 2015). Este entendimento pode explicar uma súbita expressão

positiva do gene MANES.11G013700 pela variedade resistente ('BRS Formosa') no tempo de 12 horas e que ao longo do experimento a mesma não demonstrou uma supressão tão ampla como a variedade suscetível ('BRS Kiriris'). Esta diferença nos valores de Log RQ pode explicar a resistência da 'BRS Formosa', pois ao não reprimir o gene MANES.11G013700 de forma tão aguda quanto a 'BRS Kiriris', esta permitiu um possível controle de alguns estresses mediados pelos genes acionados pelo receptor ERF071.

O gene MANES.06G155600 é responsável pela regulação positiva de vias de síntese da enzima Quitinase E3.2.1.14 (LOPEZ, et al., 2015). A Quitinase E3.2.1.14 é fundamental para respostas contra fungos devido a sua ação hidrolítica sobre a quitina (LOPEZ, et al., 2015). Apesar de agir contra paredes celulares fúngicas esta enzima também apresenta ação antibacteriana devido à sua ação lítica sobre paredes celulares (COSTA, et al., 2010). Em seus estudos com a Mancha-Bacteriana do Tomateiro (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), Cavalcanti (2016) demonstrou que a ação desta enzima em estágios iniciais é fator determinante para o controle da doença. Esta resposta incide diretamente no controle do número de células do patógeno (CAVALCANTI, et al. 2016).

Enzimas específicas como a Quitinase III apresentam-se em plantas como no algodão (*Gossypium hirsutum*) em respostas mais tardias e mais específicas (HAN, et al., 2019). Apesar desta resposta ser direcionada a patógenos fúngicos há um acúmulo destas também em decorrência de doenças bacterianas, e além de atuar contra o patógeno, pode atuar contra organismos oportunistas e saprofíticos (KUMAR, et al., 2018). Esta resposta mais tardia da variedade Kiriris está de acordo com outros experimentos de análise da expressão genica de genes relacionados a enzimas direcionadas à quitina (HAN, et al., 2019). É relatado que as sequencias codantes para estes tipos de enzima podem variar bastante, inclusive dentro da mesma espécie. Esta informação pode indicar que este gene em específico pode não ser potencialmente associado à resistência contra a CBB em Formosa, mas devido às flutuações positivas no tratamento Kiriris Inoculada, esta pode ser um importante mecanismo de resposta (KUMAR, et al., 2018).

Houve uma grande diferença no perfil de expressão deste gene entre as variedades e como se trata de uma enzima específica e associada à resistência, era

muito provável que houvesse expressão positiva deste gene em ambas as variedades. A diferença entre a expressão pode estar associada ao fato de que a variedade 'BRS Formosa' possa ter outros reguladores para a síntese da enzima Quitinase III.

## **Conclusão**

Nestes estudos ambas as variedades ('BRS Formosa' e 'BRS Kiriris') apresentaram sintomas característicos da CBB sendo que a variedade 'BRS Formosa' apresentou resistência contra a CBB alcançando valores pequenos de ISD (%) quando comparado a variedade 'BRS Kiriris'. Neste mesmo estudo a análise da expressão do gene em diferentes tempos (0, 12, 24, 48, 72 e 144 horas) mostrou uma potencial ação de resistência de alguns genes. Os genes que se mostraram mais promissores foram os genes, MANES.04G096600, MANES.14G034600, MANES.12G132900, MANES.11G013700, MANES.06G155600.

Estes genes foram considerados consideráveis promissores pelas diferenças de expressão entre o tratamento controle e inoculada de ambas variedades. Estas diferenças de expressão mostram que a superexpressão ou repressão dos genes foi motivada provavelmente pela presença da doença, visto que, os tratamentos controle mantiveram os valores de expressão próximo a zero e os tratamentos inoculados mudaram os perfis de expressão. Destes genes que apresentaram mudanças consideráveis de expressão os genes que apresentaram perfil de expressão dentro do esperado para a característica do gene foram os genes Manes.16G007300, MANES.04G096600, MANES.12G132900.

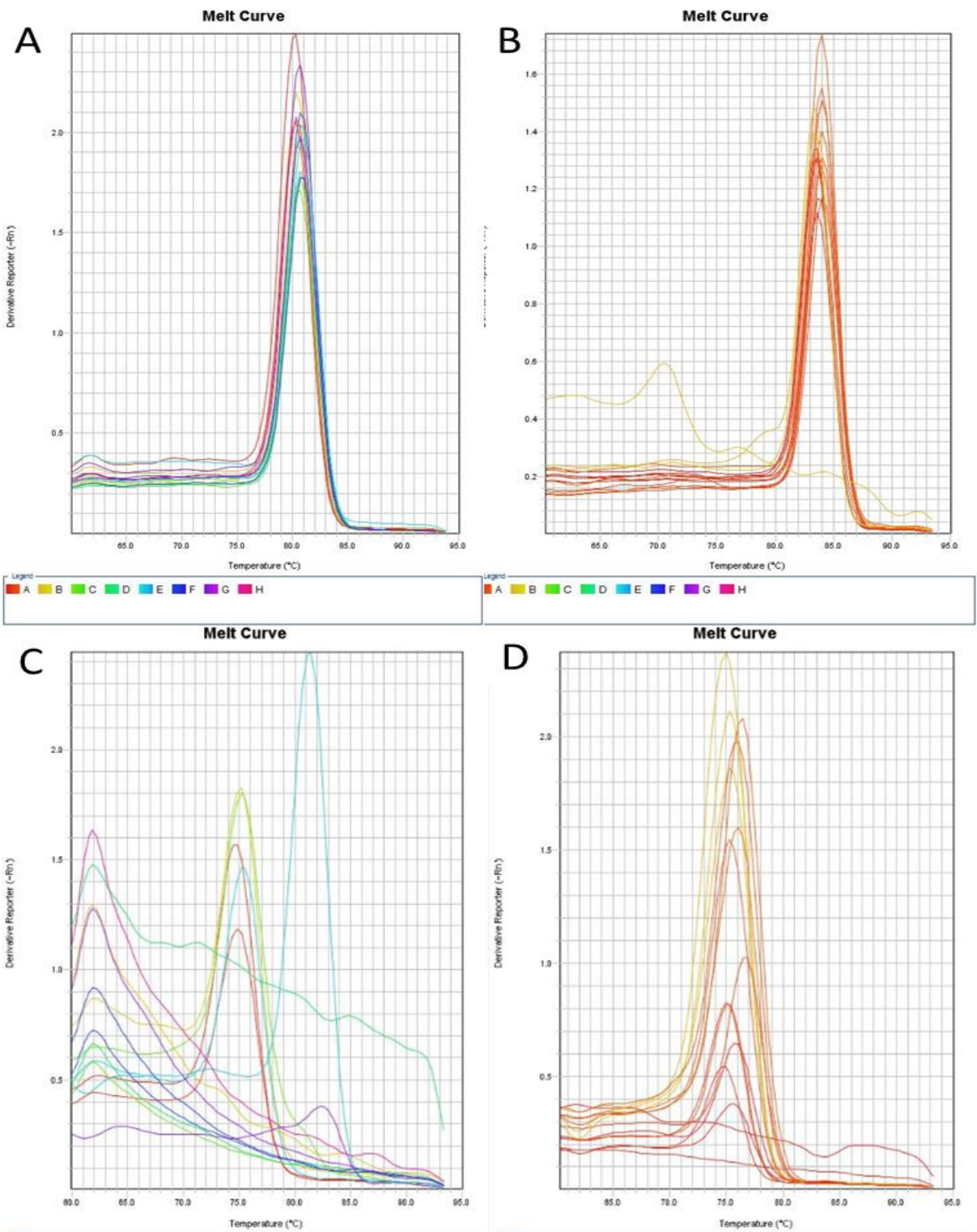
Este estudo confirmou apenas uma possível ação de resistência contra o patógeno, no entanto, mais estudos são necessários para comprovação da ação direta destes genes contra a CBB. Estudos como esse são fundamentais para a descoberta ou afirmação de genes de Mandioca candidatos a resistência contra a CBB assim nortear futuros estudos que busquem alimentar bancos de informação gênica.

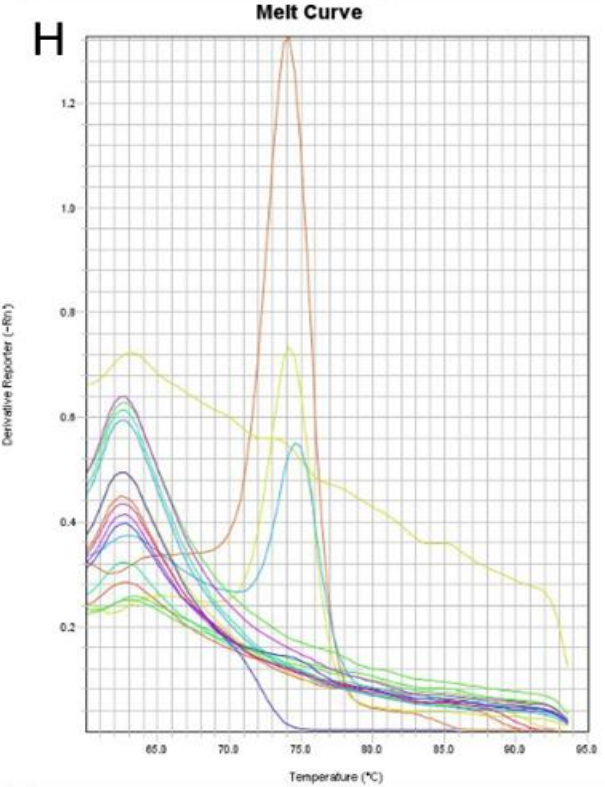
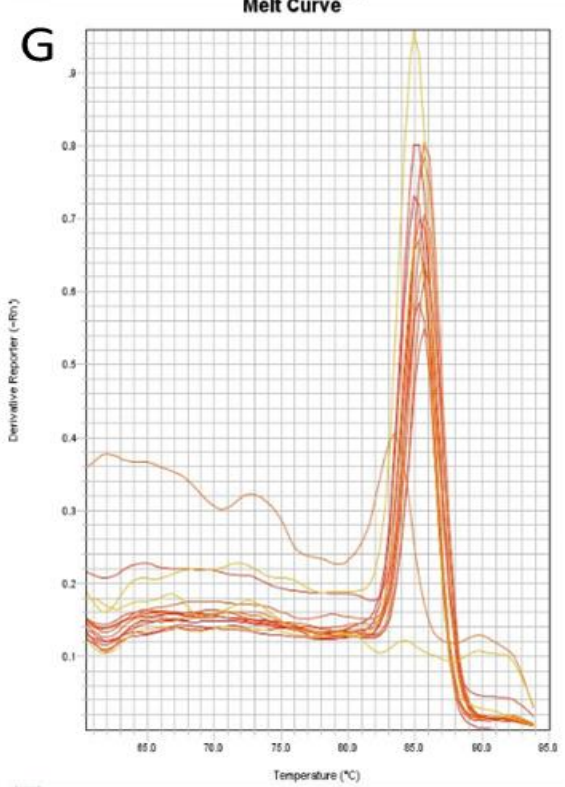
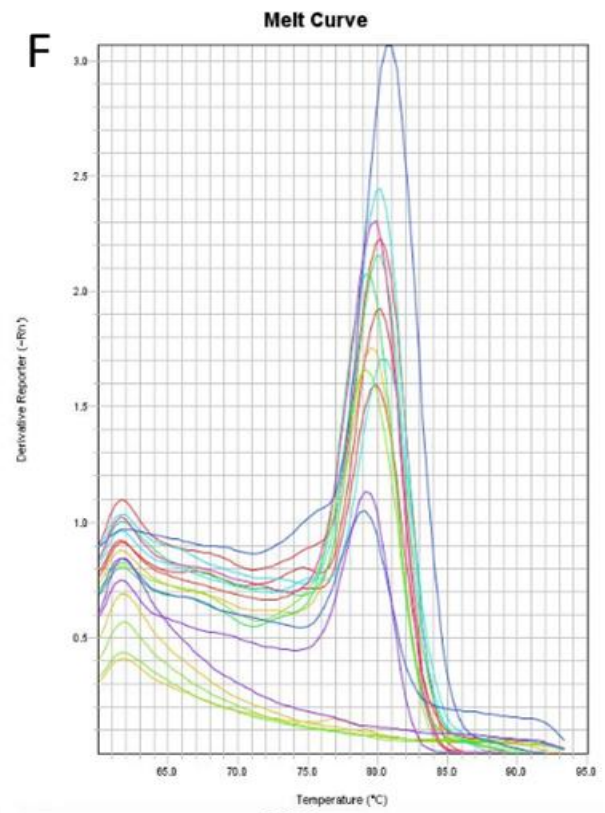
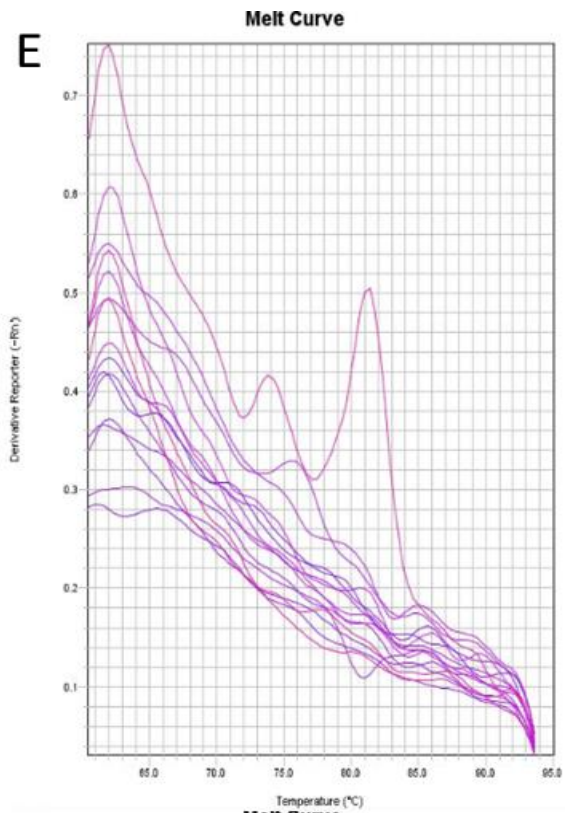
**Agradecimentos.**

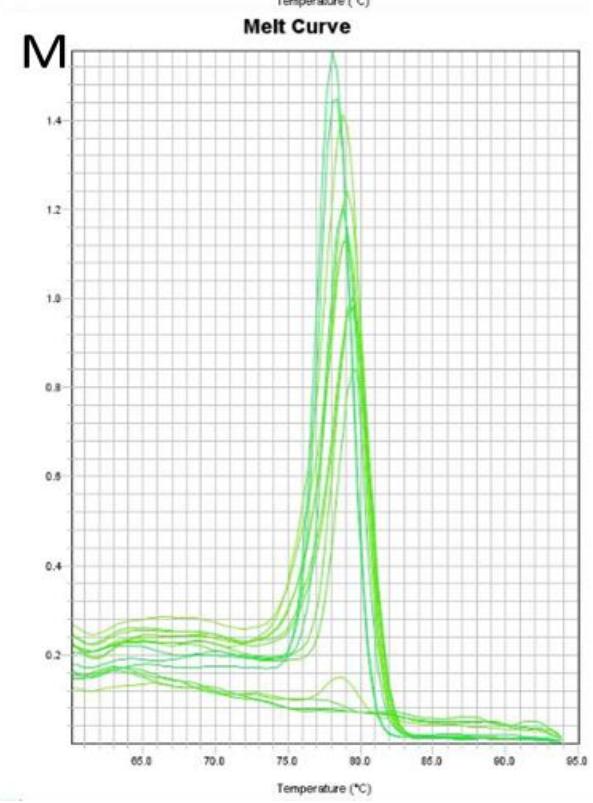
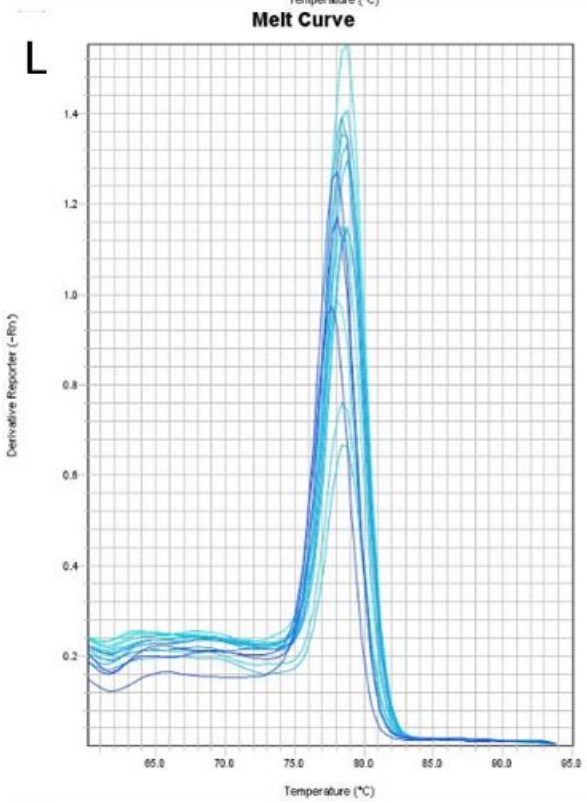
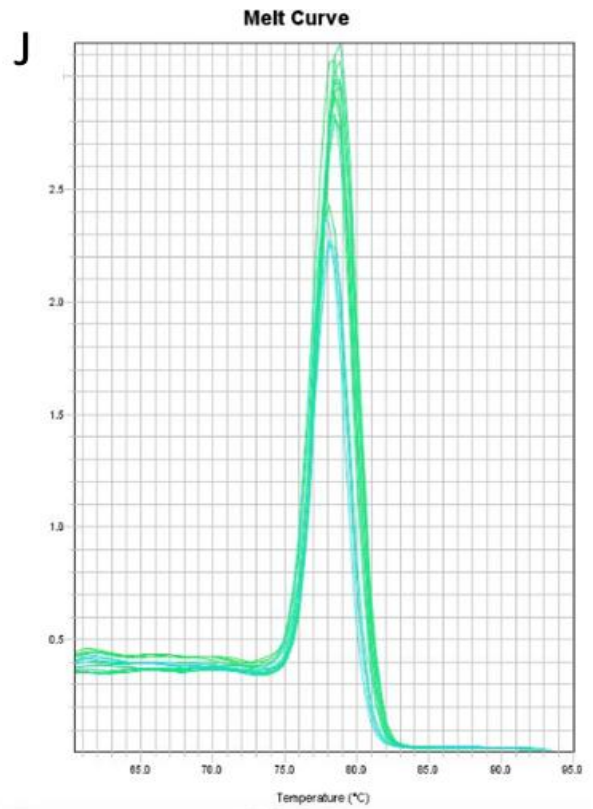
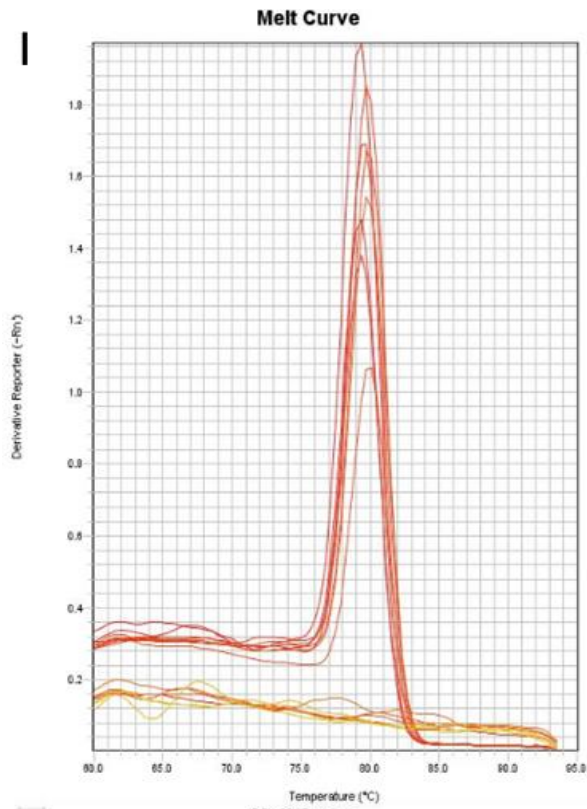
Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Mandioca e Fruticultura (Embrapa, Mandioca e Fruticultura Tropical) e a Universidade Federal do Recôncavo Baiano (UFRB).

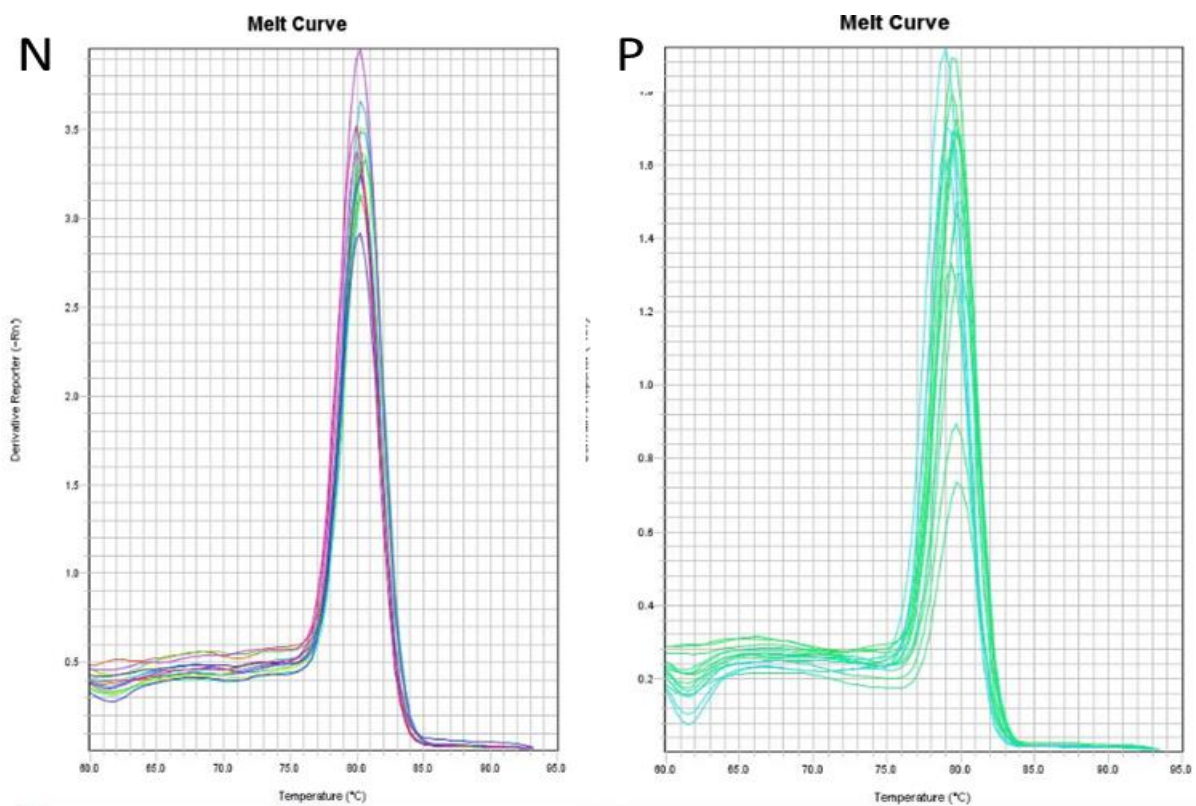


Material complementar.



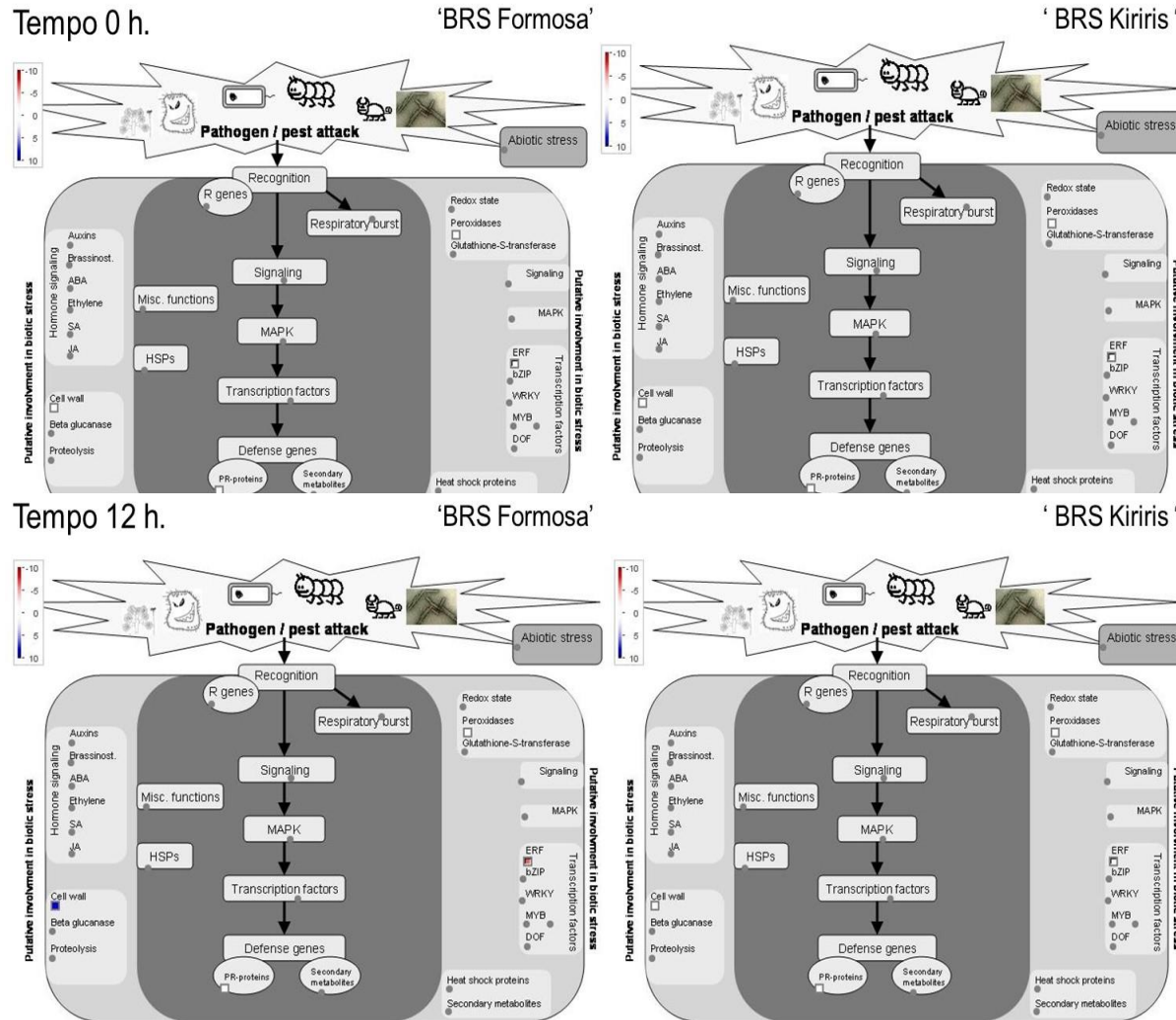






**Figura 4.** Curva de melting ou de dissociação obtida na curva de eficiência dos primers. A) 25 S, B) PP2A, C) MeCu/ZnSOD, D) MeBZIP, E) MeRZF, F) MeCPI, G) MeLEA H) MePAL, I) MANES.14G034600, J) MANES.16G007300, L) MANES.06G155600, M) MANES.04G096600, N) MANES.12G132900, P) MANES.11G013700.

## Avaliação de estresse biótico.



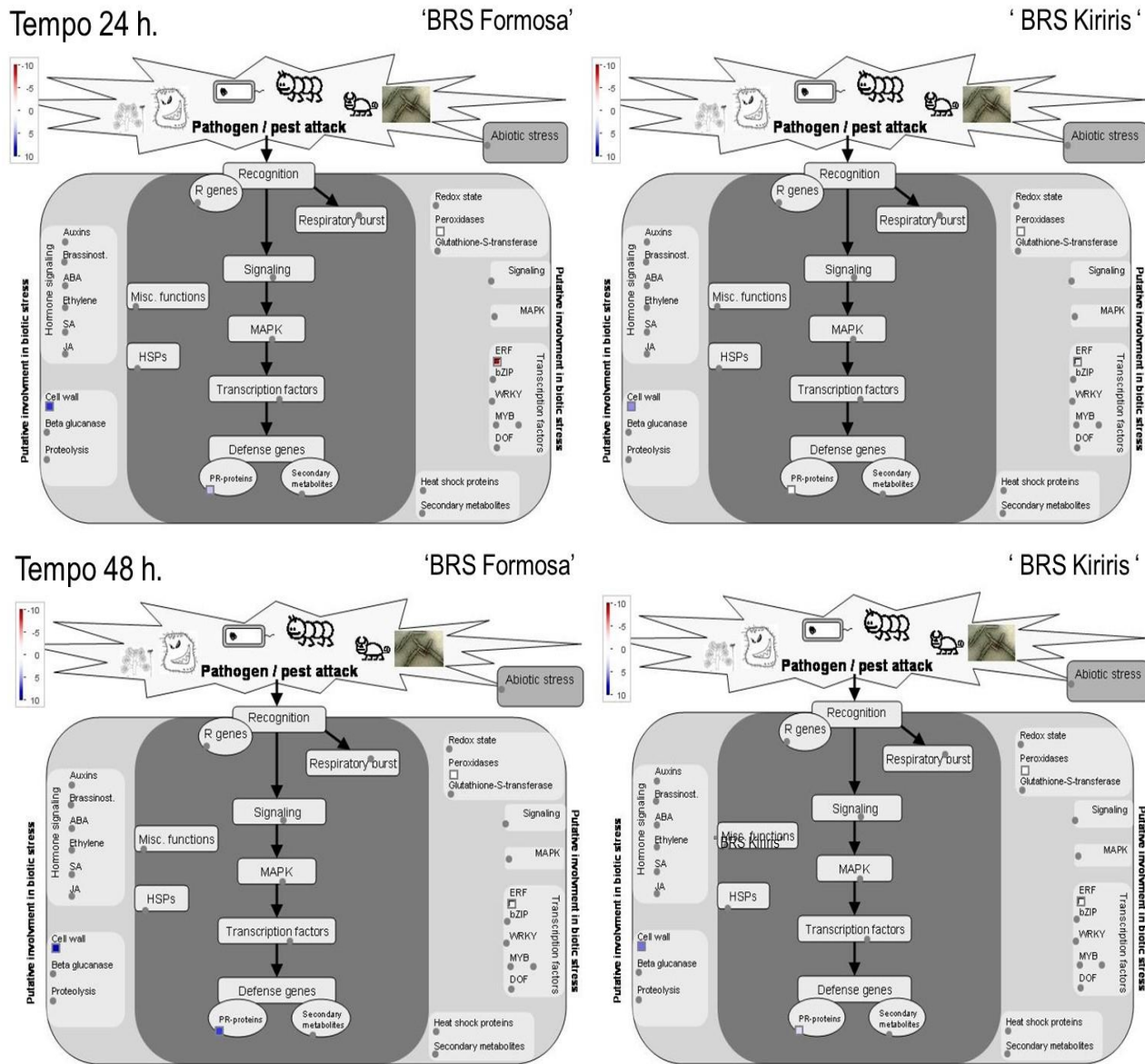
**Figura 5.** Perfis de expressão de genes mapeados para processos da via de estresse biótico, pelo software Mapman, a partir do log RQ (quantificação relativa obtida pelo RT-qPCR) nos tempos 0 e 12 horas. Cada quadrado representa um gene diferente mapeado para o mesmo processo. Pontos azuis representam os genes regulados positivamente, pontos vermelhos representam os genes regulados negativamente e branco os genes que possuem alguma indicação experimental de envolvimento na via.

A anotação funcional, com auxílio do software, possibilitou uma visão geral sobre as alterações ocasionadas pela inoculação nas variedades 'BRS Kiriris' (suscetível) e 'BRS Formosa' (resistente). Os padrões diferenciais de expressão gênica (mostrados por *log RQ*) dos seis genes avaliados foram comparados entre os tempos de interação. Foi possível observar que quatro genes foram mapeados na via de estresse biótico, relacionados à defesa de plantas, como PR - proteínas (Manes.06G155600), fator de transcrição do tipo ERF

relacionados à defesa de plantas, como PR - proteínas (Manes.06G155600), fator de transcrição do tipo ERF (Manes.11G013700), Peroxidase (Manes.16G007300) e respostas mediadas por parede celular (Manes.04G096600).

A anotação funcional, com auxílio do software, possibilitou uma visão geral sobre as alterações ocasionadas pela inoculação nas variedades 'BRS Kiriris' (suscetível) e 'BRS Formosa' (resistente). Os padrões diferenciais de expressão gênica (mostrados por *log RQ*) dos seis genes avaliados foram comparados entre os tempos de interação. Foi possível observar que quatro genes foram mapeados na via de estresse biótico, relacionados à defesa de plantas, como PR - proteínas (Manes.06G155600), fator de transcrição do tipo ERF (Manes.11G013700), Peroxidase (Manes.16G007300) e respostas mediadas por parede celular (Manes.04G096600)

Neste ensaio, em ambas as variedades ('BRS Kiriris' e 'BRS Formosa') os genes relacionados às respostas de estresse biótico mapeados não foram regulados positivamente nos níveis basais, apresentando valores de expressão próximos a zero. Indicativo de que, possivelmente, a resistência seja induzida após a inoculação. Em 12 horas a variedade 'BRS Formosa' apresentou expressão abrupta de resposta ao estresse biótico mediada por parede celular enquanto que não houve manifestação desta resposta na variedade susceptível 'BRS Kiriris'. Outra resposta detectada no ensaio foi a resposta Fator de Transcrição (ERF071) Responsivo ao Etileno que apresentou uma sensível repressão desta resposta.

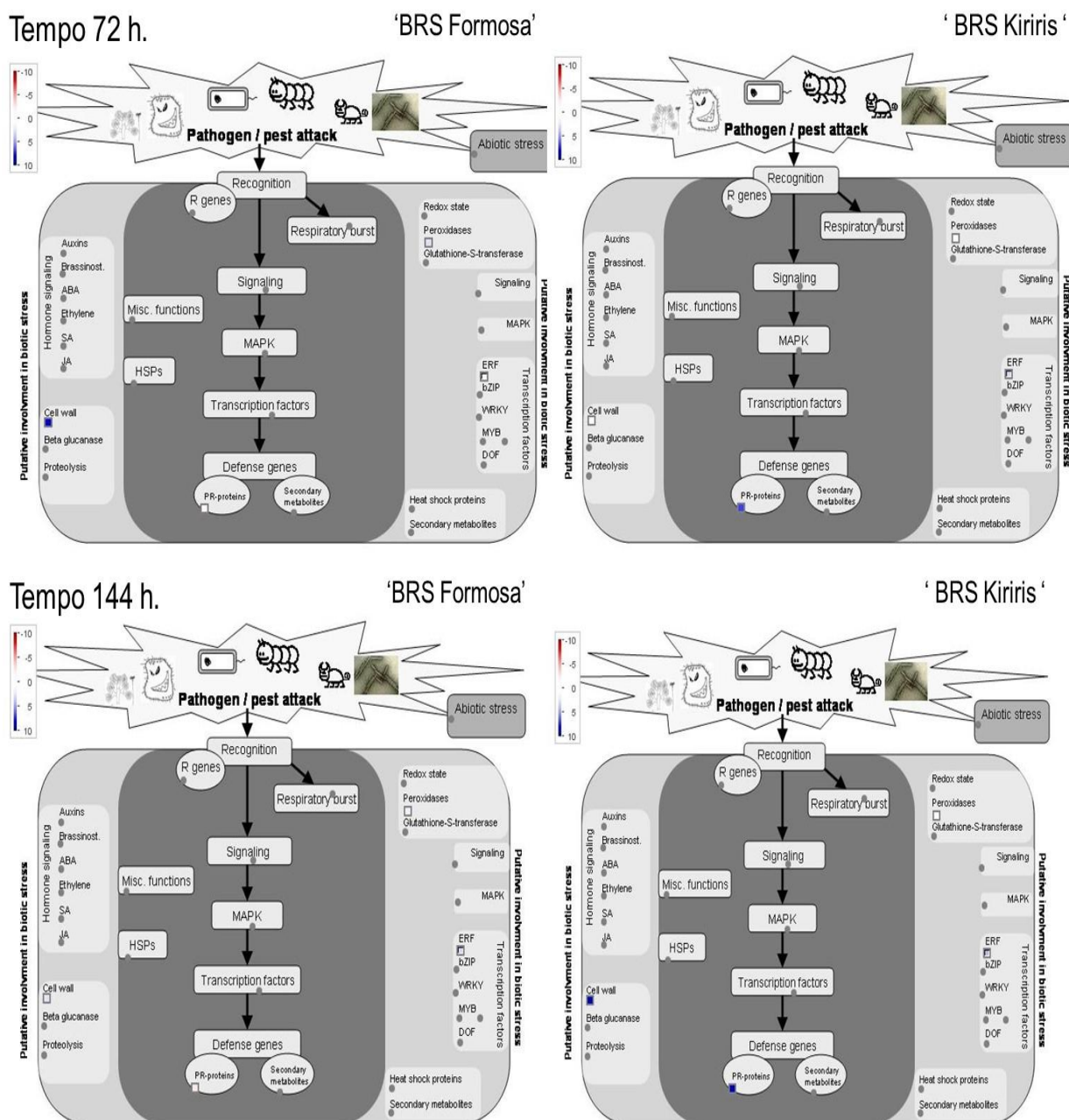


**Figura 6.** Perfis de expressão de genes mapeados para processos da via de estresse biótico, pelo software Mapman, a partir do log RQ (quantificação relativa obtida pelo RT-qPCR) nos tempos 24 e 48 horas. Cada quadrado representa um gene diferente mapeado para o mesmo processo. Pontos azuis representam os genes regulados positivamente, pontos vermelhos representam os genes regulados negativamente e branco os genes que possuem alguma indicação experimental de envolvimento na via.

Nos tempos 24 horas a variedade 'BRS Formosa' manteve superexpressa a resposta de parede celular contra o estresse biótico enquanto que a variedade 'BRS Kiriris' apresentou leve expressão da mesma resposta mostrando a ativação desta em 24 horas ambas as variedades mantiveram os mesmos níveis de expressão destas respostas em 48 horas.

Outra resposta mapeada nos tempos de 24 e 48 horas foi a resposta mediada por PR-Proteínas.

Esta resposta apresentou leve expressão pela variedade 'BRS Formosa em 24 horas e apresentou superexpressão em 48 horas. A variedade susceptível ' BRS Kiriris' manteve as taxas de expressão dessa resposta próxima a zero. Outra resposta mapeada neste ensaio nos tempos 24 e 48 horas foi a Fator de Transcrição (ERF071) Responsivo ao Etileno, apenas a variedade 'BRS Formosa' apresentou essa resposta mas demonstrou a repressão da mesma.



**Figura 7.** Perfis de expressão de genes mapeados para processos da via de estresse biótico, pelo software Mapman, a partir do log RQ (quantificação relativa obtida pelo RT-qPCR) nos tempos 72 e 144 horas. Cada quadrado representa um gene diferente mapeado para o mesmo processo. Pontos azuis representam os genes regulados positivamente, pontos vermelhos representam os genes regulados negativamente e



branco os genes que possuem alguma indicação experimental de envolvimento na via.

Em 72 horas a variedade 'BRS Formosa' manteve apenas a superexpressão da resposta mediada por parede Celular, mantendo os níveis do tempo anterior, porém apresentou valores desta resposta próximo a 0 no tempo 144 horas, indicando o silenciamento desta resposta.

A variedade 'BRS Kiriris' apresentou a primeira superexpressão de uma resposta que foi a mediada por PR-Proteínas em 72 horas elevando a expressão da resposta no tempo de 144 horas. Outra superexpressão mapeada pela variedade 'BRS Kiriris' foi a mediada por parede Celular, esta resposta mostrou-se muito tardia quando comparada a superexpressão detectada no mapeamento da variedade 'BRS Formosa' indicando respostas contrastantes como esperado entre variedades de perfis dispares quanto a resistência a CBB.

As respostas que foram mapeadas neste estudo são por meio da PR - proteínas (Manes.06G155600), fator de transcrição do tipo ERF (Manes.11G013700), Peroxidase (Manes.16G007300) e respostas mediadas por parede celular (Manes.04G096600). Destas respostas, as únicas que apresentaram expressão considerável, foram as mediadas por parede celular e PR-Proteínas.

As respostas de estresse biótico mediadas pela conformação da parede Celular demonstraram essenciais para a resistência contra a *Xpm*, visto que a expressão desta via foi muito discrepante entre a variedade resistente ("BRS Formosa") e a suscetível ('BRS Kiriris'). A variedade resistente aciona este tipo de resposta logo nos primeiros momentos pós infecção (12 horas). Este tipo de resposta mediada pelo gene MANES.04G096600 é tida como fundamental para o controle de infecção, pois ao regular a enzima Xiloglucano endotransglicosilase, este confere a célula maior resistência podendo assim impedir a entrada do patógeno e suportar melhor o estresse osmótico caso venha ocorrer (XUAN, et al., 2016). Este tipo de resposta é imediato, ocorrendo próximo ao momento da infecção e é consenso que plantas resistentes utilizam destes mecanismos para obter maior sucesso contra o patógeno (LOPEZ, et al. 2005). Isto fica claro ao comparar as duas variedades na qual a variedade resistente mobiliza esta rota de resposta já nas 12 primeiras horas pós infecção mantendo uma taxa considerável da resposta até o tempo de 72 horas. Neste mesmo ensaio a variedade suscetível acionou a resposta de forma considerável

apenas no tempo 144 horas e esta diferença pode ter resultado na acentuada suscetibilidade da variedade `BRS Kiriris´ contra a CBB.

As respostas do tipo PR-Proteínas são consideradas como mais específicas e tardias e tendem a ser acionadas pela cascata de sinalização mediada pelo Ácido Salicílico (LOPEZ, et al., 2015). Neste ensaio, o gene Manes.06G155600, responsável pela síntese da Quitinase III, teve sua ação mapeada, corroborando os demais estudos que demonstram a ação tardia dessa enzima na variedade resistente (`BRS Formosa´) que demonstrou superexpressão apenas em 48 horas, enquanto que a variedade suscetível (`BRS Kiriris´), mostrou superexpressão desta resposta em 72 e 144 horas.

Apesar de ser uma enzima com ação direcionada a patógenos fúngicos, a Quitinase III também possui ação bactericida ao atuar sobre a parede celular de bactérias Além desta, sua ação é apreciada no declínio da população de organismos oportunistas (CAVALCANTI, et al. 2016). Neste estudo ficou claro que este tipo de mecanismo foi acionado pela presença do patógeno e que a sua resposta aguda e mais antecipada por parte da variedade resistente em relação à suscetível pode sinalizar que este seja um elemento de resistência contra a CBB.

Neste estudo, a resposta mediada pelo fator de transcrição do tipo ERF associada ao gene MANES.11G013700 e conseqüentemente ao hormônio e Etileno, mostrou um perfil contrastante entre as variedades. A variedade `BRS Formosa´ exibiu uma forte repressão desta resposta nos primeiros momentos pós infecção (12 e 24 horas) e essa repressão iniciada em 12 horas mostrou-se mais forte em 24 horas. Este tipo de resposta pode ter desencadeado na variedade resistente fator significativo para o sucesso contra o patógeno, pois ao reprimir essa resposta a planta manteve a integridade dos tecidos vegetais. Além disso, impediu a mobilização de reservas energéticas que poderiam ser aproveitadas pelo patógeno (MCGRATH, et al., 2005). Comparando as variedades, fica claro que essa resposta foi acionada pelo patógeno e que há um contraste entre as variedades indicando que este gene pode estar potencialmente associado à resistência à CBB.

## Referências.

ABI, J.; SEYMOUR, G.; GRAHAM, N.; BROADLEY, M.; MAY, S.; LAJOLO, F.; CORDENUNSI, B.; NASCIMENTO, J. Analysis of ripening-related gene expression in papaya using an *Arabidopsis*-based microarray. **BMC Plant Biologie**. n.12, pg 2-19, 2012. Disponível em <[www.biomedcentral.com/1471-2229/12/242](http://www.biomedcentral.com/1471-2229/12/242)>.

BENAVIDES, N.; ALVAREZ, A.; ORTIZ, M.; RODRIGUEZ, L.; BOTERO, D.; TABIMA, J. The type VI secretion system of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* is involved in virulence and *in vitro* motility (2021). **BMC Microbiology**. v. 21, n. 14, pg. 138-145, 2021. doi:10.1186/s12866-020-02066-1.

CARVALHO, N. Resistência genética induzida em plantas cultivadas. **Revista electronica em gestão, educação e tecnologia ambiental**. v.7, n.7, p.1379-1390, 2012. Disponível em: <[periodicos.ufsm.br/reget/article/viewFile/5930/3603](http://periodicos.ufsm.br/reget/article/viewFile/5930/3603)>

COEGO, A.; RAMIREZ, V.; GIL, J.; FLORS, V.; MAUCH-MANI, B.; VERA, P. an *Arabidopsis* homeodomain transcription factor, overexpressor of cationic peroxidase 3, mediates resistance to infection by necrotrophic pathogens. **The Plant Cell**. n. 10, v. 17, p. 2123-2137, 2010. DOI.org/10.1105/tpc.105.032375

COSTA, M.; LOVATO, P.; SETE, B. Mycorrhizal inoculation and induction of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases and fusarium resistance in grapevine rootstock. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.45, n.4, p.376-383, 2010. DOI.org/10.1590/S0100-204X2010000400005

DELGADO, Y.; CASTRO, I.; ARVELO, F. La muerte celular programada en las plantas: ¿es semejante a la “apoptosis” en animales?. **Interciência**. v. 32, n. 12, p. 812-830. DOI.812 0378-1844/07/12/812-08.

DEUNER, C.; BORGES, C.; ALMEIDA, A.; MENEGHELLO, G. Ácido jasmônico como promotor de resistência em plantas. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 38, n. 3, pg. 85-94. Disponível em: <[www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0871-018X2015000300001](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2015000300001)>

DOWD, P.; JHONSON, E. Association of a specific cationic peroxidase isozyme with maize stress and disease resistance responses, genetic identification, and identification of a cDNA coding for the isozyme. **Journal Agrico and Food Chemical**. v. 53, n. 11, p. 4464-4470. DOI.org/10.1021/jf0404750

EZALKI, M.; ZHANG, W.; FENG, A.; QIOU, X.; ZHAO, W.; HAN, Z. Constitutive overexpression of cytochrome P450 associated with imidacloprid resistance in

*Laodelphax striatellus* (Fallén). **Pest Mange Science**. v. 72, pg. 1051-1058. DOI.org/10.1002/ps.4155.

GARCIA, F.; PEREZ, F.; LARZABAL, M. Type VI Secretion System in Pathogenic *Escherichia coli*: Structure, Role in Virulence, and Acquisition. **Microbial Physiology and Metabolism**. v. 32, n. 21, p. 118-126. DOI.org/10.3389/fmicb.2019.01965.

GUNUPURU, L.; ARUNACHALAM, C.; MALLA, K.; KAHLA A.; PEROCHON, A. A wheat cytochrome P450 enhances both resistance to deoxynivalenol and grain yield. **Plos One**. v.12, pg. 255 – 264, 2018. DOI.org/10.1371/journal.pone.0204992.

HAN, L.; LI, Y.; WANG, F.; WANG, W.; LIU, J.; ZHONG, N. The cotton apoplastic protein *crr1* stabilizes chitinase 28 to facilitate defense against the fungal pathogen *Verticillium dahliae*. **The Plant Cell**. v. 31, p. 520-536, 2019. DOI.org/10.1105/tpc.18.00390

HU, M.; HU, W.; XIA, Z.; ZHOU, X.; WANG, W. Validation of Reference Genes for Relative Quantitative Gene Expression Studies in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by Using Quantitative Real-Time PCR. **Fontiers in Plant Science**. n. 680, v. 7, 2018. DOI 10.3389/fpls.2016.00680.

HU, Wei; YANG, Hubiao; WEI, Yunxie; TIE, Weiwei; DING, Zehong; ZUO, Jiao; PENG, Ming; LI, Kaimian. Genome-wide characterization and analysis of bZIP transcription factor gene family related to abiotic stress in cassava. **Scientific Reports**, v. 6, n. 02, 2016. doi.org/10.1038/srep22783.

IKEDA, K.; NAKAYASHIKI, H.; TAKAGI, M.; TOSA, Y. Heat shock, copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY residente in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grise*. **Molecular Genética and Genomics**. n. 266, pg. 318-325. DOI.org/10.007/s004380100560.

JORGE, V.; MARTIN, F.; DUQUE, M.; BONIERBALE, M. Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**. v. 12, n. 35, p. 865-872. Disponível em: <www.researchgate.net/publication/225488182>.

KANDEL, S.; LAMPE, J. Role of Protein–Protein Interactions in Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism and Toxicity. **Chemical Research in Toxicology**. n. 27, v. 9, pg. 1474-1486, (2014). DOI.10.1021/tx500203s

KOCH, A.; STWART E.; KAIMAN K. RNA-based disease control as a complementary measure to fight Fusarium fungi through silencing of the azole target Cytochrome P450 Lanosterol C-14  $\alpha$ -Demethylase. v. 152, p. 1003-1010, 2018. DOI.org/10.1007/s10658-018-1518-4

KUMAR, M.; BRAR, A.; YADAV, M.; CHAWADE, A. Chitinase potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens. **Agriculture**. n. 8, v.88, p. 3-12, 2018. DOI.10.3390/agriculture8070088.

LAMB, C.; DIXON, R. The oxidative burst in plant disease resistance. **Plant Molecular Biology**. n. 48, pg. 252 – 259, 1997. DOI.1040-2519/97/0601-0251.

LAMBRET-FROTTÉ, J.; ALMEIDA, L.; MOURA, S.; SOUZA, F.; LINHARES, F.; FERREIRA, M. Validating Internal Control Genes for the Accurate Normalization of qPCR Expression Analysis of the Novel. **Journal Plos One**. v. 12, n. 6, p. 1–22, 2015. DOI.10.1371/journal.pone.0135006.

LE MAY, C.; POTAGE, G.; ANDRIVON, D.; TRIVOLI, B.. Plant disease complex: antagonism and synergism between pathogens of the ascochyta blight complex on pea. **Plant Physiology and Biochemistry** v. 157, n. 22, p. 118-123, 2009. DOI.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01546.x

LIMA, A.; MOURA, E.; ISHIDA, A.; PEREIRA, A.; REIS, S.; SOUZA, A. Expression profiles of defense genes in cassava storage roots upon exposure to *Phytophthium* sp., causal agent of soft root rot disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 104, n. 12, p. 23–30, 2018. DOI.org/10.1016/j.pmpp.2018.09.001.

LI, N.; HAN, X.; FENG, D.; YUN, D.. Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: do we understand what they are whispering?. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 20, n. 671, p. 2-15, 2019. DOI.org/10.3390/ijms20030671

LI, Q.; HU, A.; DOU, W.; QI, J.; LONG, Q.; ZOU, X.; LEI, T. Systematic analysis and functional validation of citrus xth genes reveal the role of csxth04 in citrus bacterial canker resistance and tolerance. **Plant science**. v. 10, n. 1109, p. 1-14, 2019. DOI.org/10.3389/fpls.2019.01109

LIU, D.; HUANG, X.; JING, W.; AN, X.; ZHANG, Q. Identification and functional analysis of two p450 enzymes of *Gossypium hirsutum* involved in dmnt and tmnt biosynthesis. **Plant Biotechnology**. v. 16, n. 2, p. 581-590, 2017. DOI.org/10.1111/pbi.12797

LI, X.; LIU, W.; LI, B.; LIU, G.; WEI, Y.; HE, C.; SHI, H. Plant Physiology and Biochemistry Identification and functional analysis of cassava DELLA proteins in plant disease resistance against cassava bacterial blight. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 124, n. 9, p. 70–76, 2018. DOI.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.022

LI, X.; FAN, S.; HU, W.; LIU, G.; WEI, Y.; HE, C.; SHI, H.. Two Cassava Basic Leucine Zipper (bZIP) Transcription Factors (MebZIP3 and MebZIP5) Confer Disease

Resistance against Cassava Bacterial Blight. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2017. DOI.org/10.3389/fpls.2017.02110.

LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.; SOLANO, R. Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **The Plant Cell**. v.15, p.166-178. DOI.org/10.1105/tpc.007468

MARTINELLI, F.; SCALENGHE, R.; DAVINO, S.; PANNO, S.; SCUDERI, G.; RUISI, P.; VILLA, P. Advanced methods of plant disease detection . A review. **Agronomic sustained developed**. v. 12, n. 4, p. 123-148, 2015. doi 10.1007/s13593-014-0246-1.

MBARINGONG, G.; NYABOGA, E.; KANDUMA, E.. Evaluation of Selected Cassava ( *Manihot eesculenta* Crantz ) cultivars grown in kenya for resistance to bacterial blight disease (2017). **World Journal of Agricultural Research**, v. 5, n. 2, p. 94–101, 2017. Disponível em: <<http://pubs.sci epub.com/wjar/5/2/5>>.

MEJIA, Cindy; FARFÁN, Diana; MONTANA, José; RESTREPO, Silvia; JIMÉNEZ, Pedro; DANIES, Giovanna; BOCANEGRA; María. Acibenzolar-S-methyl induces protection against the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). **Journal of Plant Diseases and Protection**. v.12, n. 125, p.112-125, 2021. DOI.org/10.1007/s41348-021-00427-0

MOHAMED, H.; AKLADIOUS, S. Changes in antioxidants potential, secondary metabolites and plant hormones induced by different fungicides treatment in cotton plants. **Brazilian Agricultural** v. 142, p.117-122, 2017. DOI.org/10.1016 /j.pestbp.2017.04.001

MORA, R.; RODRIGUEZ, M.; GAYOSSO, L.; LÓPEZ, C. Using *in vitro* plants to study the cassava response to *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* infection. **Tropical Plant Pathology**. v. 12, n. 44, p. 423-429. DOI.10.1016/j.pmpp .2018.07.005.

OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, S.; SANTOS, V.i; BOA, S.; HOHENFELD, C.; SANTOS, V. Selection of cassava accessions with multiple resistance to pathogens associated with root rot disease. **Euphytica**. v. 185, p. 3-13, 2017. DOI.10.1007/s10681-017-1973-6

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO), Produzir mais com menos: Mandioca, um guia para a intensificação sustentável da produção. **Informe de Política**. Disponível em < [www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/pt/index.html](http://www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/pt/index.html) > .

PÉREZ-QUINTERO, Á.; QUINTERO, A.; URREGO, O.; VANEGAS, P.; LÓPEZ, C. Bioinformatic identification of cassava miRNAs differentially expressed in response to infection by *Xanthomonas axonopodis* pv . *manihotis*. **BMC Plant Biology**. v. 12, n. 29, p. 81 – 92, 2012. Disponível em< [www.biomedcentral.com/1471-2229/12/29](http://www.biomedcentral.com/1471-2229/12/29) >.

PHAN, T.; FRY, S. Functional and chemical characterization of XAF: a heat-stable plant polymer that activates xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH). **Annals of Botany**. v.124, p. 131-147, 2019. DOI.10.1093/aob/mcz050

QUINTERO, A.; PÉREZ-QUINTERO, A.; LÓPEZ, C. Identification of ta-siRNAs and Cis-nat-siRNAs in Cassava and Their Roles in Response to Cassava Bacterial Blight. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 11, n. 3, p. 172–181, 2013. DOI.org/10.1016/j.gpb.2013.03.001

RAMIREZ, E.; DEREPPER, A.; BERNAL, A.; SZUREL, B.; LÓPEZ, C. 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, n.10, p. 202-208, 2020. DOI.org/10.1016/j.pmpp.2020.101535.

RUBIO, J.; CARRASCAL, C.; MELGAREJO, L. Physiological behavior of cassava plants (*Manihot eesculenta* Crantz) in response to infection by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* under greenhouse conditions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 100, n. 2, p. 136-141, 2017. DOI.org/10.1016/j.pmpp.2017.09.004.

SÁ, G.; SANTOS, E.; FRAGA, C.; REGINA, L.; GUIMARÃES, T. Padronização do método PCR Quantitativo em Tempo Real para análise da expressão do gene Receptor da Leptina no Carcinoma Epidermóide de Boca. *In: Fórum de ensino, pesquisa, extensão e gestão da UNIMONTES*. Ano 8º, Montes Claros, Minas Gerais 2014, Anais do : Fórum de ensino, pesquisa, extensão e gestão da UNIMONTES. Disponível em: <www.fepeg2014.unimontes.br/sites/default/files/resumos/arquivo\_pdf\_anais/resumo\_-\_eficiencia\_primer\_lepr\_2.pdf >.

SVEC, David; TICHOPAD, Ales; NOVOSADOVA, Vendula. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. **Biomolecular Detection and Quantification**. n. 3, p. 9-16, 2015. Doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005.

TANG, D.; CHRISTIANSEN, K.; INNES, R. Regulation of plant disease resistance, stress responses, cell death, and ethylene signaling in *arabidopsis* by the *edr1* protein kinase. **Plant physiology**. v. 138, p. 1019-1551, 2005. DOI.org/10.1104/pp.105.060400.

TAPPIBAN, P.; SRAPHET, S.; SRISAWAD, N.; SMITH, D.; TRIWITAYAKORN, K. Identification and expression of genes in response to cassava bacterial blight infection. **Journal of Applied Genetics**. v. 59, n. 4, p. 391–403, 2018. DOI.org/10.1007/s13353-018-0457-2.

VERDIER, V.; LOPEZ, C.; BERNAL, A. Bacterial blight Vascular ( o Añublo Bacteriano ) de la Yuca Causada por *Xanthomonas axonopodis* pv . *manihotis*. **La yuca en el**

**tercer milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización**, cap. 9 p. 200–212, 2012.

YOODEE, S. Phytohormone priming elevates the accumulation of defense-related gene transcripts and enhances bacterial blight disease resistance in cassava. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 122, n. October 2017, p. 65–77, 2018. DOI.org/10.1016/j.plaphy.2017.11.016.

YAN, J.; HUANG, Y.; HE, H.; SECHET, J.; FANG, L.; Xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase30 negatively affects salt tolerance in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**. v. 70, n. 19, p. 5494-5506. DOI.10.1093/jxb/erz311.

YAN, L.; YAO, J. Chloroplasts at the Crossroad of Photosynthesis, Pathogen Infection and Plant Defense. **Internantional Journal of Molecular science**. n.19, v. 3900, 2018. DOI.10.3390/ijms19123900.

YAN, Y.; APALIYA, M.; YANG, H.; ZHANG, H. Transcriptome characterization and expression profile of defense-related genes in pear induced by *Meyerozyma guilliermondii*. **Postharvest Biology and Technology**. v. 141, p. 63-70, 2018. DOI.org/10.1016/j.postharvbio.2018.03.011

YANG, X; GOLAM, A., CAIJUN, W.; SHU-YING, F. Crosstalk among Jasmonate, Salicylate and Ethylene Signaling Pathways in Plant Disease and Immune Responses. **Current, protein and peptide science**. v.16, n. 5, p.450-461. DOI.org/10.1104/pp.105.060400.

ZHAO, L; DING, Q., ZENG, J.; WANG, F.; ZHANG, J.; FAN, S.; HE, X. An Improved CTAB–Ammonium Acetate Method for Total RNA Isolation from Cotton. **Phytochemical Analysis**. n. 23, p. 647-650, 2012. DOI.10.1002/pca.2368.

WALLY, O.; PUNJA, Z. Enhanced disease resistance in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants over-expressing a rice cationicperoxidase. **Planta**. n. 232, p. 1229-1239, 2010. DOI.10.1007/s00425-010-1252-4.

WANG, Y.; FENG, G.; ZHANG, Z.; LIU, Y. Overexpression of Pti4, Pti5, and Pti6 in tomato promote plant defense and fruit ripening. **Plant Science**. v. 302, p. 110 -118, 2021. DOI.org/10.1016/j.plantsci.2020.110702



## Considerações finais

A CBB pelas suas características, alcance e agressividade se torna uma das doenças mais importantes da cultura da mandioca. O entendimento de novos protocolos que visem obter resultados interessantes, baixos riscos e custos são muito importantes. O uso de indutores de resistência como o Fosfito de cobre e controles químicos como Sulfato de cobre se mostraram bastante eficazes neste estudo, podendo ser um ponto de partida para novos protocolos que visem o controle da doença no campo. Os Bacilos TRA 058895 e TRA 058893 e o indutor de resistência ASM mostraram-se interessantes quanto ao uso como futuros controles biológicos contra a CBB. Estes tratamentos ainda carecem de mais estudos a fim de se obter protocolos otimizados quanto ao seu uso na mandioca.

Apesar da busca de novos protocolos para conter a CBB, o uso de variedades resistentes mostra-se mais eficiente. Ensaios de resistência baseados na avaliação fenotípica ainda são morosos e pelo caráter controlado destes tipos de ensaio, o mesmo não atende algumas nuances que são fundamentais para o entendimento do comportamento da doença e a resistência da variedade. O entendimento de mecanismos moleculares é fundamental para traçar a capacidade de resistência de uma variedade contra a CBB. A chave para entender estes mecanismos está baseada no entendimento da expressão de genes associados à resistência ao longo do tempo. Os genes MANES.04G096600, MANES.14G034600, MANES.12G132900 , MANES.06G155600 mostraram flutuações da sua expressão interessantes e que estabeleceram uma provável correlação entre a expressão desses genes com o desenvolvimento da doença. Este estudo corrobora com a ideia de que se pode prosseguir com estudos de validação quanto a sua capacidade de agregar resistência à CBB.