



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS**

CAMILA SANTIAGO HOHENFELD

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO “MANDIOCA ×
PODRIDÕES RADICULARES” POR MEIO DE
MAPEAMENTO ASSOCIATIVO, TRANSCRIPTÔMICA E
CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES PATOGÊNICAS EM
SUPORTE À OBTENÇÃO DE PLANTAS RESISTENTES**

CAMILA SANTIAGO HOHENFELD

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO “MANDIOCA ×
PODRIDÕES RADICULARES” POR MEIO DE
MAPEAMENTO ASSOCIATIVO, TRANSCRIPTÔMICA E
CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES PATOGÊNICAS EM
SUPORTE À OBTENÇÃO DE PLANTAS RESISTENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dra. Adriana Rodrigues Passos
Coorientadores: Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira
Prof. Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

Feira de Santana - BA
2020

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

Hohenfeld, Camila Santiago

H659c Caracterização da interação “mandioca x podridões radiculares” por meio de mapeamento associativo, transcriptômica e caracterização de espécies patogênicas em suporte à obtenção de plantas resistentes. / Camila Santiago Hohenfeld. – 2020.
155 f.; il.

Orientadora: Adriana Rodrigues Passos

Co-orientadores: Eder Jorge de Oliveira; Saulo Alves Santos de Oliveira
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa, de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Feira de Santana, 2020.

1.Manihot esculenta Crantz. 2.Patógenos habitantes de solo. 3.GWAS.
4.RNA-Seq. I.Passos, Adriana Rodrigues, orient. II. Oliveira, Eder Jorge de, co-orient. III.Oliveira, Saulo Alves de, co-orient. IV.Universidade Estadual de Feira de Santana. V. Título.

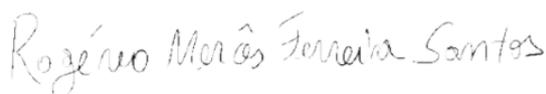
CDU: 633.493

Maria de Fátima de Jesus Moreira - Bibliotecária - CRB-5/1120

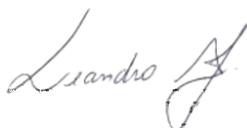
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Tiago Antônio de Oliveira Mendes
(Universidade Federal de Viçosa - UFV)



Prof. Dr. Rogério Mercês Ferreira Santos
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)



Prof. Dr. Leandro Alvarenga Santos
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)



Prof. Dr. Luiz Cláudio Costa Silva
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)



Profa. Dra. Adriana Rodrigues Passos
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)
Orientadora e Presidente da Banca

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Guilherme, por toda luz;

À minha mãe Evanilda, meu porto seguro;

À minha irmã Larissa, minha parceira de vida.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, a causa primária de todas as coisas, por todo amor, luz e presença em minha vida;

À minha família, especialmente minha mãe, minha irmã e Ramos, pelo apoio incondicional, pelo estímulo e por sonharem meus sonhos junto comigo;

À Bel, pela paciência absurda, pela presença, pelo companheirismo, pelo carinho, pela parceria e pelo amor;

À professora Dr.^a Adriana Passos, pela oportunidade e confiança, pela troca, paciência e aprendizado durante esses quatro anos;

Ao pesquisador Dr. Eder Jorge de Oliveira, pelas oportunidades dadas desde a minha graduação, pela confiança em mim depositada, pelos conhecimentos compartilhados, pelo exemplo de profissional dedicado e comprometido. Obrigada por esses 10 anos de orientação;

Ao pesquisador Dr. Saulo Alves dos Santos de Oliveira, pela paciência, pela presença constante, por todo apoio em experimentos, por todos ensinamentos, por ampliar minhas ideias. Também te agradeço por esses 10 anos de orientação e parceria;

À pesquisadora Dr.^a Cláudia Fortes, pelas orientações, pela troca de conhecimento, pela parceria e disponibilidade;

Ao Laboratório de Bioinformática Aplicada à Bioenergia (USP), em nome do professor Dr. Gabriel Rodrigues Alves Margarido e da sua equipe: Fernando, Guilherme, Victor, Amanda, Letycia e Cris (agregada). Obrigada pelos dias intensos de aprendizado, pela atenção, pela disponibilidade, pela ajuda e pela amizade;

Aos Laboratórios de Fitopatologia e Biologia Molecular da Embrapa, em especial a Andresa, Leandro, Paulo, Raimundo e Vanderson por todo apoio e disponibilidade;

À Equipe Mandioca (genética e fitopatologia), em especial a todos estagiários, pelos momentos compartilhados, pelas trocas de conhecimento, pela parceria e ajuda;

Aos meus amigos da Embrapa, especialmente Rafael, Ravena, Nara, Luciano, Massaine, Selma, Diego e Juraci, pela amizade, companheirismo e todo aprendizado compartilhado;

Aos meus amigos de turma e de vida, Alírio, Dany e Anne, por dividirem as lutas e as glórias dessa caminhada que foi nosso doutorado. Obrigada por toda atenção, parceria ajuda e principalmente pela amizade;

Aos meus amigos fora do mundo acadêmico, obrigada por todo incentivo, por entenderem a minha ausência e por torcerem por cada conquista minha;

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV), representados por todos os professores e funcionários, pela oportunidade de realização deste curso;

À Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), pelo apoio institucional e infraestrutura de trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida;

Obrigada a todos que contribuíram, me apoiaram e torceram pela realização dessa etapa!

RESUMO: A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma espécie que possui importância alimentar, econômica e social na África, Ásia e América Latina. Contudo, várias doenças podem afetar sua produtividade, dentre elas a podridões radiculares, causada por um complexo de patógenos, destacando-se os fungos do gênero *Fusarium*, da família *Botryosphaeraeaceae* e oomicetos do gênero *Phytophthora*. As perdas na produção podem chegar a 100%, dependendo da intensidade da incidência, severidade dos sintomas e susceptibilidade das variedades de mandioca. O plantio de variedades resistentes é a abordagem mais econômica e eficiente para controlar as podridões radiculares. Avanços nas áreas de fisiologia vegetal, bioquímica e genômica vêm contribuindo para o entendimento do comportamento das plantas na interação planta-patógeno e as respostas dos mecanismos de defesa. Entretanto, estudos sobre a interação entre *M. esculenta* e os fungos causadores das podridões radiculares são incipientes no Brasil. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi identificar os mecanismos de resistência relacionados à podridão radicular da mandioca por meio da avaliação da atividade enzimática de patógenos e caracterização molecular do processo de infecção, visando sugerir um modelo de resistência à podridão radicular em mandioca. Para isso, foram utilizadas três estratégias: 1) O estudo do crescimento *in vitro*, agressividade e atividade enzimática de isolados fúngicos associados às podridões radiculares, onde foram isolados 71 fungos, classificados como pertencentes a seis gêneros diferentes (*Gongronella* sp., *Myrothecium* sp., *Colletotrichum* sp., *Dipodascus* sp., *Fusarium* sp. e *Lasiodiplodia* sp.) compoem uma pequena parte da microbiota do solo de uma área de cultivo de mandioca. Esses isolados diferiram quanto o seu crescimento e foram agrupados em quatro classes de velocidade do crescimento micelial (alta, moderada, baixa e extremamente baixa), sendo os fungos de *Lasiodiplodia* sp. aqueles com maior velocidade de crescimento. Em relação à severidade, os isolados *Lasiodiplodia* sp. também foram os mais agressivos, provocando maiores áreas lesionadas em raízes de mandioca. Quanto à atividade enzimática extracelular, os isolados associados à podridão seca produziram as sete enzimas extracelulares avaliadas (pectinase, pectina liase, amilase, protease, urease, celulase e lacase), enquanto os isolados associados à podridão negra não produziram amilase e urease. 2) O estudo da resistência genética à podridão radicular em condições de campo, onde 148 genótipos de mandioca pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura, foram plantados em uma área com alta incidência de podridões. Com base nos valores das análises fenotípicas de resistência (sobrevivência e índice de doença) e dos caracteres agrônômicos de interesse (altura de planta, produtividade de parte aérea e produtividade de raiz) esses genótipos foram agrupados em cinco *clusters*, e classificados quanto ao nível de resistência à podridão radicular como “Extremamente Suscetível”, “Suscetível”, “Moderadamente Suscetível”, “Moderadamente Resistente” e “Resistente”. Os 10 genótipos com melhor desempenho em campo (TOP-10) foram selecionados como potenciais parentais para o desenvolvimento de progênies segregantes. Também foi realizada uma análise de associação genômica ampla que detectou cinco SNPs significativos para produtividade de raízes em solo infestado com podridões, cuja anotação gênica indica funções relacionadas a mecanismos de defesa contra estresses bióticos e abióticos. 3) A análise do transcriptoma, por meio da técnica RNASeq; Dois genótipos de mandioca contrastantes em resposta à infecção por podridão radicular, foram desafiados por um mix de patógenos causadores de podridão negra e seca onde foram identificados 18 genes candidatos que desempenham importantes papéis na resistência contra a doença e que podem ser utilizados na seleção assistida por marcadores moleculares para identificação e desenvolvimento de genótipos resistentes. Nossos resultados representam avanços importantes relacionados ao entendimento da epidemiologia e da dinâmica da doença em campo, correlacionados com o conhecimento sobre os mecanismos de defesa envolvidos na resistência às podridões radiculares.

Palavras – chave: *Manihot esculenta* Crantz. Patógenos habitantes de solo. GWAS. RNA-Seq.

Abstract - Abstract – Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a species that has food, economic and social importance in Africa, Asia and Latin America. However, several diseases can affect its productivity, among them root rot, caused by a complex of pathogens, highlighting the fungi of the genus *Fusarium*, the family *Botryosphaeraceae* and oomycetes of the genus *Phytophthora*. The losses in production might achieve 100%, depending on the intensity of the incidence, severity of symptoms and susceptibility of cassava varieties. Planting resistant varieties is the most economical and efficient approach to control root rot. Advances in plant physiology, biochemistry and genomics have contributed to the understanding of plant-pathogen interaction behavior and the responses of defense mechanisms. However, studies on the interaction between *M. esculenta* and the fungi causing root rot are incipient in Brazil. Therefore, the objective of this work was to identify the resistance mechanisms related to root rot in cassava by evaluating the enzymatic activity of pathogens and molecular characterization of the infection process, aiming to suggest a model of resistance to root rot in cassava. For this, three strategies were used: 1) The study of the in vitro growth, aggressiveness and enzymatic activity of fungal isolates associated to root rot, where 71 fungi were isolated, classified as belonging to six different genera (*Gongronella* sp., *Myrothecium* sp., *Colletotrichum* sp., *Dipodascus* sp., *Fusarium* sp. and *Lasiodiplodia* sp.) composing a small part of the soil microbiota of a cassava cultivation area. These isolates differed in their growth and were grouped into four classes of mycelial growth velocity (high, moderate, low and extremely low), being the fungi of *Lasiodiplodia* sp. those with higher growth velocity. In relation to severity, the isolated *Lasiodiplodia* sp. were also the most aggressive, causing greater areas of damage to cassava roots. Regarding the extracellular enzymatic activity, the isolates associated to dry rot produced the seven extracellular enzymes evaluated (pectinase, pectin lyase, amylase, protease, urease, cellulase and laccase), while the isolates associated to black rot did not produce amylase and urease. 2) The study of genetic resistance to root rot in field conditions, where 148 cassava genotypes belonging to the Cassava Breeding Program of Embrapa Cassava and Fruticulture, were planted in an area with high incidence of rot. Based on the values of phenotypic analysis of resistance (survival and disease index) and agronomic traits of interest (plant height, above-ground yield and fresh root yield) these genotypes were grouped into five clusters, and classified as "Extremely Susceptible", "Susceptible", "Moderately Resistant" and "Resistant". The 10 best performing genotypes in the field (TOP-10) were selected as parental potentials for the development of segregation progeny. A genome-wide association study analysis was also performed. It was detected five significant SNPs for root productivity in rotten-infested soil, whose gene annotation indicates functions related to defense mechanisms against biotic and abiotic stresses. 3) Transcriptoma analysis, using the RNASeq technique; Two contrasting cassava genotypes with regard the response to root rot infection, were challenged by a mix of black rot and dry rot pathogens where 18 candidate genes that play important roles in resistance against the disease were identified and can be used in molecular marker-assisted selection for identification and development of resistant genotypes. Our results represent important advances related to the understanding of epidemiology and disease dynamics in the field, correlated with knowledge about the defense mechanisms involved in root rot resistance.

Keywords: *Manihot esculenta* Crantz; soil-dwelling pathogens. GWAS. RNA-Seq.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
REFERÊNCIAS	16
CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> , AGRESSIVIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ISOLADOS FÚNGICOS ASSOCIADOS ÀS PODRIDÕES SECA E NEGRA DA MANDIOCA	19
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1. Obtenção dos isolados	25
2.2. Identificação molecular	25
2.3. Amplificação e sequenciamento	26
2.4. Crescimento micelial dos isolados	27
2.5. Teste de patogenicidade e agressividade	27
2.6. Atividade enzimática extracelular	28
3. RESULTADOS	29
3.1. Isolamento e identificação	29
3.2. Crescimento micelial dos isolados	33
3.3. Teste de patogenicidade e agressividade	34
3.4. Atividade enzimática extracelular	37
4. DISCUSSÃO	40
4.1. Variabilidade patogênica associada à podridão radicular da mandioca	40
4.2. Agressividade e produção enzimática dos patógenos associados às podridões radiculares da mandioca	42
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
6. REFERÊNCIAS	48
RESISTÊNCIA GENÉTICA À PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA E MAPEAMENTO ASSOCIATIVO PARA ATRIBUTOS PRODUTIVOS	56
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAIS E MÉTODOS	61
2.1. Painel de fenotipagem e genotipagem	62
2.2. Fenotipagem para resistência à podridão radicular e performance agrônômica em solos infestados com os patógenos	62
2.3. Análise dos dados agrônômicos e de resistência à podridão radicular	63
2.4. Mapeamento associativo	64
3. RESULTADOS	65
3.1. Correlação entre parâmetros agrônômicos e de resistência à podridão radicular	65
3.2. Agrupamento dos dados agrônômicos e de resistência à podridão radicular	67
3.3. Classificação dos genótipos quanto à resistência à podridão radicular	69
3.4. Mapeamento associativo	77

4. DISCUSSÃO.....	81
4.1. Resistência à podridão radicular e parâmetros produtivos.....	81
4.2. Combinações híbridas potenciais para incorporação de resistência à podridão em variedades com alto valor genético	83
4.3. Mapeamento de características associadas à resistência à podridão radicular.....	84
5. CONCLUSÃO.....	88
6. REFERÊNCIAS	89
7. ANEXOS.....	97
ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRIPTOMA DE RAÍZES DE MANDIOCA INFECTADAS REVELAM GENES CANDIDATOS À RESISTÊNCIA À PODRIDÃO RADICULAR.....	
1. INTRODUÇÃO.....	105
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	107
2.1. Material vegetal.....	107
2.2. Preparo do inóculo, inoculação e coleta de amostras.....	107
2.3. Extração de RNA total	108
2.4. Construção das bibliotecas e sequenciamento do RNA	109
2.5. Análise da expressão gênica diferencial entre os tratamentos	110
2.6. Avaliação funcional dos genes diferencialmente expressos	111
2.7. Genes candidatos.....	112
3. RESULTADOS	112
3.1. Incidência da doença	112
3.2. Análise do perfil transcriptômico via RNAseq	116
3.3. Expressão gênica diferencial.....	119
3.4. Genes diferencialmente expressos	120
3.5. Avaliação funcional dos genes diferencialmente expressos	123
3.6. Genes candidatos.....	130
4. DISCUSSÃO.....	135
4.1. Análise temporal do perfil transcriptômico.....	135
4.2. Seleção de genes candidatos	138
5. CONCLUSÃO.....	142
6. REFERÊNCIAS	143
CONSIDERAÇÕES FINAIS	155

INTRODUÇÃO GERAL

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), pertence à classe Magnoliopsida, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae e ao gênero *Manihot*, para o qual foram identificadas 98 espécies (ORLANDIN; LIMA, 2014). Acredita-se que suas origens estão na América Latina, onde foi descoberta pela população indígena há mais de 4000 anos (AKINPELU et al., 2011). Após seu descobrimento pelos comerciantes europeus que vieram para a América, a mandioca foi levada para o continente africano e subsequentemente para o asiático, para fins de segurança alimentar e extração de amido (ALLEM, 2002; AKINPELU et al., 2011). Atualmente, está distribuída em países da América Latina e Central, África, Ásia e Oceania (Figura 1).

A mandioca é uma planta que produz razoavelmente bem em condições marginais de clima e solo, e é frequentemente identificada como uma reserva de alimento devido à sua tolerância à seca e solos inférteis (FAO, 2013). Por ser uma importante fonte de carboidratos, é a terceira cultura alimentar mais importante nos trópicos, depois do arroz e do milho, tendo com isso grande relevância socioeconômica (CIAT, 2018).

Cassava production, 2018
Cassava production is measured in tonnes.

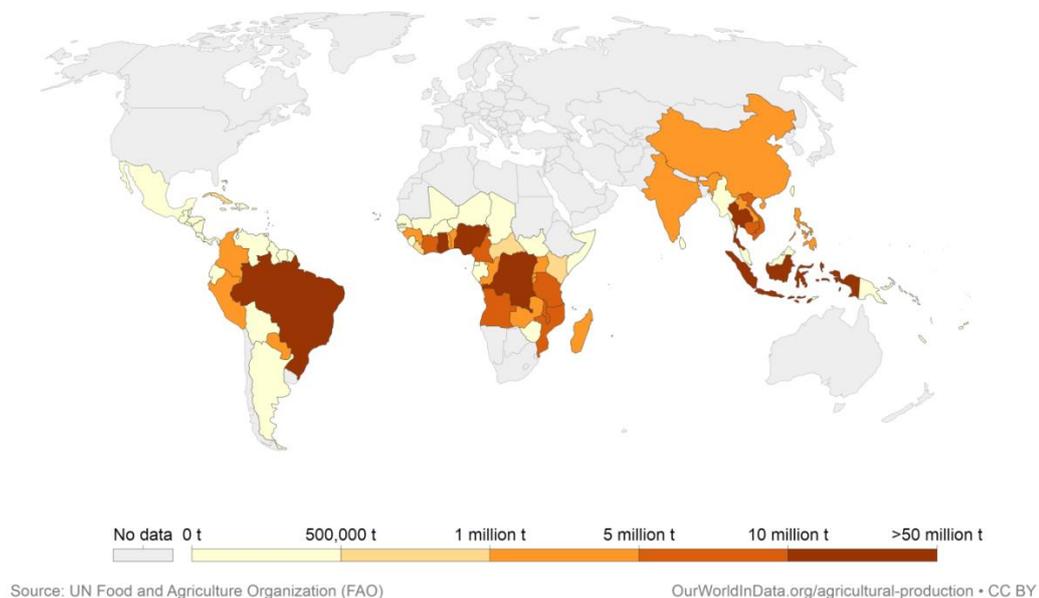


Figura 1. Mapa mundial com destaque para os principais países produtores de mandioca. Diferentes cores indicam produção total no ano de 2018 em toneladas conforme legenda (Fonte: Fundação das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO, 2020).

A mandioca é uma das poucas culturas em que se aproveita toda a planta, embora suas

propriedades nutricionais dependam de qual parte será consumida. A parte aérea (folhas e hastes) fornece proteínas, vitaminas e minerais (TEWE; LUTALADIO, 2004) e é utilizada na alimentação humana e animal como feno, silagem ou até mesmo frescas. As folhas, após desidratação, são utilizadas na alimentação humana (principalmente na região nordeste do Brasil). As hastes também são utilizadas como material de propagação (manivas sementes) em novos plantios (NEVES et al., 2018). Entretanto, o principal produto da mandioca é a raiz, fonte primária de energia. Além de ser utilizada na alimentação humana de forma in natura, a raiz de mandioca, rica em amido, de mandioca tem sido utilizada como fonte de matéria prima para diferentes produtos industriais tais como etanol, embalagens, mineração, têxtil, farmacêutica e alimentos embutidos (FAO, 2013).

Devido as suas características agrônômicas favoráveis, tolerância a estresses abióticos e fácil adaptação a ambientes adversos, a mandioca é cultivada em todos os estados brasileiros, situando-se entre os dez primeiros produtos agrícolas do País em termos de área cultivada, e o sexto em valor de produção (IBGE, 2019). A cultura da mandioca é extremamente importante para os estados das regiões Norte e Nordeste do Brasil, sendo estratégica na mitigação da pobreza e diminuição do êxodo rural, já que é produzida nestas regiões principalmente por agricultores familiares e em pequenas propriedades, geralmente de baixa renda. Além do impacto social, mandioca tem atraído o interesse dos negócios agrícolas, principalmente no Sul do país, devido os múltiplos usos do amido para fins industriais.

O Brasil, com uma produção de 17,64 milhões de toneladas de raízes, em uma área de cerca de 1,20 milhão de hectares, é o quinto produtor mundial de mandioca, sendo superado apenas pela Nigéria, Tailândia, República Democrática do Congo e Gana. A produção brasileira corresponde a 6,4 % da mandioca produzida e a 5% da área cultivada no mundo (FAOSTAT, 2020). Atualmente, a demanda pela mandioca vem aumentando em função da crescente aplicação na indústria, seja para a extração do amido para as indústrias farmacêuticas, têxtil ou de papel e papelão ou em processos que agreguem valor à cultura.

Apesar do destaque na produção mundial, a expansão da mandiocultura é dificultada pela baixa produtividade de raízes em comparação com o potencial da cultura, em decorrência do uso de variedades não melhoradas, e a ocorrência de estresses de origem abiótica, como a deterioração fisiológica pós-colheita e estresse hídrico (VENTURINI et al., 2015) e de origem biótica, como doenças associadas a fungos, bactérias e vírus (MCCALLUM et al., 2017).

Várias doenças podem afetar a produtividade da mandioca em todos os países produtores, dentre elas estão doenças causadas por vírus, como os complexos do mosaico africano (*Cassava Mosaic Disease - CMD*) e da estria marrom da mandioca (*Cassava Brown*

Streak Disease - CBD); o vírus do mosaico das nervuras (*Cassava vein mosaic virus - CsVMV*), mosaico comum (*Cassava common mosaic virus - CsCMV*) e o complexo couro de sapo (*Cassava frogskin disease - CFSD*); causadas por bactéria, como a bacteriose (*Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis*), e por fungos, como a antracnose (*Colletotrichum* spp.) e podridão radicular, sendo esta última causada por uma ampla diversidade de espécies de patógenos.

A podridão radicular da mandioca tem sido relatada no Brasil desde 1945 (CAMPOS; PICKEL, 1945). É uma doença de alto impacto econômico e social nos principais países produtores, pois provoca queda progressiva na produtividade da mandioca, com relatos de perdas de até 100% na produtividade de raízes, além de inutilizar as áreas para plantio ao longo dos ciclos da cultura (NOTARO, 2013).

Está relacionada a diferentes espécies de fitopatógenos habitantes do solo e a sintomatologia difere a depender da espécie como: (i) podridão-mole: causada por oomicetos dos gêneros *Phytophthora*, *Pythium* e *Phytopythium*; (ii) a podridão-seca: causada por fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* e além da espécie *Macrophomina pseudophaseolina*; (iii) e podridão-negra: associada a espécies da família *Botryosphaeraeaceae* (MACHADO et al., 2014; VILAS-BOAS et al., 2017; BOARI et al., 2018, BRITO et al., 2019, BRITO et al., 2020). Estes fitopatógenos constituem um problema de difícil controle, uma vez que podem produzir estruturas de resistência que permitem a sobrevivência no solo por vários anos na ausência de hospedeiros (MIHAJLOVIĆ et al., 2017).

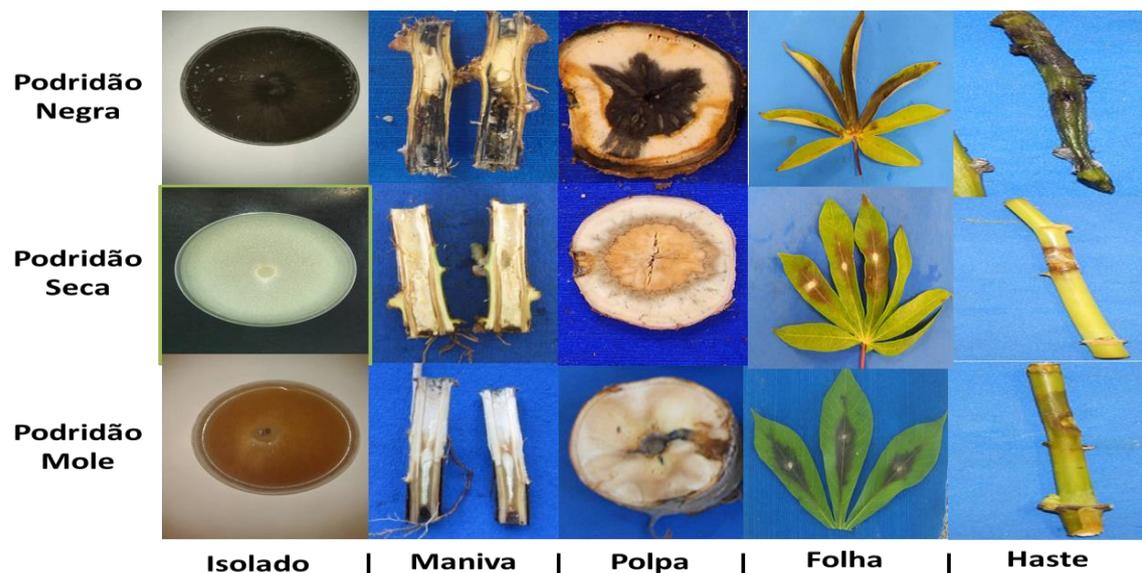


Figura 2. Sintomas incitados pela podridão negra, podridão seca e podridão mole em diferentes tecidos da mandioca. Fonte: Camila Hohenfeld.

São indicadas como medidas de controle a rotação de culturas, manejo físico do solo, o uso de microrganismos antagônicos, supressividade do solo com uso de matéria orgânica, plantio em áreas bem drenadas, utilização de manivas provenientes de áreas sem ocorrência da doença e destruição do material vegetal originário de áreas infestadas (BARROS et al., 2014; HUANG et al., 2015; SILVA et al., 2017; MIHAJLOVIĆ et al., 2017; FREITAS et al., 2019). Porém, a abordagem mais econômica e confiável para manejar as podridões radiculares da mandioca se baseia no plantio de variedades resistentes, uma vez que os custos associados à sua utilização são mais baixos que os defensivos químicos, e por garantir a sustentabilidade ao sistema de produção da cultura (ONYEKA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013; AWOYEMI et al., 2016; VILAS BOAS et al., 2016).

O principal foco da pesquisa relacionado ao melhoramento genético da mandioca nas últimas três décadas foi a busca por variedades resistentes às diversas pragas e doenças (HAHN et al., 1989; CEBALLOS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2013; CARMO et al., 2015; VILAS-BOAS et al., 2016, MCCALLUM et al., 2017). Apesar do alto custo de coleta e as dificuldades de manutenção, a avaliação rigorosa e contínua do germoplasma de mandioca quanto à resistência a doenças é um dos requisitos básicos para a implementação efetiva e sustentada de um programa integrado de manejo de enfermidades (FOKUNANG et al., 2000).

Atualmente, o germoplasma de mandioca encontra-se mantido em coleções de trabalho e bancos ativos, distribuídos a nível nacional e internacional, em diferentes instituições. Em nível internacional, a coleção do gênero *Manihot* do Programa de Recursos Genéticos (PRG) do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), na Colômbia, é considerada a mais importante em todo o mundo pelo número de materiais armazenados (cerca de 6.500 acessos), coletados em diversas áreas geográficas. Seguido do Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA), com cerca de 3.700 acessos.

No Brasil, destaca-se o banco de germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, detentora de sete Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) de mandioca, com a finalidade de contribuir para o conhecimento e a preservação da cultura, com atividades de resgate, caracterização e banco de dados de recursos genéticos. A Embrapa Mandioca e Fruticultura, situada em Cruz das Almas/BA, possui o maior banco ativo de germoplasma de mandioca do Brasil, com mais de 1.500 acessos em campo e 300 in vitro, além de uma coleção de espécies silvestres de *Manihot* com 600 acessos (EMBRAPA/ALELO, 2020).

Para que os programas de melhoramento obtenham sucesso é fundamental ter variabilidade genética e fontes de resistência disponíveis, conhecer a complexidade da herança

da resistência, além de dispor de um processo eficiente de melhoramento onde ensaios para a resistência a doenças estejam integrados com outros caracteres agronômicos importantes (BROWN, 2015).

A necessidade de desenvolvimento de variedades de mandioca com resistência forte e durável a múltiplos patógenos é cada vez mais importante para a segurança alimentar e desenvolvimento econômico (BRITO et al., 2017). Entretanto, qualquer nova resistência a doenças precisa ser selecionada dentro de um contexto genético que atenda aos requisitos atuais de rendimento e características agronômicas de interesse (SUMMERS; BROWN, 2013).

As variedades 'BRS Kiriris' e 'BRS Aramaris' (sin= Cigana Preta), foram selecionadas no Nordeste brasileiro, como fontes de resistência à podridão de raízes, por meio da seleção em áreas propensas à ocorrência da podridão radicular na região dos tabuleiros costeiros no nordeste do país (FUKUDA et al., 2002), porém não se sabe ao certo se são variedades resistentes a todos os grupos de patógenos ou a grupos específico, considerando comportamentos variados em locais diferentes daqueles onde estas variedades foram selecionadas.

Desse modo, a estratégia mais acertada para desenvolvimento de variedades resistentes passa pelo *screening* de germoplasma quanto à reação aos diferentes patógenos em condições controladas. Atualmente, o *screening* de germoplasma na busca por fontes de resistência à podridão radicular tem sido por meio da metodologia *in vitro* de raízes destacadas (OLIVEIRA et al., 2013; VILAS-BOAS et al., 2017). Entretanto, por ser uma resistência poligênica, há diferenças no mecanismo de resistência nos tecidos da raiz de mandioca (BRITO et al., 2017), o que dificulta a seleção com base apenas nessa metodologia.

Por outro lado, o uso de ferramentas biotecnológicas para estudo da interação planta-patógeno (mandioca x podridão radicular) tem sido pouco explorada na cultura da mandioca. Os poucos estudos desenvolvidos até o momento focaram na seleção genômica ampla - GWAS (BRITO et al., 2017) e análises semi-quantitativas por RT-PCR (LIMA et al., 2018), os quais identificaram possíveis genes envolvidos nos mecanismos de defesa à podridão radicular, utilizando a metodologia *in vitro* de inoculação em raiz destacada. Entretanto, para o entendimento dos mecanismos de defesa da mandioca à podridão radicular, é necessária uma avaliação mais próxima da dinâmica em campo, que permita compreender os aspectos genéticos da resistência à doença e corrobore com os estudos epidemiológicos. Bem como, o emprego de técnicas, a exemplo da RNAseq, que possibilitem o entendimento da variação no nível de expressão dos transcritos dos genótipos considerados resistentes em relação aos genótipos suscetíveis.

O entendimento dos mecanismos genéticos responsáveis pelos diferentes níveis de resistência apresentados pelos genótipos de mandioca é de extrema importância para auxiliar na caracterização da doença, na busca de estratégias de controle e seleção de acessos promissores para o programa de melhoramento genético da mandioca. Diante dessa realidade, o objetivo geral da tese foi identificar os mecanismos de resistência relacionados à podridão radicular da mandioca por meio da avaliação da atividade enzimática de patógenos e caracterização molecular do processo de infecção, visando sugerir um modelo de resistência à podridão radicular em mandioca. Para isso, a tese foi dividida em três capítulos independentes:

Capítulo 1 – CRESCIMENTO *IN VITRO*, AGRESSIVIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ISOLADOS FÚNGICOS ASSOCIADOS ÀS PODRIDÕES SECA E NEGRA DA MANDIOCA

Objetivo: verificar a hipótese de ocorrência simultânea de mais de uma espécie de patógenos causadores de podridões radiculares em uma área naturalmente infestada e utilizada em sucessivos ciclos de cultivo de mandioca, bem como identificar e avaliar o comportamento dos diferentes isolados quanto a sua taxa de crescimento, a agressividade e a produção de enzimas extracelulares que possam estar envolvidas na patogênese.

Capítulo 2 – RESISTÊNCIA GENÉTICA À PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA E MAPEAMENTO ASSOCIATIVO PARA ATRIBUTOS PRODUTIVOS

Objetivo: avaliar genótipos de mandioca, incluindo genótipos de germoplasma, variedades locais (landraces) e híbridos melhorados quanto à resistência à podridão radicular em condições de campo com histórico da doença e com alto potencial de inóculo, em dois anos de avaliação (2014-2015 e 2016-2017) e identificar possíveis regiões genômicas associadas à resistência em campo.

Capítulo 3 - ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRIPTOMA DE RAÍZES DE MANDIOCA INFECTADAS REVELAM GENES CANDIDATOS À RESISTÊNCIA À PODRIDÃO RADICULAR

Objetivo: analisar o transcriptoma de dois genótipos de mandioca em resposta à infecção por fungos de solo causadores de podridão radicular, compreender a resposta transcriptômica do genótipo resistente em dois momentos de interação e identificar genes candidatos que desempenham importantes papéis na resistência contra a doença.

REFERÊNCIAS

- AKINPELU, A.O.; AMAMGBO, L.E.F.; OLOJEDE, A.O.; OYEKALE, A.S. Health implications of cassava production and consumption. **Journal of Agriculture and Social Research**, v.11, p.118-125, 2011.
- ALLEM, A C. The origin and taxonomy of cassava. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. **Cassava: biology, production and utilization**, p. 1-16, 2002.
- AWOYEMI. S.O; AFOLABIA. C.G; POPOOLAA. A.K; ODEDINAB. J.N; ADIGBO. S.O. Performances of improved cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars against root rot disease and yield in cassava-maize intercropping systems under natural infection. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**. v.9. p.386–401. 2016.
- BARROS, J.A.; MEDEIROS, E.V.; NOTARO, K.A.; MORAES, W.S.; SILVA, T.C.E.S.; MOREIRA, K.A. Different cover promote sandy soil suppressiveness to root rot disease of cassava caused by *Fusarium solani*. **African Journal of Microbiology Research**, v.8, p. 967–973, 2014.
- BOARI, A.J.; CUNHA. E.M.; QUADROS. A.F.F.; BARRETO R.W.; FERNANDES. A.F. First report of *Phytophthium* sp. causing storage root rot and foliage blight of cassava in Brazil. **Plant Disease**. 2018.
- BRITO, A.C.; OLIVEIRA, S.A.S.; OLIVEIRA, E.J. Genome-wide association study for resistance to cassava root rot. **The Journal of Agricultural Science**, v.155, p. 1424-1441, 2017.
- BRITO, A.C.Q.; DE MELLO, J.F.; CÂMARA, M.P.S.; VIEIRA, J. C. B.; MICHEREFF, S. J.; SOUZA-MOTTA, C.M.; MACHADO, A.R. Diversity and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with black root rot and stem cutting dry rot in *Manihot esculenta* in Brazil. **The European Journal of Plant Pathology**, v. 157, p.583–598, 2020.
- BRITO, A.C.Q.; DE MELLO, J.F.; MICHEREFF, S.J.; DE SOUZA-MOTTA, C.M.; MACHADO, A.R. First report of *Macrophomina pseudophaseolina* causing stem dry rot in cassava in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, p. 1245-1245, 2019.
- BROWN. J. K. M. Durable resistance of crops to disease: a darwinian perspective. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 513-539, 2015.
- CAMPOS, A.R; PICKEL, D.B.J. Observações sobre as doenças e agentes patogênicos das plantas em Pernambuco. **Revista de Agricultura**, v.20, p.19-38, 1945.
- CARMO, C.D.; SILVA, M.S.; OLIVEIRA, G.A.F.; OLIVEIRA, E.J. Molecular assisted selection for resistance to cassava mosaic disease in *Manihot esculenta* Crantz. **Scientia Agricola**, v.72, p.520-527, 2015.
- CEBALLOS, H.N.; IGLESIAS, C.A.; PEREZ, J.C.; Dixon, A.G.O. Cassava breeding: opportunities and challenges. **Plant Molecular Biology**, v.56, p.503–516, 2004.
- CIAT. 2018. Disponível em: <https://ciat.cgiar.org/what-we-do/breeding-better-crops/rooting-for-cassava/>

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Portal Alelo Recursos Genéticos. Disponível em: <<http://alelobag.cenargen.embrapa.br/AleloConsultas/Passaporte/detalhesBanco.do?idb=60>> Acesso em: Dez. 2020.

FOKUNANG, C. N.; AKEM, C. N.; DIXON, A. G. O.; IKOTUN, T. Evaluation of a cassava germplasm collection for reaction to three major diseases and the effect on yield. *Genetic Resources and Crop Evolution*. v.47, p. 63–71, 2000.

FOUNDATION AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). Database Gateway. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/>>. Acesso em: Abril. 2020.

FOUNDATION AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). Save and Grow: Cassava. A guide to sustainable production intensification. Roma; 87-97, 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/index_en.html>.

FREITAS, M.A; MEDEIROS, F.H.V; MELO, I.S; PEREIRA, P.F.; PEÑAFLO, M.F.G.V.; BENTO, J.M.S.; PARÉ, P.W. Stem inoculation with bacterial strains *Bacillus amyloliquefaciens* (GB03) and *Microbacterium imperiale* (MAIIF2a) mitigates *Fusarium* root rot in cassava. *Phytoparasitica*, v.47, p.135–142, 2019.

FUKUDA, W.M.G.; SILVA, S. de O.; IGLESIAS, C. Cassava breeding. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.2, p. 617-638, 2002.

HAHN, S.K.; ISOBA, J.C.G.; IKOTUN, T. Resistance breeding in root and tuber crops at International Institute of Tropical Agriculture (IITA). *Crop Protection*, v.8, p.147–168, 1989.

HUANG, X.; WEN T.; ZHANG, J.; MENG, L.; ZHU, T.; CAI, Z. Toxic organic acids produced in biological soil disinfestation mainly caused the suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *BioControl*, v.60, p.113– 124, 2015.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. 2019. <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil> - IBGE 2019

LIMA, A.M; MOURAD, E.F; ISHIDAD, A.K.N; PEREIRA, A.C.C; REIS, S.P; SOUZA, C.R.B. 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, p.23–30, 2018.

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; OLIVEIRA, S. A. S.; PEREIRA, O. L. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, v. 39. p. 464-470. 2014.

MCCALLUM, E.J.; ANJANAPPA, R.B.; GRUISSEM, W. Tackling agriculturally relevant diseases in the staple crop cassava (*Manihot esculenta*). *Current Opinion in Plant Biology*. v.38, p.50–58, 2017.

MIHAJLOVIC, M.; REKANOVIC, E.; HRUSTIC, J.; GRAHOVAC, M.; TANOVIC, B. Methods for management of soilborne plant pathogens. *Pestic Phytomed*, v.32, p. 9-24, 2017.

- NEVES, R.J.; DINIZ, R.P.; OLIVEIRA, E.J. Productive potential of cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) propagated by leaf buds. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 90, p.1733-1747, 2018.
- NOTARO, K.A.; MEDEIROS, E.V.; SILVA, C. A.D.; BARROS, J. A. Prospecção de fitopatógenos associados à podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. **Bioscience Journal**, v.5, p.1832-1839, 2013.
- OLIVEIRA, S.A.S.; HOHENFELD, C.S.; SANTOS, V.S.; HADDAD, F.; OLIVEIRA, E.J. Resistance to *Fusarium* dry root rot disease in cassava accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1414-1417, 2013.
- ONYEKA, T. J.; DIXON, A. G. O.; EKPO, E. J. A. Assessment of laboratory methods for evaluating cassava genotypes for resistance to root rot disease. **Mycopathologia**, v.159, p.461-467, 2005a.
- ORLANDINI, P.; LIMA, L.R D. Sinopse do gênero *Manihot* Mill.(Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, v.41, p.51-60, 2014.
- SILVA, J.M.; MEDEIROS, E.V.; DUDA, G.P.; BARROS, J.A.; SANTOS, U.J. FAMES and microbial activities involved in the suppression of cassava root rot by organic matter. **Revista Caatinga**, v. 30. p. 708-717. 2017.
- SUMMERS, R.W.; BROWN, J.K.M. Constraints on breeding for disease resistance in commercially competitive wheat cultivars. **Plant Pathology**, v. 62, p. 115–121, 2013.
- TEWE, O.O.; LUTALADIO, N. Cassava for Livestock Feed in Sub-Saharan Africa. Rome, Italy: FAO; 2004.
- VENTURINI, M.T.; SANTOS, V.S.; OLIVEIRA, E.J. Procedures for evaluating the tolerance of cassava genotypes to postharvest physiological deterioration. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.50. p. 562-570, 2015.
- VILAS BOAS, S.A.; HOHENFELD, C.S.; OLIVEIRA, S.A.S.; SANTOS, V.S.; OLIVEIRA, E.J. Sources of resistance to cassava root rot caused by *Fusarium* spp.: a genotypic approach. **Euphytica**, v.09, p. 237–251, 2016.
- VILAS BOAS, S.A.; OLIVEIRA, S.A.S.; BRAGANÇA, C.A.D.; RAMOS, J.B.; OLIVEIRA, E.J. Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. **Scientia Agricola**. v.74, p. 60–67, 2017.

CAPÍTULO 1

CRESCIMENTO *IN VITRO*, AGRESSIVIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ISOLADOS FÚNGICOS ASSOCIADOS ÀS PODRIDÕES SECA E NEGRA DA MANDIOCA

CRESCIMENTO *IN VITRO*, AGRESSIVIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ISOLADOS FÚNGICOS ASSOCIADOS ÀS PODRIDÕES SECA E NEGRA DA MANDIOCA

Autora: Camila Santiago Hohenfeld

Orientadores: Dra. Adriana Rodrigues Passos

Dr. Eder Jorge de Oliveira

Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

Resumo: As podridões radiculares representam um dos principais problemas para a cultura da mandioca, sendo incitadas por um complexo de espécies de fungos e oomicetos que podem diferir quanto à sua agressividade, o seu crescimento micelial e na capacidade de colonização dos tecidos da planta. Existem relatos da presença de duas ou mais espécies associadas à podridão radicular em uma mesma área, o que leva a dificuldades significativas no manejo dessas doenças. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de diferentes isolados de microrganismos habitantes de solo e possivelmente associados à podridões radiculares em mandioca, provenientes de uma área naturalmente infestada e que vem sendo utilizada para seleção de genótipos resistentes, quanto a sua taxa de crescimento, a agressividade e a produção de enzimas extracelulares que possam estar envolvidas na patogênese. Foram isolados 71 fungos, classificados como pertencentes a seis gêneros diferentes (*Gongronella* sp., *Myrothecium* sp., *Colletotrichum* sp., *Dipodascus* sp., *Fusarium* sp. e *Lasiodiplodia* sp.) compondo uma pequena parte da microbiota do solo de uma área de cultivo de mandioca em Umbaúba/SE. Com base nas taxas de crescimento os isolados foram agrupados em quatro classes de velocidade do crescimento micelial (alta, moderada, baixa e extremamente baixa). Quanto à patogenicidade e agressividade, apenas isolados pertencentes ao gênero *Fusarium* (associado à podridão seca) e *Lasiodiplodia* (associado à podridão negra) foram patogênicos, entretanto os de podridão negra foram os mais agressivos, provocando maiores lesões nas raízes de mandioca. Os isolados associados à podridão seca produziram as sete enzimas extracelulares avaliadas (pectinase, pectina liase, amilase, protease, urease, celulase e lacase), enquanto os isolados associados à podridão negra não produziram amilase e urease. Entre as enzimas analisadas, a pectinase foi relacionada com maior grau de severidade da doença nos tecidos da raiz tuberosa da mandioca.

Palavras-chave: *Fusarium* sp.; *Lasiodiplodia* sp.; *Manihot esculenta* Crantz; patógenos habitantes de solo.

GROWTH IN VITRO, AGGRESSIVENESS AND ENZYMATIC ACTIVITY OF FUNGAL ISOLATES ASSOCIATED WITH DRY AND BLACK CASSAVA ROOT ROT

Author: Camila Santiago Hohenfeld

Advisors: Dra. Adriana Rodrigues Passos

Dr. Eder Jorge de Oliveira

Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

Abstract: Root rot represents one of the main problems for the cultivation of cassava, being caused by a complex of species of fungi and oomycetes that can differ in their aggressiveness, mycelial growth and in the ability to colonize plant tissues. There are reports of the presence of two or more species associated with root rot in the same area, which leads to significant difficulties in the management of these diseases. Thus, the objective of this work was to evaluate the behavior of different soil-borne microorganism with putative involvement on the cause cassava root rot disease, coming from an area naturally infested and that has been used for selection of resistant genotypes, in terms of their growth rate, aggressiveness and production extracellular enzymes that may be involved in the pathogenesis. The 71 fungi isolates were classified into six different genera (*Gongronella* sp., *Myrothecium* sp., *Colletotrichum* sp., *Dipodascus* sp., *Fusarium* sp. and *Lasiodiplodia* sp.) composing a fraction of the soil microbiota of a cassava cultivation area in Umbaúba/SE. Based on the growth rates, the isolates were grouped into four classes of mycelial growth rate (high, moderate, low and extremely low). Regarding the pathogenicity and aggressiveness, only isolates belonging to the genus *Fusarium* (associated with dry rot) and *Lasiodiplodia* (associated with black rot) were pathogenic, however those associated with black rot were the most aggressive, causing greater lesions in the cassava roots. Isolates associated with dry rot produced all seven extracellular enzymes evaluated (pectinase, pectin lyase, amylase, protease, urease, cellulase and laccase), while isolates associated with black rot did not produce amylase and urease. Among the analyzed enzymes, pectinase was associated with a greater degree of disease severity in the tissues of the cassava root.

Keywords: *Fusarium* sp.; *Lasiodiplodia* sp.; *Manihot esculenta* Crantz; soil-dwelling pathogens.

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das mais importantes culturas na África, Ásia e América Latina, sobretudo por sua tolerância à seca e por produzir relativamente bem em solos com baixa fertilidade, constituindo-se numa das poucas alternativas para a sustentabilidade de populações que vivem em zonas marginais (FAO, 2013). Além da sua importância na segurança alimentar, a mandioca também tem uma gama de utilizações industriais que lhe conferem um enorme potencial para estimular o desenvolvimento e aumentar os rendimentos rurais (FAO, 2018). De uma perspectiva global, o uso industrial da mandioca vem crescendo como resultado do melhoramento genético (CEBALLOS et al., 2016; WOLFE et al., 2017; MALIK et al., 2020) que aprimoram as características varietais (como alta produção, quantidade e qualidade do amido) e reduz seu custo como fonte de matéria-prima, tornando a cultura uma alternativa atraente em comparação com os cereais (FAO, 2018).

No Brasil, o quinto produtor mundial de mandioca (FAO, 2020), os programas de melhoramento tem buscado aumentar a produtividade e a estabilidade na produção de amido (FREITAS et al., 2016; TORRES et al., 2019; ANDRADE et al., 2019; CARMO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020a), utilizando técnicas de propagação rápida e tratamento de material de plantio (NEVES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020b; NEVES et al., 2020), adaptações às condições climáticas e resposta tolerância à seca (OLIVEIRA et al., 2017a; SANTOS SILVA et al., 2019; MORGANTE et al., 2020), bem como a busca por fontes de resistência à doenças (OLIVEIRA et al., 2013; CARMO et al., 2015; VILAS-BOAS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; FREITAS et al., 2017).

A estabilidade da produtividade da mandioca depende fortemente da adaptação a estresses bióticos e abióticos específicos para o ambiente de cultivo (CEBALLOS et al., 2012). Nos principais países produtores, um dos estresses bióticos mais limitantes da cultura são as podridões radiculares (AFOLABI et al., 2011; AWOYEMI et al., 2016; ZINSOU et al., 2017; VILAS-BOAS et al., 2017). Um complexo de doenças alto impacto econômico, que atinge diretamente as raízes tuberosas, o principal produto comercial da mandioca, além disso, pode infectar sistemicamente as hastes (SENTHIL et al., 2013; SANTIAGO et al., 2018) e por consequência afetar a qualidade fitossanitária do material propagativo.

As podridões radiculares causam significativo decréscimo na produtividade, chegando até 100% de perda (MOSES et al., 2007; AWOYEMI et al., 2016), além de inutilizar as áreas para plantio ao longo dos ciclos da cultura, por estar associada a um complexo de patógenos resilientes no solo (NOTARO, 2013). Estes fitopatógenos constituem um problema de difícil

controle, uma vez que podem produzir estruturas de resistência, como esclerócios, clamidósporos e oósporos, que permitem a sobrevivência no solo por vários anos na ausência de hospedeiros (MIHAJLOVIĆ et al., 2017).

Normalmente classificada como podridão seca, podridão mole ou podridão negra, os sintomas das podridões radiculares da mandioca são bastante distintos em função dos agentes causais. A podridão negra resulta em lesões com coloração preta ou acinzentada, desintegração com aspecto aquoso, e tem sido associada às espécies da família Botryosphaeraeaceae, como *Lasiodiplodia euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. parva*, *L. theobromae*, *L. brasiliense*, *L. caatinguensis*, *L. iraniensis*, *L. laeliocattleyae*, *L. pseudotheobromae* e *Neoscytalidium dimidiatum* (ONYEKA et al., 2005a; MSIKITA et al., 2005; MACHADO et al., 2014, BRITO et al., 2020). A podridão mole, causada por oomicetos dos gêneros *Phytophthora*, *Pythium* e *Phytopythium* (OLIVEIRA et al., 2016; BOARI et al., 2018), tem lesões descritas pelo desenvolvimento de coloração marrom, com aspecto aquoso e forte odor. Por outro lado, a podridão seca, caracterizada por lesões amareladas ou amarronzadas, tem sido atribuída a espécies do gênero *Fusarium* (VILAS-BOAS, et. al., 2017) e a espécie *Macrophomina pseudophaseolina* (BRITO et al., 2019).

Apesar do enorme impacto causado pelas podridões radiculares no cultivo da mandioca, o conhecimento sobre a etiologia das doenças, a identificação acurada dos patógenos e os trabalhos relacionados à epidemiologia são bastante escassos e insuficientes para a realização de estudos mais aprofundados sobre a resistência varietal e estratégias de controle e manejo das podridões de raiz (MCCALLUM et al., 2017). Atualmente, estratégias de manejo integrado tem se baseado na utilização do controle biológico (BARROS et al., 2014), controle cultural (SILVA et al., 2017), e principalmente, do controle genético (OLIVEIRA et al., 2013; AWOYEMI et al., 2016; VILAS BOAS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017b), visto que é a medida mais barata e acessível para o produtor, e que possibilita não só a redução da taxa de progresso da doença, como o aumento da produtividade.

No Brasil, a identificação de fontes de resistência à podridão radicular em mandioca tem sido realizada por meio de inoculações em raízes destacadas (OLIVEIRA et al., 2013; VILAS BOAS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017b), além do uso de ferramentas biotecnológicas, como a seleção genômica ampla - GWAS (BRITO et al., 2017). Entretanto, o *screening* de germoplasma em áreas infestadas (AFOLABI et al., 2011; AWOYEMI et al., 2016) é uma etapa fundamental para os programas de melhoramento genético na busca por fontes de resistência múltipla a podridões radiculares. Porém, o sucesso da avaliação e seleção de genótipos resistentes depende do entendimento da epidemiologia e da dinâmica da doença em campo que

estão correlacionados com o conhecimento sobre a biologia e a ecologia dos agentes causais presentes na área de seleção.

Existem relatos da presença de duas ou mais espécies associadas à podridão radicular em uma mesma área de cultivo da mandioca (MSIKITA et al., 2005; BANDYOPADHYAY et al., 2006; BUA; OKELLO, 2011; AFOLABI et al., 2011; VILAS BOAS et al., 2016; AWOYEMI et al., 2016; ZINSOU et al., 2017, BRITO et al., 2020), e elas podem diferir quanto à sua agressividade, o seu crescimento micelial e, por conseguinte, na capacidade de colonização dos tecidos da planta (ONYEKA et al., 2005a, ZINSOU et al., 2017; HOHENFELD et al., 2018).

A principal barreira física que os patógenos devem superar para uma invasão bem-sucedida da planta hospedeira é a parede celular (GIBSON et al., 2011) e as enzimas extracelulares são particularmente importantes para fungos fitopatogênicos que não possuem estruturas especializadas de penetração, pois os patógenos não apenas degradam a parede celular, permitindo a penetração e a disseminação fúngica através do tecido vegetal, mas também digerem os polímeros vegetais da parede celular para obter uma fonte importante de nutrientes (LAZNIIEWSKA et al., 2012; KUBICEK et al., 2014). A diferença entre a agressividade e os tipos de lesões provocadas nas raízes de mandioca das espécies causadoras de podridões radiculares pode estar associada à capacidade de degradação enzimática de cada espécie, necessária nos processos de penetração, colonização dos tecidos e para o desenvolvimento fúngico (SUNITHA et al., 2013).

De modo geral, os patógenos associados às podridões radiculares de mandioca apresentam uma grande diversidade de espécies que divergem em sua morfologia, fisiologia e patogenicidade (MACHADO et al., 2014; VILAS BOAS et al., 2017, BRITO et al., 2020) e até mesmo quanto às regiões genômicas associadas à resistência (BRITO et al., 2017). A identificação desses patógenos e a caracterização quanto à sua agressividade, bem como a definição das condições favoráveis para o seu crescimento e reprodução, e suas implicações na severidade da doença são etapas importantes para o estabelecimento de estratégias e de metodologias eficazes para seleção de genótipos com ampla resistência (HOHENFELD et al., 2018).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a hipótese de ocorrência simultânea de mais de uma espécie de patógenos causadores de podridões radiculares em uma área naturalmente infestada e utilizada em sucessivos ciclos de cultivo de mandioca, bem como identificar e avaliar o comportamento dos diferentes isolados quanto a sua taxa de crescimento, a agressividade e a produção de enzimas extracelulares que possam estar envolvidas na

patogênese.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.Obtenção dos isolados

Foram coletadas 16 amostras de solo em uma área naturalmente infestada por patógenos causadores de podridões radiculares, utilizadas para a seleção de fontes de resistência com cultivo sucessivo de mandioca a pelo menos 10 anos, na cidade de Umbaúba, Estado de Sergipe (11°22'37.9"S, 37°40'29.6"W), no campo experimental da Embrapa Tabuleiros Costeiros, nos anos de 2016 e 2017.

Para obtenção dos isolados, as amostras de solo foram distribuídas em caixas plásticas transparentes do tipo *gerbox* (100g/caixa), posteriormente foram realizadas iscas com a deposição de fragmentos de raiz de mandioca desinfestada. Após quatro dias, os fragmentos com sintomas típicos de podridão foram cortados em pequenos pedaços (0,5 cm), imersos por 1 minuto em etanol (70%), em seguida, esterilizados por 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio (0,5%), e subsequentemente lavados com água destilada esterilizada, por três vezes. Os fragmentos foram postos para secar sobre papel filtro esterilizado, e logo após colocados em meio batata-dextrose-ágar (BDA), indicado para o crescimento micelial e esporulação de patógenos causadores de podridões seca e negra da mandioca (HOHENFELD et al., 2018), e incubados a 24°C por 7 dias, com fotoperíodo de 12 horas.

A conservação e preservação dos isolados fúngicos foi realizada sob método de Castellani. Todos isolados foram cadastrados na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Em seguida procedeu-se a identificação morfológica dos fungos com base no aspecto visual da colônia (textura, coloração e velocidade de crescimento), e nas características das estruturas microscópicas como tipos de esporo e hifas, com o auxílio do microscópio de luz (Leica Microsystems modelo DM500).

2.2. Identificação molecular

Para a extração do DNA dos patógenos isolados foi utilizado o método CTAB (Brometo de cetiltrimetilamonio), com algumas modificações. Para isso, cinco placas de BDA de cada isolado com crescimento micelial ativo (sete dias) foram raspadas com auxílio de espátulas e os micélios armazenados sobre papel filtro em capela de exaustão por 24 horas. Cada amostra foi macerada com nitrogênio líquido dentro de um tubo eppendorf de 1,5 ml, até a marcação de 100 µL e misturado com 1 mL de tampão de extração (1% CTAB; 20 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA; 0,7 M NaCl) e 10 µL de β-mercaptoetanol. A mistura foi mantida a 65°C durante 60

minutos e homogeneizada a cada 10 minutos em um agitador do tipo vortex, por 2 segundos.

Posteriormente, foram acrescentados 600 μL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, contendo 500 μL de isopropanol e 100 μL de acetato de sódio, e centrifugado a 10.000 rpm por 8 minutos. Finalmente, o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% duas vezes, seco à temperatura ambiente e ressuspensionado a 37°C, em banho maria, por 30 minutos após adicionar 50 μL de TE (Tris-HCL 10 mM + EDTA 1 mM) e 0,15 μL de ribonuclease [RNase] (10mg.mL⁻¹). Após a extração, a solução contendo DNA foi armazenada à temperatura de -20°C. A qualidade e quantidade do DNA total foi mensurada por comparação visual com o DNA do fago λ às concentrações de 30, 50 e 100 ng por meio de corrida em gel de agarose a 1% (80V.60min⁻¹), corado com brometo de etídio (1,2 μL .100mL⁻¹).

2.3. Amplificação e sequenciamento

A amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do rDNA dos isolados foi feita utilizando os iniciadores universais ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (WHITE et al., 1990). Em microtubos plásticos de 200 μL adicionou-se: 1 μL de DNA (20ng/mL); 10 μL de 1X Tris-HCl/KCl pH 8,3 (10 mM/50 mM); 4 μL de MgCl₂ (2 mM); 4 μL de dNTP 2,5mM (0,2 mM); 1 μL de cada iniciador (0,2 μM); 0,25 μL Taq DNA polimerase 1,25 U (Biotech Ludwig, Alvorada, Brazil) e água ultrapura Mili-Q para completar o volume de 50 μL .

As reações de PCR incluíram uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos compostos de desnaturação a 94°C por 35 segundos, 1 minuto de anelamento a 52°C e extensão a 72°C por 1 minuto e uma fase de extensão final de 72°C por 10 minutos. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados no equipamento Carestream Gel Logic 212 Pro (Kodak, Rochester, NY, USA). Os produtos da reação de PCR foram purificados com auxílio de Kits de purificação comercial por coluna (UltraClean® PCR, Clean-Up Kit - Mobio Laboratories, Inc.), e em seguida encaminhados para sequenciamento na empresa *Myleus Biotecnologia* (Belo Horizonte –MG, Brasil) em duas direções (direta e reversa). As sequências consenso geradas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta BLASTn, para confirmação do gênero de cada um dos isolados.

2.4. Crescimento micelial dos isolados

Discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro, contendo estruturas dos patógenos, foram retirados dos bordos de colônias de crescimento ativo e depositados no centro de placas de Petri (90mm) contendo meio BDA, e incubados em estufa B.O.D. com fotoperíodo de 12h de luz e temperatura 25 °C.

A área ocupada pelo crescimento micelial foi estimada com base na mensuração do diâmetro da colônia em dois sentidos opostos (D_1 e D_2), a cada 24 horas, e calculada pela fórmula: $A = \pi \frac{D_1 \times D_2}{4}$, conforme Hohenfeld (2018). As mensurações foram concluídas quando todos os fungos tocaram o bordo das placas. O experimento foi instalado em esquema fatorial inteiramente casualizado (quatro placas \times isolados). Foi calculada a taxa de crescimento micelial ($\text{mm}^2/24\text{h}$) e a área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM).

Os dados foram submetidos ao agrupamento não hierárquico *k-means*, utilizando os pacotes ‘factoextra’ e ‘cluster’, implementados no software R 3.6.3 (R CORE TEAM, 2020).

2.5. Teste de patogenicidade e agressividade

Para os experimentos envolvendo o teste de patogenicidade e a comparação da agressividade dos isolados, raízes de duas variedades de mandioca (‘BRS Aramaris’, considerada como resistente, e ‘BRS Formosa’, considerada como suscetível) foram lavadas em água corrente e desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (0,5%) por 5 minutos. Foi utilizada a metodologia de inoculação em raízes destacadas, conforme Onyeka et al. (2005b) e adaptada por Oliveira et al. (2013). A região central de cada raiz foi perfurada (6 mm de diâmetro) e inoculada com discos de meio de cultura contendo estruturas dos patógenos testados. Discos de meio BDA (sem crescimento fúngico) foram utilizados como controle, com mesmo número de tratamentos. Os ensaios foram conduzidos em câmaras de crescimento com temperatura controlada em 26 ± 2 °C, 12h de luz e umidade relativa $>85\%$. As raízes foram mantidas em papel filtro autoclavado cobertas com sacos de polietileno transparentes para manter a umidade do ambiente.

O delineamento fatorial utilizado foi em blocos ao acaso (71 patógenos isolados \times 2 variedades) com três repetições, com parcelas subdivididas (isolado \times variedade \times 3 raízes). As avaliações foram realizadas dez dias após a inoculação, mensurando-se a área lesionada, por meio de análise digital das imagens com auxílio do Programa *ImageTool* (University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA) (OLIVEIRA et al., 2013).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias da agressividade dos

isolados agrupadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$) e os valores de severidade da casca e da polpa, em cada variedade, comparados pelo teste t de student ($p < 0,05$), utilizando o pacote “*laercio*” implementado no software estatístico R 3.6.3 (R CORE TEAM, 2020).

2.6. Atividade enzimática extracelular

Foram utilizados meios de cultura indicadores para a detecção da atividade enzimática extracelular das seguintes enzimas: pectinases, pectina liases, amilases, proteases, ureases, celulases e lacases, adaptados e descritos por Esteves (2014). Os isolados a serem testados foram crescidos em meio BDA a 25 °C por sete dias. Discos de micélio de 5mm de diâmetro foram retirados de cada uma das placas contendo os isolados de interesse e depositados no centro de placas de Petri contendo um dos meios descritos abaixo.

Meio indicador de amido - A atividade amilolítica foi detectada usando ágar amido (10g de Peptona, 5g de Extrato de levedura, 5g de NaCl, 2g de Amido e 15g de ágar bacteriológico, por litro). O pH foi ajustado para 6,8. Após a incubação (48 h), as placas foram inundadas com solução de Lugol. O Lugol cora o meio com amido não degradado pelo grupo de enzimas, evidenciando a zona de degradação do mesmo. Atividade foi detectada como um halo amarelo em um fundo escuro.

Meio indicador de pectina e pectina liase - As atividades de pectinase e pectina liase foram detectadas com o uso de 0,3g de NaNO₃, 0,1g de KH₂PO₄, 0,5g de MgSO₄, 1g de Extrato de levedura, 5g de Pectina e 15g de ágar bacteriológico, por litro. Para a detecção de pectinases o pH foi ajustado para 5,0 e para detecção de pectina liases, pH 7,0. Após incubação (72 h), as placas foram inundadas com 1% de Brometo de Cetil Trimetilamonio (CTAB) e após uma hora a atividade foi detectada como um halo transparente em torno do micélio.

Meio indicador de protease (caseinase) – Para a detecção da atividade da protease foi utilizado 5g de extrato de malte, 10 g de leite desnatado em pó e 15g de ágar bacteriológico, por litro. O leite foi esterilizado à parte dos restantes reagentes, fazendo-se no final da esterilização a junção de todos os reagentes. As placas foram incubadas por 24 horas a 25 °C e a atividade foi detectada como um halo transparente em torno do micélio.

Meio indicador de celulase - A atividade celulolítica foi detectada utilizando um meio composto por 0,3g de NaNO₃, 0,1g de KH₂PO₄, 0,5g de MgSO₄, 15g de ágar bacteriológico, 5g de carboximetilcelulose (CMC) e mais 1g de extrato de levedura. O pH foi ajustado para 6,0. Após incubação (48 h), as placas foram inundadas com Vermelho Congo (1 mg·mL⁻¹; 15 min) e após cinco minutos foram descoradas com 1 mol.L⁻¹ de NaCl. A atividade foi detectada

como um halo amarelo transparente ao redor o micélio.

Meio indicador de urease - As ureases foram detectadas utilizando um meio contendo 1g de peptona, 1g de D-glucose, 5g de NaCl, 2g de KH_2PO_4 , 15g de ágar bacteriológico e 2% ureia (m / v), e 0,012g de fenol vermelho, por litro. O pH foi ajustado para 6,8. A ureia foi esterilizada separadamente por filtração (0,2 m de poro). Após incubação (72 h), a atividade foi detectada como uma alteração da cor do meio para rosa escuro.

Meio indicador de lacase (oxidase) - Para a detecção da atividade da enzima lacase, foi utilizado 15g de extrato de malte, 20g de ágar bacteriológico e uma solução de 1% de ácido tânico (m / v), por litro. Dessa forma, 10g de ácido tânico foi esterilizado separadamente dos demais reagentes em metade do volume de água destilada utilizada (500 mL). Posteriormente procedeu-se à junção das diferentes partes, devidamente esterilizadas. O pH foi ajustado para 4,5. Após a incubação (48 h), a atividade foi detectada como uma mudança de cor (para marrom) ao redor do micélio.

Todos os meios de cultura foram autoclavados a 120 °C durante 15 minutos e espalhados em Placas de Petri de 60 mm. Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, cuja parcela experimental foi representada por uma placa de Petri com meio de cultura para detecção de uma enzima contendo um isolado.

Os dados foram visualizados por meio de um gráfico *Heatmap*, construído com o auxílio do pacote “*pheatmap*” do software estatístico R 3.6.3 (R CORE TEAM, 2020). A análise de múltiplos fatores (MFA) foi realizada por meio dos pacotes “*FactoMineR*” e “*factoextra*” também implementados no software R.

3. RESULTADOS

3.1. Isolamento e identificação

Foram obtidos um total de 71 isolados provenientes das 16 amostras de solo coletadas em Umbaúba – SE (Tabela 1). Os isolados diferiram entre si quanto às características de morfologia de colônia, esporos e micélio, evidenciando que a presença de mais de uma espécie causadora de podridão radicular nesta área.

Como a qualidade do sequenciamento não gerou sequências com tamanho suficiente para a análise de filogenia, foi realizado o alinhamento *BLAST* na busca por regiões de similaridade das sequências. Com base nessas informações, a identificação dos patógenos presentes na área não foi realizada em nível de espécie, mas apenas em nível de gênero.

Foi constatada a presença de seis gêneros na área de cultivo de mandioca, com uma prevalência relativa em termos de frequência de isolamento igual a 77% de fungos do gênero *Fusarium* sp., 10% de *Dipodascus* sp., 8% de *Lasiodiplodia* sp., e 1% de *Gongronella* sp., *Myrothecium* sp. e *Colletotrichum* sp. (Figura 1).

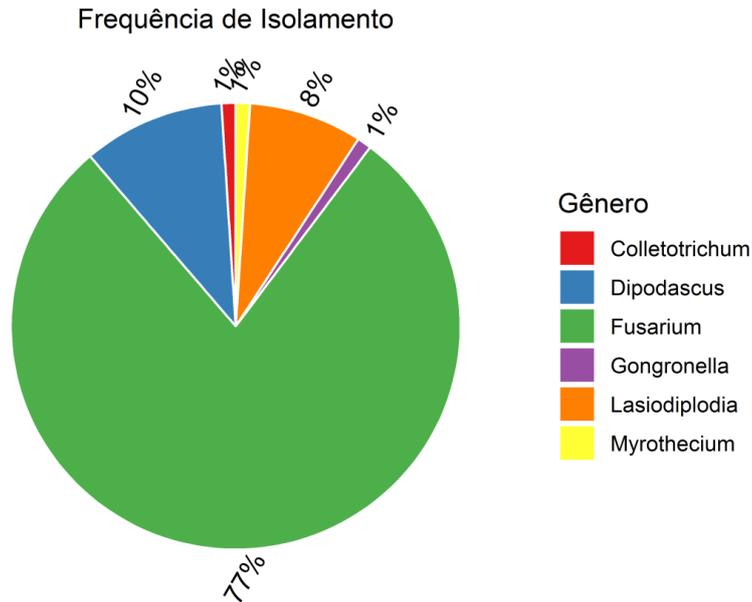


Figura 1. Frequência (%) dos grupos de fungos isolados em solo com histórico de ocorrência de podridão radicular, Umbaúba/SE (Brasil).

Tabela 1. Identificação e caracterização de isolados fúngicos obtidos em uma área infestada por podridão radicular da mandioca, na cidade de Umbaúba-SE. Amostras coletadas em 2016 e 2017.

Coleta	Isolado	Coloração Micelial	Aspecto	BLAST	Q.Cover	P.Ident
2016	01.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium solani</i>	99	98
2016	02.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	97
2016	03.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum / triseptatum</i>	100	98
2016	04.SE	Preto	Cotonoso	<i>Lasiodiplodia theobromae / pseudotheobromae / caatinguensis</i>	100	87
2016	05.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium proliferatum</i>	99	89
2016	06.SE	Branco	Cremoso	<i>Gongronella butleri</i>	100	98
2016	07.SE	Rosa	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	87
2016	09.SE	Marrom	Cotonoso	<i>Fusarium falciforme</i>	99	100
2016	11.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	96
2016	12.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	98
2016	13.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	95
2016	14.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	96
2016	15.SE	Preto	Cotonoso	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100	97
2016	16.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxyporum / coeruleum / fabacearum / callistephi</i>	100	96
2016	18.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum / triseptatum</i>	100	99
2016	20.SE	Branco	Cremoso	<i>Myrothecium roridum</i>	100	96
2016	22.SE	Creme	Cotonoso	<i>Fusarium solani</i>	99	98
2016	23.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	98
2016	24.SE	Rosa	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	93
2016	26.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	96
2016	28.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	99
2016	29.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxyporum / fabacearum / callistephi</i>	99	98
2016	30.SE	Preto	Cotonoso	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	99	98
2016	31.SE	Preto	Cotonoso	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	99	97
2016	32.SE	Rosa	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	95
2016	33.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	98
2016	34.SE	Rosa	Cotonoso	<i>Fusarium oxyporum / fabacearum / callistephi</i>	100	96
2016	35.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium proliferatum</i>	100	99
2016	36.SE	Preto	Cotonoso	<i>Lasiodiplodia theobromae / pseudotheobromae</i>	100	97
2016	37.SE	Preto	Cotonoso	<i>Lasiodiplodia theobromae / caatinguensis / euphorbicola / brasiliense</i>	99	98
2016	38.SE	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	99
2017	A2.5	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	98
2017	A4	Preto	Cotonoso	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	99	83
2017	A4.1	Laranja	Cotonoso	<i>Fusarium solani</i>	99	97
2017	A4.2	Rosa	Cotonoso	<i>Fusarium oxyporum / proliferatum</i>	100	98

Tabela 1. Cont...

Coleta	Isolado	Coloração Micelial	Aspecto	BLAST	Q.Cover	P.Ident
2017	A4.4	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	99
2017	A4.5	Creme	Cotonoso	<i>Fusarium falciforme</i>	100	98
2017	A6	Creme	Cotonoso	<i>Fusarium solani / falciforme</i>	100	100
2017	A6.1	Branco	Cremoso	<i>Galactomyces candidus</i>	100	99
2017	A6.2	Rosa	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	98
2017	A6.3	Creme	Cotonoso	<i>Fusarium solani</i>	99	97
2017	A7.1	Creme	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum / fujikuroi / verticillioides / proliferatum</i>	99	98
2017	A7.3branco	Creme	Cotonoso	<i>Fusarium solani</i>	99	94
2017	A7.3roxo	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum / gossypinum</i>	100	95
2017	A7.4	Branco	Cremoso	<i>Galactomyces candidus</i>	98	99
2017	A7.6	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	98
2017	A7.7	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	98
2017	A7.8	Laranja	Cotonoso	<i>Fusarium solani</i>	100	99
2017	A8.1branco	Branco	Cremoso	<i>Geotrichum candidum</i>	100	99
2017	A8.1preto	Cinza	Cremoso	<i>Geotrichum candidum</i>	100	99
2017	A8.2	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxyporum</i>	99	98
2017	A8.3	Rosa	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum / fujikuroi / verticillioides / proliferatum</i>	100	100
2017	A8.4	Branco	Cremoso	<i>Galactomyces candidus</i>	100	98
2017	A8.5	Rosa	Cotonoso	<i>Fusarium oxyporum</i>	100	100
2017	A8.6	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum / fujikuroi / verticillioides / proliferatum</i>	100	99
2017	A8.7	Branco	Cremoso	<i>Geotrichum candidum</i>	100	100
2017	A8.8	Branco	Cremoso	<i>Galactomyces candidus</i>	100	100
2017	A9	Creme	Cotonoso	<i>Fusarium solani</i>	100	85
2017	A9.1	Creme	Cotonoso	<i>Fusarium solani</i>	100	100
2017	A9.3	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium solani</i>	99	97
2017	A10.1	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	95
2017	A10.2	Rosa	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum / fujikuroi / verticillioides / proliferatum</i>	100	100
2017	A10.3	Creme	Cotonoso	<i>Fusarium solani</i>	100	100
2017	A11.1	Creme	Cotonoso	<i>Fusarium solani</i>	75	82
2017	A11.2	Rosa	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	97
2017	A11.3	Rosa	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	98
2017	A11.4	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum / fujikuroi / verticillioides / proliferatum</i>	100	100
2017	A13	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	98
2017	A13.2	Rosa	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	97
2017	A13.3	Creme	Cotonoso	<i>Fusarium solani</i>	99	99
2017	A13.4	Lilás	Cotonoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	94

3.2. Crescimento micelial dos isolados

De modo geral, os 71 isolados avaliados diferiram entre si quanto à sua taxa de crescimento micelial ($\text{mm}^2/24\text{h}$), e por meio do teste não-hierárquico de *K-means*, foram agrupados em quatro classes de velocidade de crescimento contrastantes (Figura 2). O tempo mínimo para que o crescimento da colônia atingisse os bordos da placa foi de dois dias ($20,30 \text{ mm}^2/24\text{h}$), sendo o máximo aos 13 dias ($3,40 \text{ mm}^2/24\text{h}$).

A classe que apresentou a maior velocidade de crescimento ($20,30 \text{ mm}^2/24\text{h}$) (denominado A) atingiu os bordos da placa em dois dias. A classe “A” foi composta por cinco isolados (7% do total), todos do gênero *Lasiodiplodia* sp., associados à podridão negra. A classe de velocidade moderada (denominada M) foi composta por 61% dos isolados, em que todos atingiram os bordos da placa entre seis a oito dias, com o crescimento de $7,40 \text{ mm}^2/24\text{h}$. Pertencem a esse grupo 36 isolados do gênero *Fusarium* sp., e sete isolados de *Dipodascus* sp. Por outro lado, a classe que apresentou uma velocidade baixa (B) foi composta por 28% dos isolados, que atingiram os bordos da placa entre oito a 10 dias após a incubação, com crescimento de $5,50 \text{ mm}^2/24\text{h}$. Faz parte desse grupo um isolado dos gêneros *Lasiodiplodia* sp., *Colletotrichum* sp. e *Gongronella* sp., além de 17 isolados de *Fusarium* sp. O quarto grupo apresentou uma velocidade de crescimento extremamente baixa (EB), com crescimento de $3,40 \text{ mm}^2/24\text{h}$, atingindo os bordos da placa entre 12 a 13 dias após incubação. Este último grupo foi composto por dois isolados de *Fusarium* sp. e um de *Myrothecium* sp. (4% dos isolados avaliados).

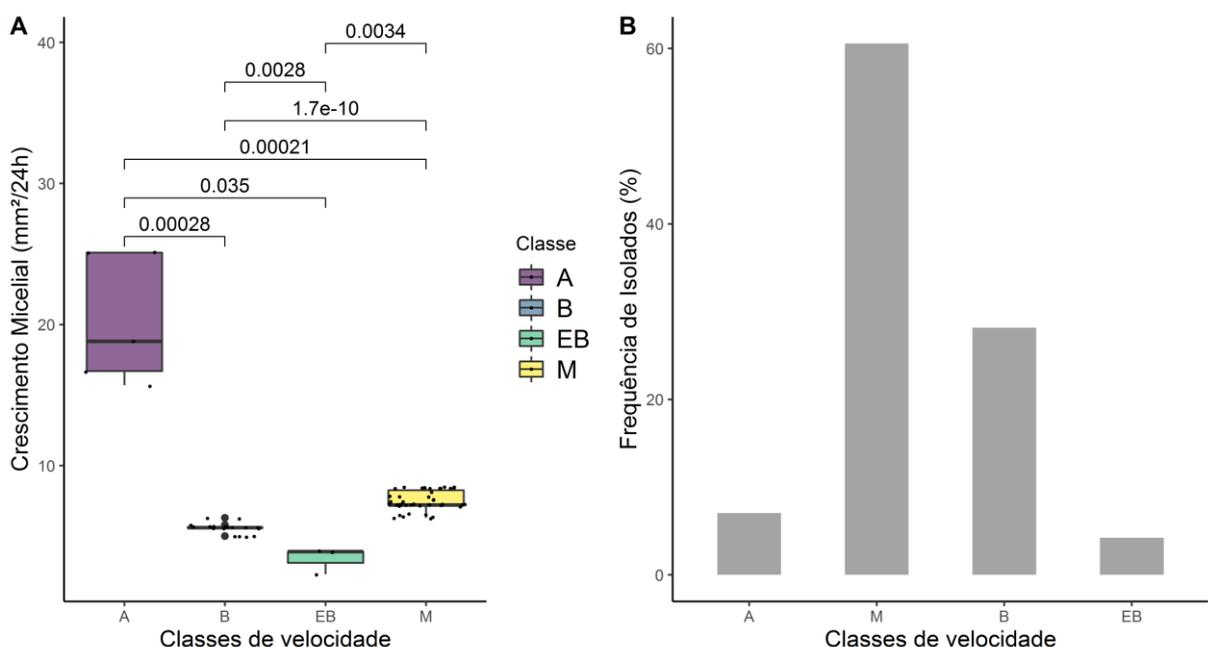


Figura 2. Classes de velocidade do crescimento micelial de isolados de podridão radicular de mandioca, definidos pelo agrupamento de *K-means* (A) e a frequência - % (B) de isolados por classe. A- Alta; M – Moderada; B – Baixa e EB – Extremamente Baixa. Médias comparadas pelo teste *t de student* ($p < 0,05$).

3.3. Teste de patogenicidade e agressividade

A patogenicidade e agressividade dos 71 isolados foram avaliadas por meio da mensuração das áreas lesionadas na casca e polpa das raízes das variedades ‘BRS Formosa’ e ‘BRS Aramaris’, consideradas suscetível e moderadamente resistente, respectivamente, à podridão radicular. Os isolados dos gêneros *Gongronella* sp., *Myrothecium* sp., *Colletotrichum* sp. e *Dipodascus* sp. não causaram sintomas típicos de podridão radicular após 10 dias da inoculação, portanto, foram considerados não - patogênicos. Por outro lado, os isolados de *Fusarium* sp. e *Lasiodiplodia* sp. (61 isolados, no total) causaram lesões típicas nas variedades avaliadas, possibilitando o reisolamento dos mesmos, completando os postulados de Koch (EVANS, 1976).

Lesões de aspecto seco, a partir do ponto de inoculação, normalmente com um alo amarronzado ao redor da lesão, típicos de podridão seca foram observados (Figura 4 A e B). Além disso, houve lesões que se expandiram além do ponto de inoculação e apresentaram uma exsudação e amolecimento do tecido infectado, típico da podridão negra (Figura 3 A e B). No entanto, houve diferença significativa entre a agressividade dos isolados avaliados, bem como entre a severidade da casca das variedades inoculadas. De modo geral, o isolado mais agressivo foi o “A4”, que apresentou uma média de área lesionada de 1.810,03 mm², seguido do isolado “04.SE”(1.552,80 mm²) e “36.SE”(1.369,03 mm²) (Figura 4).

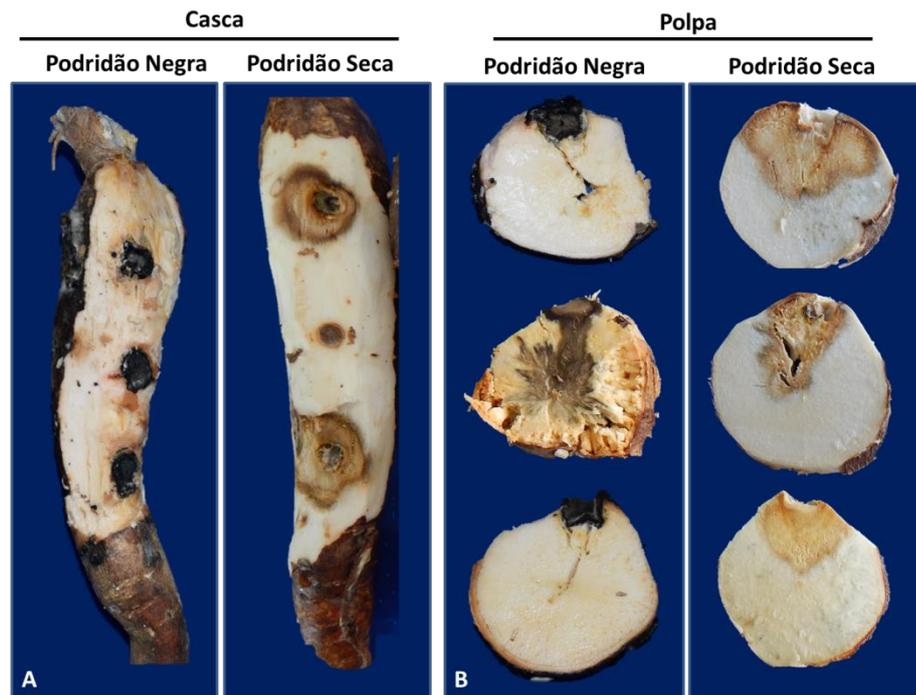


Figura 3. Lesões, na casca (A) e na polpa (B), provocadas por patógenos associados à podridão seca e negra em raízes de mandioca, dez dias após a inoculação.

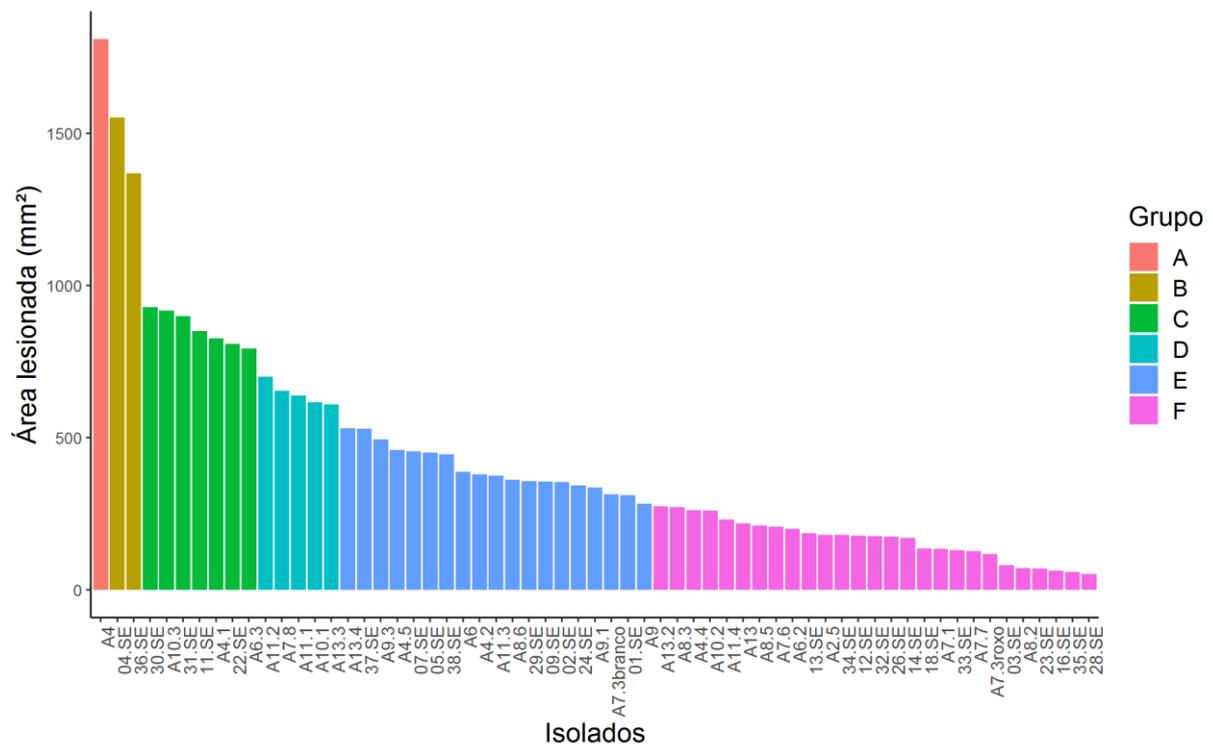


Figura 4. Médias da área lesionada causada por isolados associados às podridões radiculares em raízes de mandioca. Isolados pertencentes ao mesmo grupo não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Por outro lado, ao se analisar a agressividade entre os isolados dentro dos respectivos grupos de podridões (negra e seca), os isolados “A4”, “04.SE” e “36.SE” (Figura 5 –A) não diferiram entre si e apresentaram as maiores lesões dentro do grupo de podridão negra, assim como os isolados “A10.3”, “11.SE”, “A4.1”, “22.SE”, “A6.3” e “A11.2” também não diferiram entre si e apresentaram maiores lesões dentro do grupo de podridão seca (Figura 5 –B). Diferença na agressividade de isolados dentro de um mesmo grupo associado à podridão radicular demonstra variabilidade na agressividade e que deve ser levada em consideração nos testes para identificação de fontes de resistência a esta doença.

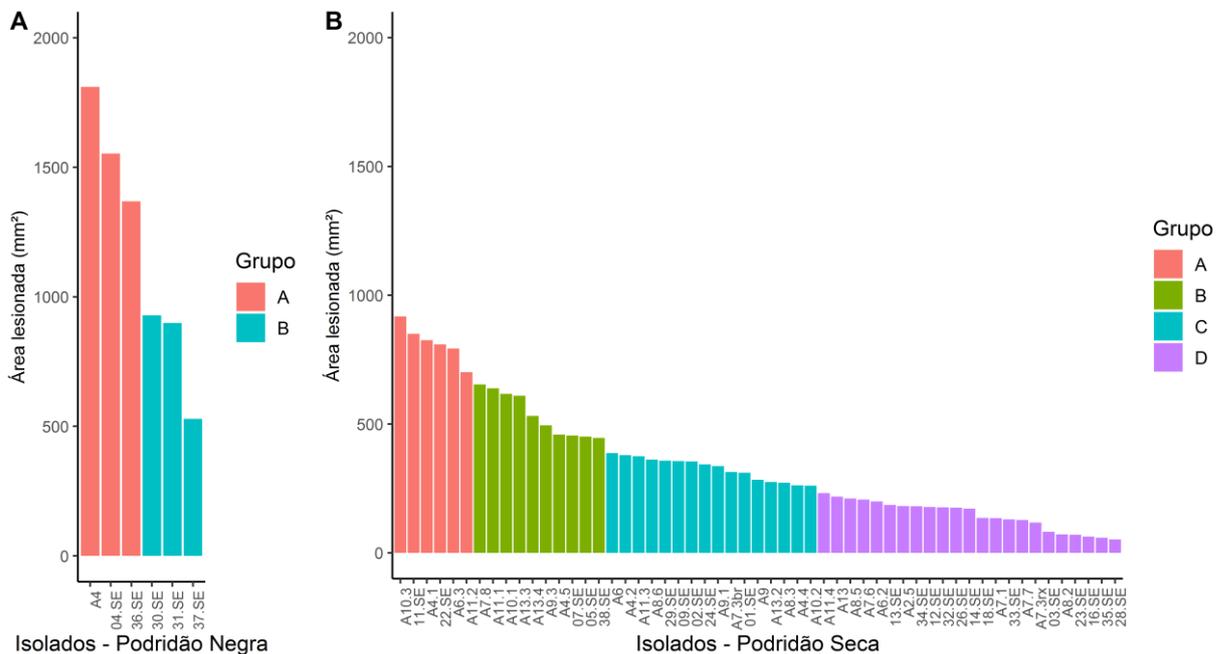


Figura 5. Médias da área lesionada causada pela podridão radicular negra (A) e seca (B) em raízes de mandioca. Isolados pertencentes ao mesmo grupo (cor) não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Quanto às variedades avaliadas, quando inoculadas por patógenos associados à podridão negra (Figura 6 – A), a ‘BRS Formosa’ (considerada suscetível) apresentou as maiores áreas lesionadas na casca (1406,02 mm²) diferindo estatisticamente da ‘BRS Aramaris’ (851,30 mm²), considerada resistente em condições de campo. Entretanto, não houve diferença estatística entre as lesões causadas na polpa das duas variedades (‘BRS Aramaris’ = 1069,45 mm² e ‘BRS Formosa’ = 1399,07 mm²). Quando inoculadas por podridão seca (Figura 6 - B), a ‘BRS Formosa’ apresentou as maiores lesionados tanto na casca (421,15 mm²) quanto na polpa (355,09 mm²), indicando que pode haver diferentes mecanismos de resistência nos

tecidos da raiz da variedade resistente (Casca = 319.50 mm² e Polpa = 273.16 mm²).

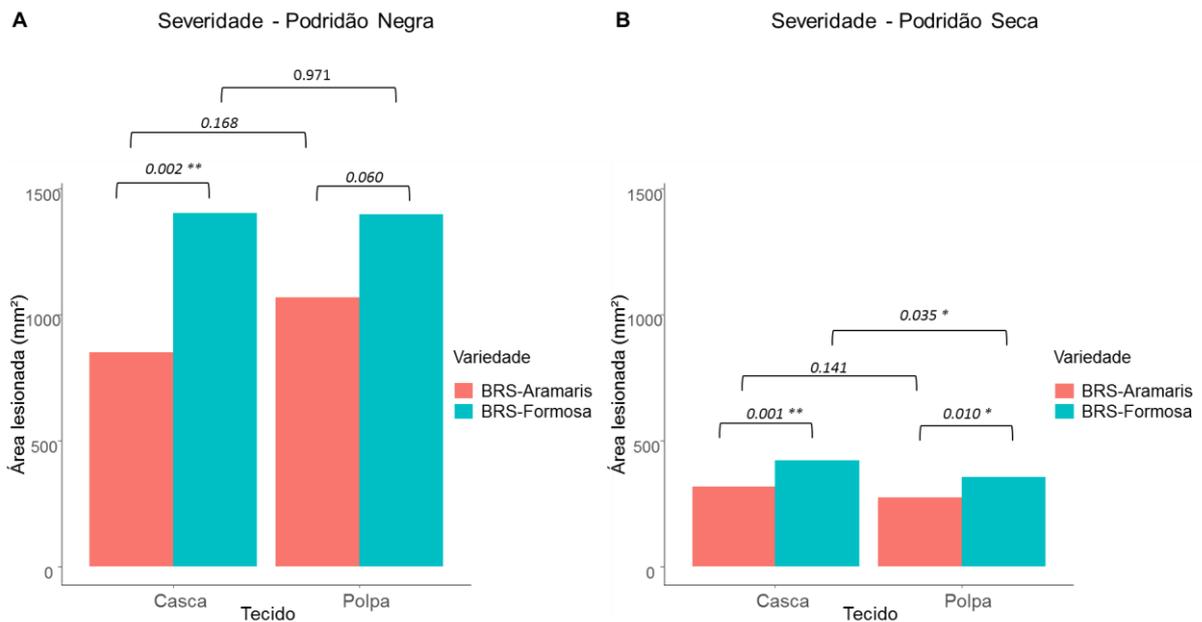


Figura 6. Área lesionada na casca e na polpa de raízes oriundas de duas variedades de mandioca inoculadas por patógenos associados à Podridão Negra (A) e Podridão Seca (B). Médias comparadas pelo teste t de student ($p < 0,05$).

3.4. Atividade enzimática extracelular

As atividades das enzimas extracelulares pectinase, pectina liase, amilase, protease, urease, celulase e lacase dos 61 fitopatógenos (seis associados à podridão negra e 55 associados à podridão seca) foram observadas em meios indicadores, por meio da presença e ausência do halo de degradação ou alteração de cor no meio de cultura (Figura 7).

A atividade ureolítica foi detectada em 54 isolados (Figura 8), todos do gênero *Fusarium* sp., que apresentaram alteração na cor do meio indicador de amarelo-alaranjado (pH 6,8) para rosa. A ausência de mudança na coloração indica um teste negativo (Figura 7).

As atividades da pectinálise e pectinase foram observadas após inundação das placas com CTAB -1% e visualização do halo de degradação em volta do micélio (Figura 7). A pectinálise foi detectada em 28 isolados (os seis do gênero *Lasiodiplodia* sp. e 22 de *Fusarium* sp.) e a pectinase em 30 isolados (os seis do gênero *Lasiodiplodia* sp. e 24 de *Fusarium* sp.) (Figura 8).

Para a avaliação da protease (caseinase) foi realizada observação direta da placa após o crescimento do micélio (48h) e verificada a formação de um halo transparente em volta da colônia (Figura 7), evidenciando a presença da enzima. Dos 61 isolados testados, 52

apresentaram o halo de degradação (Figura 8). Dentre eles, um associado à podridão negra e 51 associados à podridão seca.

A atividade amilolítica foi avaliada após 48h de incubação. As placas foram coradas com solução de Lugol 5% e assim observada a formação de halo em volta da colônia, indicativo da presença da amilase (Figura 7). Entre os 61 isolados testados, 36 apresentaram o halo de degradação, todos do gênero *Fusarium* sp. (Figura 8).

A presença da enzima lacase, detectada pela visualização de um halo escurecido em volta do micélio (Figura 7), foi identificada em 37 dos 61 isolados testados, sendo dois do gênero *Lasiodiplodia* sp. e 35 de *Fusarium* sp. (Figura 8).

A atividade celulolítica foi observada após a inundação das placas com vermelho do Congo, que corou o meio não degradado pela celulase, evidenciando a zona de degradação do mesmo (formação de halo) (Figura 7). Todos os seis isolados de *Lasiodiplodia* sp. produziram celulase, assim como 48 isolados do gênero *Fusarium* sp (Figura 8).

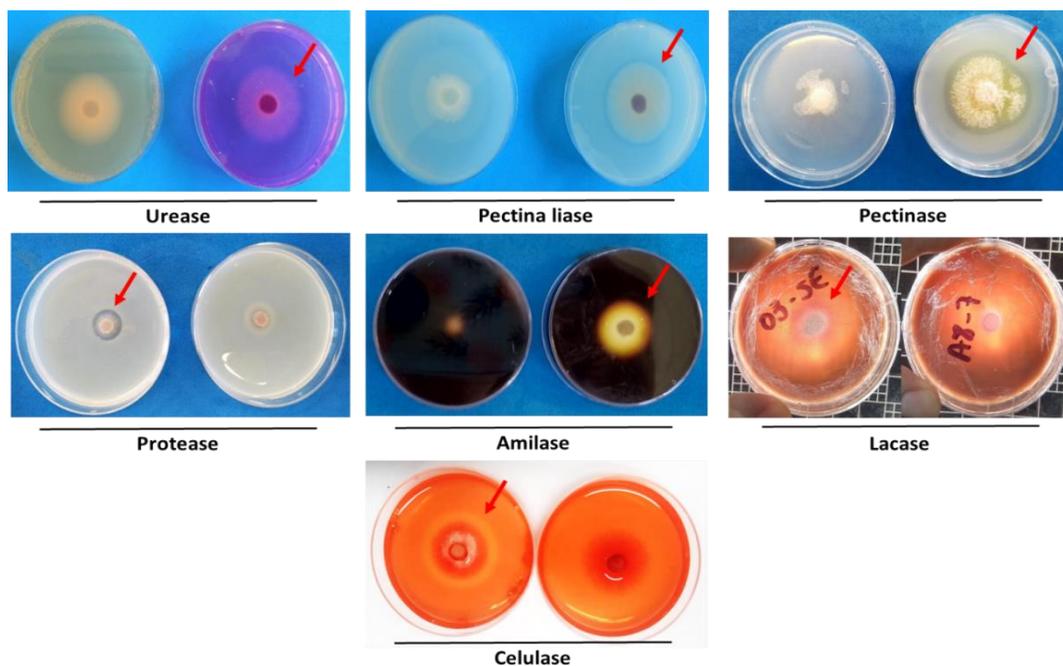


Figura 7. Atividade enzimática (indicada por setas) visualizada em meios indicadores de enzimas, de isolados associados à podridão seca e negra da mandioca. Descrição da atividade: Urease - alteração da cor do meio indicador de amarelo para rosa. Pectina liase, Pectinase e Protease - halo transparente em torno do micélio. Amilase - halo amarelo no meio corado com lugol. Lacase - halo de cor marrom em volta do micélio. Celulase - halo amarelo transparente ao redor o micélio.

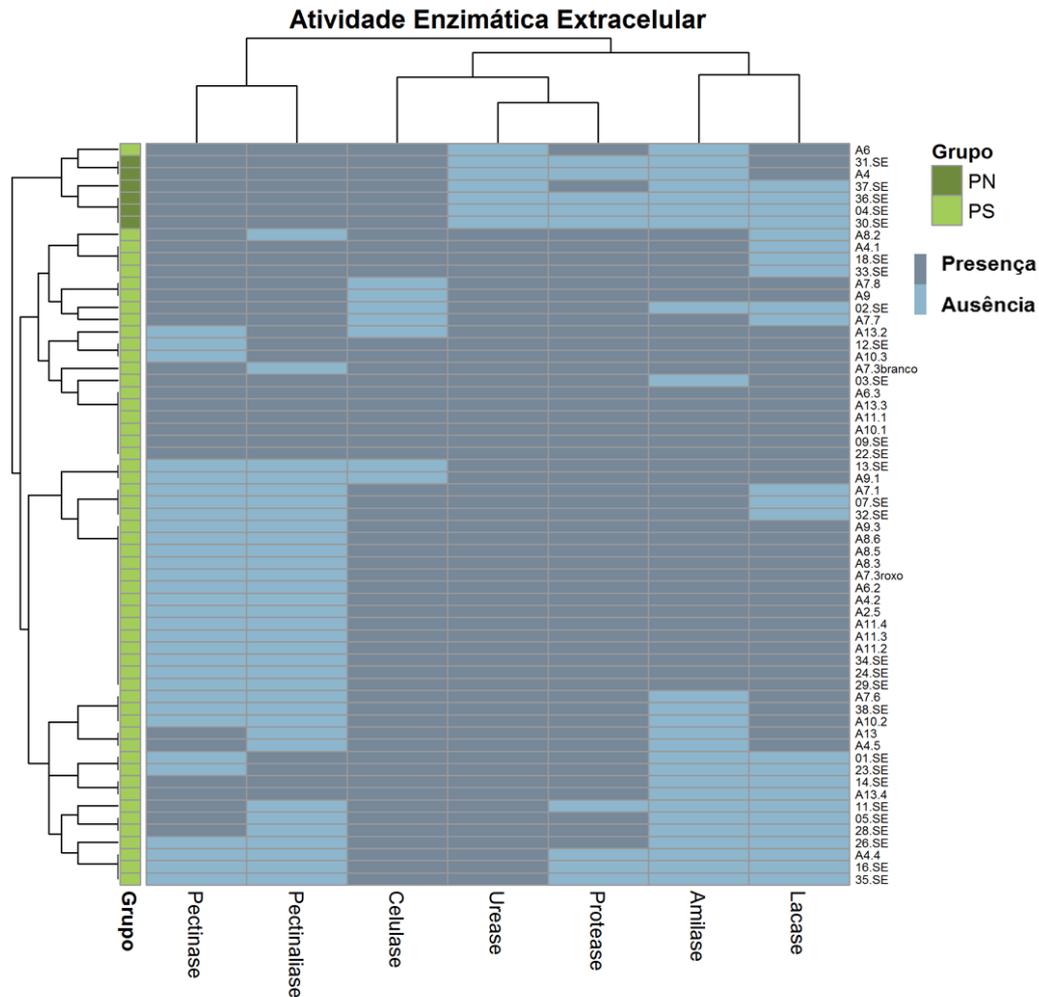


Figura 8. Mapa de calor (*heatmap*) e agrupamento hierárquico de 61 isolados causadores de podridão negra (PN) e podridão seca (PS) de mandioca quanto a sua atividade (presença ou ausência) de sete enzimas extracelulares.

De modo geral, os isolados associados à podridão seca produziram as sete enzimas extracelulares avaliadas (pectinase, pectina liase, amilase, protease, urease, celulase e lacase), enquanto os isolados associados à podridão negra não produziram amilase e urease (Figura 8).

Entretanto, a produção enzimática dentro de um mesmo gênero variou. Os 55 isolados do gênero *Fusarium* sp., associados à podridão seca, foram agrupados em 16 diferentes grupos quanto à produção de enzimas extracelulares. Do mesmo modo, os seis isolados de *Lasiodiplodia* sp. foram agrupados em três grupos distintos (Figura 8).

Por meio da análise de múltiplos fatores (MFA) com base nos dados quantitativos de taxa de crescimento micelial, severidade da casca e severidade da polpa, e os dados qualitativos da produção enzimática dos isolados, pode-se verificar que a pectinase é a enzima mais relacionada com a severidade da podridão radicular nos tecidos da raiz de mandioca (Figura 9).

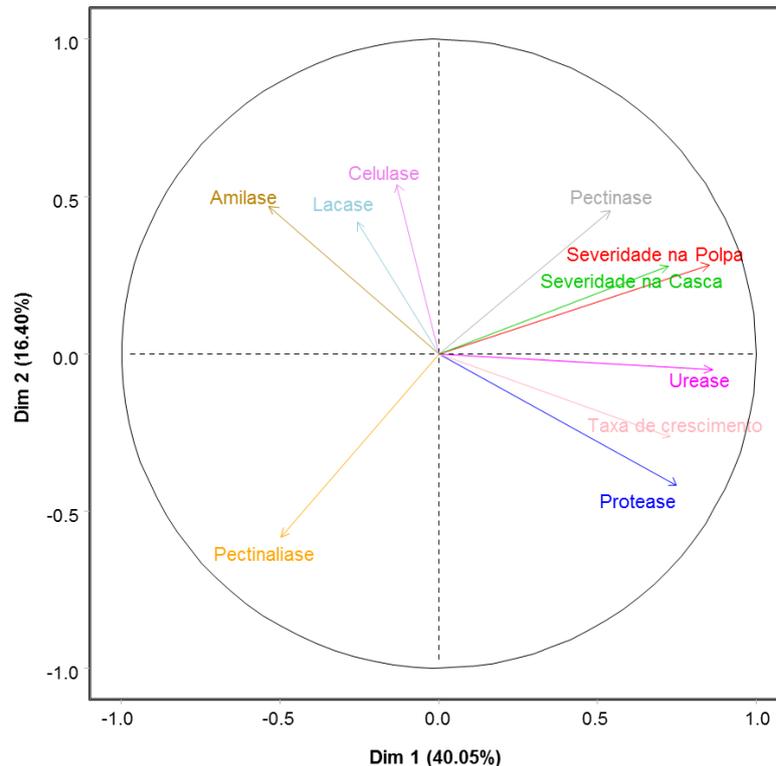


Figura 9. Análise de múltiplos fatores (MFA) para as características qualitativas da atividade extracelular (pectinase, pectina liase, amilase, protease, urease, celulase e lacase) e dos dados quantitativos de crescimento micelial, severidade na polpa e severidade da casca, associado a patógenos causadores de podridão negra e seca da mandioca.

4. DISCUSSÃO

4.1. Variabilidade patogênica associada à podridão radicular da mandioca

O controle efetivo da podridão radicular da mandioca reside na utilização de variedades resistentes, desse modo, os programas de melhoramento devem buscar por fontes de resistência múltipla aos diferentes fitopatógenos associados às podridões radiculares (OLIVEIRA et al., 2017b). Para isto, a identificação dos patógenos presentes na área de seleção e estudo da agressividade patogênica é fundamental para a avaliação e seleção de variedades com ampla resistência (AFOLABI et al., 2011; NYAKA et al., 2015; VILAS BOAS et al. 2017; HOHENFELD et al., 2018). O isolamento realizado no presente estudo em 16 amostras de solo, de uma área com alto índice de infestação de podridão radicular da mandioca, revelou a presença de uma diversidade de espécies fúngicas compondo a microbiota do solo. Ao todo, foram isolados 71 fungos agrupados em seis gêneros, que diferiram entre si quanto às

características morfológicas da colônia, esporos e micélio.

Espécies do gênero *Fusarium* sp. foram os mais prevalentes, seguidos por *Dipodascus* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Gongronella* sp., *Myrothecium* sp. e *Colletotrichum* sp. Estudos sobre a identificação de fungos presentes na microbiota do solo de áreas de cultivo de mandioca infestadas por podridão radicular, relatam a presença de mais de uma espécie na mesma área, sendo de ocorrência comum isolados do gênero *Fusarium* sp., associados à podridão seca, além de fungos da família *Botryosphaeraceae*, associados à podridão negra (AFOLABI et al., 2011; BUA; OKELLO, 2011; NYAKA et al., 2015; VILAS BOAS et al. 2017; AWOYEMI et al., 2016; ZINSOU et al., 2017).

Embora esteja associado à antracnose nas folhas de mandioca (OLIVEIRA et al., 2020c), o isolamento de *Colletotrichum* sp. em amostras de solo de áreas de cultivo de mandioca infestadas por podridões radiculares já foi relatado por outros autores, assim como a presença de espécies de *Dipodascus* sp., um saprófita habitante do solo (NYAKA et al., 2015). Por outro lado, ainda que não tenha sido relatada a presença de *Gongronella* sp. e *Myrothecium* sp. em áreas de cultivo de mandioca infestadas por podridões radiculares, essas espécies também são habitantes do solo, encontradas em amostras de diferentes lavouras (GILARDI et al., 2018; ZHANG et al., 2019a; MARTINS et al., 2020).

Os fungos causadores de doenças no sistema radicular sobrevivem por longos períodos no solo na ausência de hospedeiros através de estruturas de resistência, uma fase inativa que apresenta atividade metabólica nula ou reduzida (MIHAJLOVIĆ et al., 2017). À medida que o material propagativo começa a enraizar, o sistema radicular libera substâncias denominadas exsudatos radiculares e a percepção destes exsudatos vegetais induz ramificações recursivas de hifas dos patógenos presentes no solo (BONFANTE; GÊNERO, 2010). Essas substâncias liberadas são prontamente disponíveis como nutrientes para os microrganismos, constituindo a principal razão para o elevado número e a intensa atividade dos mesmos na rizosfera (DE LA PEÑA; LOYOLA-VARGAS, 2014; BAETZ; MARTINOIA, 2014; PIETERSE et al., 2016).

Com base nas taxas de crescimento e da AACPCM, o *k-means* agrupou os 71 isolados em quatro classes de velocidade do crescimento micelial (alta, moderada, baixa e extremamente baixa), sendo os fungos de *Lasiodiplodia* sp. aqueles com maior velocidade de crescimento. Em condições ótimas de temperatura e disponibilidade de nutrientes, a maior velocidade do crescimento micelial dos isolados causadores de podridão negra já foi relatada em comparação com os isolados de podridão seca (HOHENFELD et al., 2018). A natureza da resposta do crescimento e a eficácia na utilização da energia liberada mediante o desenvolvimento do sistema radicular contribuem para o aumento da biomassa dos fungos habitantes do solo

(LOPES; MICHEREFF, 2018), e conseqüentemente maior capacidade de competição na fase de pré – colonização da raiz e elevada eficácia na relação agente patogênico × hospedeiro.

Com relação à identificação e patogenicidade dos isolados encontrados na área infestada por podridão radicular, embora espécies de *Gongronella* sp., *Myrothecium* sp., *Colletotrichum* sp. e *Dipodascus* sp tenham sido registradas, estes não foram capazes de incitar sintomas em raízes destacada da mandioca, e foram considerados como não patogênicos. Microorganismos não patogênicos ou com afinidade de colonização a um tecido específico (ex. folhas ou hastes) normalmente não conseguem penetrar numa planta não hospedeira ou em um tecido diferentes por serem bloqueados pelas barreiras físicas presentes na sua superfície que se constituem em mecanismos de resistência pré-invasão (PINOSA et al., 2013), ou mesmo pela ausência de estímulos químicos e/ou tácteis para a sua germinação e penetração. Entretanto, o solo não é um ambiente neutro onde microorganismos patogênicos interagem livremente com as raízes da planta hospedeira. As plantas abrigam diferentes comunidades de fungos associados à raiz (MOMMER et al., 2018), e estes microorganismos, bem como a microfauna do solo, interagem direta ou indiretamente por meio de parasitismo ou antibiose, amensalismo ou competição pela exploração de recursos comuns (DAGUERRE et al., 2014).

Com exceção do gênero *Gongronella* sp., um decompositor de restos culturais, os gêneros *Myrothecium* sp. e *Dipodascus* sp., são descritos como fungos habitantes de solo causadores de podridões do caule em outras culturas (KARIM et al., 2017; GILARDI et al., 2018) e o *Colletotrichum* sp., conhecido por causar antracnose nas folhas de mandioca (OLIVEIRA et al., 2020c). Entretanto, em campo é provável que estes patógenos não superem os mecanismos de resistência do sistema radicular da mandioca e, além de decompor matéria orgânica presente no solo, podem se beneficiar atuando como patógenos secundários após infecção da raiz.

4.2. Agressividade e produção enzimática dos patógenos associados às podridões radiculares da mandioca

Embora espécies de *Fusarium* tenham sido mais prevalentes na área, os isolados de *Lasiodiplodia* foram os mais agressivos, apresentando maiores áreas lesionadas na casca e na polpa das raízes. Ainda que seja observada a presença de mais de uma espécie causadora de podridão radicular na biota patogênica do solo de áreas de cultivo de mandioca, a distinção entre esses patógenos quanto à capacidade de colonização e sua agressividade tem sido pouco explorada (ZINSOU et al., 2017; HOHENFELD et al., 2018). O estudo da agressividade

patogênica dessas espécies é uma etapa importante para os programas de melhoramento que tem por objetivo a geração de novas variedades de mandioca com resistência múltipla às podridões radiculares, pois o conhecimento da extensão dos sintomas e do potencial de dano causado por cada espécie em condições de campo, associado à seleção dos isolados mais agressivos poderão ser utilizados no *screening* de germoplasmas resistentes em ambientes controlados.

Os fitopatógenos exibem uma grande variabilidade em seu modo de infecção, diferenciação, função das estruturas de infecção e estratégia nutricional (SHARMA; GAUTAM, 2019). A diferença entre a agressividade de cada espécie associada à podridão radicular e os seus sintomas típicos em raízes de mandioca infectadas pode estar correlacionada com a variabilidade dos mecanismos de infecção entre os isolados, como a sua capacidade de degradação enzimática, por exemplo. Uma vez que as enzimas fazem parte de um amplo repertório de mecanismos funcionais de ataque de patógenos associados a podridões radiculares, permitindo a penetração, a disseminação e a nutrição fúngica (ESTEVES et al., 2014; PACCANARO et al., 2017; HASSAN;2019; SHARAFADDIN et al., 2019).

A penetração bem-sucedida de tecido vegetal vivo por fungos patógenos é precedida por uma troca de sinais entre os dois organismos. A primeira linha de defesa quando um microrganismo entra em contato com a planta é a barreira física imposta pela cutícula e parede celular (SERRANO et al., 2014), uma estrutura de constituição robusta e complexa que requer por parte do microrganismo a presença de enzimas específicas para degradação (ZHAO et al., 2013). Por outro lado, a variação na complexidade de cada componente da parede celular, sua concentração em relação ao órgão da planta e idade do tecido vegetal pode afetar seu nível de suscetibilidade ao ataque do fitopatógeno (LATGÉ; BEAUVAIS, 2014).

De modo geral, o amido é o principal componente da raiz da mandioca seguido por fibras brutas, embora os teores dependam do genótipo e de fatores sazonais (POONSRISAWAT et al., 2016). Por outro lado, a parede celular da mandioca é composta basicamente de celulose, hemicelulose, lignina e pectinas (ricas em galactana e xiloglucanos) (ADETUNJI et al., 2016; NGEA et al., 2016; POONSRISAWAT et al., 2016).

Entretanto, a raiz tuberosa da mandioca apresenta diferença na composição e na estrutura da periderme/região do córtex, da parte externa da polpa amilácea (células de parênquima preenchidas com grânulos de amido) e bem como da parte central da raiz, que compreende a polpa amilácea e a fibra vascular central (vasos do xilema circundados por células secundárias do xilema) (NGEA et al., 2016). A distinção na estrutura e na composição dos tecidos pode ser um dos mecanismos de defesa da raiz de mandioca contra patógenos habitantes

do solo (BRITO et al., 2017). Possivelmente a diferença observada na severidade da casca entre a variedade resistente e a suscetível, seja por essa diferença de estrutura e constituição, atrelada à capacidade do patógeno em colonizar, infectar e degradar os constituintes de cada tecido. No presente estudo foi observado que há diferença no perfil enzimático entre os patógenos causadores de podridão seca e negra da mandioca.

A atividade da lacase, por exemplo, foi detectada em 33% dos isolados de podridão negra e 64% dos patógenos associados à podridão seca. A lacase é uma das enzimas modificadoras de lignina e as suas reações de oxidação envolvem a transferência de elétrons de uma molécula para outra. O O_2 é utilizado como receptor final de elétrons em vez de H_2O_2 , fato que a diferencia das outras enzimas também modificadoras de lignina (MUNK et al., 2015). A lignina faz parte da parede celular secundária e encontra-se ligada aos polímeros de celulose e hemicelulose. Geralmente a lignina confere rigidez e está associada ao transporte de água, nutrientes, resistência e proteção ao ataque de microrganismos às células e tecidos da planta (TERRET; DUPREE, 2019). O acúmulo de lignina tem sido correlacionado com a resistência de cultivares em diversos patossistemas da raiz (GILL et al., 2018; NOVAKOVSKIY et al., 2019; ZHANG et al., 2019b). Portanto, o desenvolvimento de variedades de mandioca com maior conteúdo de lignina na casca parece ser um caminho para aumento da resistência aos patógenos de solo, embora ainda não sejam conhecidos estudos sobre a variabilidade do teor de lignina na raiz de mandioca.

Os materiais lignificados da parede celular do tubérculo da raiz da mandioca são unidades de fenilpropano reticuladas, compostas por tecido do xilema e fibras esclerenquimáticas, resistentes às enzimas degradantes da parede celular (ADETUNJI et al., 2016). Desse modo, a capacidade ligninolítica dos fitopatógenos é um importante fator de virulência (YAKOVLEV et al., 2013; MUNOZ-ADALIA et al., 2016), contribuindo para que os fungos degradem as barreiras físicas e tenham acesso ao conteúdo celular da raiz, mesmo sendo conhecido que os nutrientes básicos essenciais para o crescimento de fungos sejam o carbono (energia celular) e o nitrogênio (síntese de proteínas e ácidos nucleicos) (LOWE et al., 2015).

Contudo, além da lacase, muitos microrganismos secretam proteases para o meio externo com a finalidade de degradar o componente proteico estrutural da parede celular da planta, cujos produtos de hidrólise servem como fonte de carbono e de nitrogênio para a multiplicação celular (JASHNI et al. 2015). A atividade da protease foi detectada em 16% dos isolados de podridão negra e em 93% dos isolados de podridão seca. A maioria das enzimas proteolíticas fúngicas é representada em grande parte por serina proteases

(CHANDRASEKARAN et al., 2016), que tem sido descritas por atuar em diferentes aspectos do processo de infecção, incluindo adesão às células do hospedeiro, penetração inicial na parede celular, colonização e por manipular a defesa do hospedeiro, por meio de efetores (SOBERANES-GUTIÉRREZ et al. 2015). Sendo, portanto, um aspecto chave da interação planta-patógeno (LOWE et al., 2015).

Por outro lado, a urease, relacionada com a capacidade dos patógenos em assimilar nitrogênio, foi detectada em 98% dos patógenos associados à podridão seca; contudo nenhum isolado causador da podridão negra da mandioca mostrou atividade enzimática, ainda que tenha sido descrita em estudos com foco biotecnológico, utilizando isolados de *Lasiodiplodia theobromae* (ESTEVEES et al., 2014; FÉLIX et al., 2018).

Ureases são metaloenzimas que hidrolisam ureia para produzir amônia e CO₂ (FEDER et al., 2015). Entretanto, o papel da urease na maioria dos microrganismos que mostram esta atividade enzimática está ligada a reciclagem de resíduos nitrogenados e assimilação de nitrogênio (MORA; ARIOLI, 2014), um dos nutrientes essenciais para o crescimento de fungos, utilizado na síntese de proteínas e ácidos nucléicos (LOWE et al., 2015).

Por outro lado, assim como o nitrogênio, o amido (fonte de carbono) também é um nutriente que pode ser utilizado para o desenvolvimento fúngico. A quebra desses polissacarídeos complexos em simples açúcares serve para assimilação e posteriormente para o crescimento e reprodução de fitopatógenos (KING et. al., 2011). A atividade amilolítica foi detectada em 65% dos isolados causadores de podridão seca. Entretanto nenhum isolado do gênero *Lasiodiplodia*, associados à podridão negra, apresentou capacidade de degradação do amido, apesar de também ser uma atividade descrita em estudos com foco biotecnológico (ESTEVEES et al., 2014; FÉLIX et al., 2018). Embora o amido seja o principal componente da raiz de mandioca, provavelmente não é uma fonte de carbono utilizada para o desenvolvimento dos fungos causadores de podridão negra. Entretanto, a ausência de capacidades amilolíticas desses patógenos não impediram a colonização e degradação dos tecidos, visto que foram os isolados que provocaram as maiores lesões nos tecidos da raiz.

Na raiz de mandioca, os grânulos de amido estão localizados dentro das células do parênquima. O mecanismo da quebra da parede celular da raiz de mandioca é baseado na atividade da celulase, que resulta na fragmentação e hidrólise das paredes das células celulósicas, liberando assim os grânulos de amido aprisionados (ADETUNJI et al., 2016).

A celulase foi detectada em 100% dos isolados associados à podridão negra e em 87% dos isolados de podridão seca, o que demonstra uma alta atividade desta enzima pelos agentes causais de podridões radiculares. A atividade celulolítica desorganiza a estrutura celular da

casca da raiz de mandioca, devido à quebra de polissacarídeos na parede celular (BARATI et al., 2019), o que pode facilitar a penetração do patógeno. No mecanismo de desintegração da casca, a quebra da celulose disponibiliza glicose, a principal unidade de açúcar da parede celular da mandioca (ADETUNJI et al., 2016; ODOCH et al., 2020). Portanto, os polissacarídeos não amiláceos também podem servir como fonte de energia celular para patógenos, no processo de colonização e infestação da raiz tuberosa.

Entretanto, ainda que libere os grânulos de amido, a celulase não é capaz de degradar os constituintes da polpa da mandioca (BARATI et al., 2019). A falta de atividade celulolítica e a detecção de atividades pectinolíticas (pectina metilesterase, pectina / pectato liase e poligalacturonase) em raízes maceradas, sugerem que a pectina esteja envolvida no processo de amolecimento e desintegração da raiz de mandioca (NGEA et al., 2016). Neste trabalho, a atividade da pectinase e da pectinálise foi detectada em 100% dos isolados associados à podridão negra e em 40% e 44% dos isolados de podridão seca, respectivamente.

Todas as enzimas extracelulares aqui avaliadas foram descritas atuando em mecanismos essenciais para o desenvolvimento e/ou virulência dos fungos causadores de podridões radiculares. Entretanto a análise multifatorial (MFA) indicou que, na inoculação de raízes destacadas em ambiente controlado, a capacidade de degradação da pectina contribuiu com o aumento da severidade da doença nos tecidos da raiz de mandioca.

Os espaços intracelulares da raiz de mandioca contêm polissacarídeos pécticos, que servem como adesivo de ligação das paredes das células celulósicas na lamela média (MAIEVES et al., 2012). A modificação das pectinas está envolvida no amolecimento e na perda da coesão intercelular dos tecidos da raiz da mandioca (NGEA et al., 2016). Portanto, a atividade da pectinase resulta na maceração e perda da integridade estrutural dos tecidos da raiz, causando o apodrecimento.

Neste estudo, embora os isolados associados à podridão negra da mandioca tenham apresentado atividade baixa ou até mesmo nula de algumas enzimas envolvidas na degradação da parede celular (protease, urease, lacase) e na degradação de amido (amilase), foram os patógenos que causaram maior degradação dos tecidos da raiz de mandioca. A unanimidade de degradação da celulose e do complexo pectinolítico sugerem que estes sejam os principais mecanismos de penetração e colonização utilizados por estes patógenos oportunistas no processo de infecção da raiz de mandioca, caracterizando na polpa totalmente desintegrada e amolecida, um sintoma típico da podridão negra. Por outro lado, os isolados de podridão seca apresentaram atividade extracelular de todas as enzimas responsáveis pela degradação da parede celular. Entretanto, seu mecanismo de degradação da polpa pode estar relacionado com

a liberação (pela celulase) dos grânulos de amido aprisionados nas células do parênquima, e a assimilação desses nutrientes pela amilase. A degradação desses constituintes resulta nas lesões delimitadas, típicas da podridão seca, que crescem à medida que o fungo avança pelos tecidos da raiz de mandioca. No entanto, é preciso aprofundar as investigações quanto à quantificação do complexo enzimático secretado por esses fungos e o efeito sinérgico das enzimas no mecanismo de colonização do material propagativo, das raízes adventícias e da raiz tuberosa da mandioca em campo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram isolados 71 fungos, agrupados em seis gêneros diferentes (*Gongronella* sp., *Myrothecium* sp., *Colletotrichum* sp., *Dipodascus* sp., *Fusarium* sp. e *Lasiodiplodia* sp.) compondo a microbiota do solo de uma área de cultivo de mandioca em Umbaúba/SE. Entretanto, apenas o gênero *Fusarium* (associado à podridão seca) e o *Lasiodiplodia* (associado à podridão negra) foram patogênicos, completando os postulados de Koch.

Os isolados do gênero *Lasiodiplodia* sp., associados à podridão negra, apresentaram o maior crescimento micelial, além de terem sido os mais agressivos em comparação com os isolados de podridão seca, provocando maiores lesões nas raízes de mandioca.

Foi observada diferença quanto ao potencial dos fitopatógenos associados às podridões radiculares da mandioca em produzir enzimas extracelulares que degradem os componentes da casca e da polpa da raiz tuberosa da mandioca. Os isolados associados à podridão seca produziram as sete enzimas extracelulares avaliadas (pectinase, pectina liase, amilase, protease, urease, celulase e lacase), enquanto os isolados associados à podridão negra não produziram amilase e urease.

Embora todas as enzimas estejam envolvidas nos mecanismos de colonização e/ou na assimilação de energia para o desenvolvimento fúngico, a pectinase está relacionada com amolecimento e na perda da coesão intercelular dos tecidos da raiz tuberosa da mandioca.

Novas amplificações e sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) serão realizados. Posteriormente, para aqueles identificados como espécies do gênero *Fusarium*, a análise filogenética será com base em dois genes: EF1-a (gene do fator de alongamento da tradução) e RPB2 (subunidade de RNA polimerase II). Para as espécies do gênero *Lasiodiplodia*, a identificação molecular será com base no gene EF1-a.

6. REFERÊNCIAS

- ADETUNJI, A.I.; DU CLOU, H.; WALFORD, S.N.; TAYLOR, J.R. Complementary effects of cell wall degrading enzymes together with lactic acid fermentation on cassava tuber cell wall breakdown. **Industrial Crops and Products**, v.90, p.110-117, 2016.
- AFOLABI, C.G.; OKECHUKWU, O.C.; KEHINDE, I.A.; OKECHUKWU R.U. Assessments of farmers' field for root rot disease on improved cassava varieties released in Nigeria. **African Journal of Root and Tuber Crops**, v. 9, p. 50-57, 2011.
- ANDRADE, L.R.B.; SOUSA, M.B.; OLIVEIRA, E.J.; RESENDE, M.D.V.; AZEVEDO, C. F. Cassava yield traits predicted by genomic selection methods. **PLoS One**, v.14, p. e0224920, 2019.
- AWOYEMI, S.O.; AFOLABI, C.G.; POPOOLAA, A.K.; ODEDINAB, J.N.; ADIGBO, S.O. Performances of improved cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars against root rot disease and yield in cassava-maize intercropping systems under natural infection. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.9, p.386–401, 2016.
- BAETZ, U.; MARTINOIA, E. Root exudates: the hidden part of plant defense. **Trends in Plant Science**, v.19, p. 90-98, 2014.
- BANDYOPADHYAY, R.; MWANGI, M.; AIGBE, S.O.; LESLIE, J.F. *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. **Phytopathology**, v. 96, p.673–676, 2006.
- BARATI, Z.; LATIF, S.; MÜLLER, J. Enzymatic hydrolysis of cassava peels as potential pre-treatment for peeling of cassava tubers. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2019, 20, 101247.
- BARROS, J.A.; MEDEIROS, E.V.; NOTARO, K.A.; MORAES, W.S.; SILVA, T.C.E.S.; MOREIRA, K.A. Different cover promote sandy soil suppressiveness to root rot disease of cassava caused by *Fusarium solani*. **African Journal of Microbiology Research**, v.8, p.967–973, 2014.
- BOARI, A.J.; CUNHA, E.M.; QUADROS, A.F.F.; BARRETO, R.W.; FERNANDES, A.F. First report of *Phytophthium* sp. causing storage root rot and foliage blight of cassava in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, p.1042, 2018.
- BONFANTE, P.; GENRE, A. Mechanisms underlying beneficial plant – fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. **Nature Communications**, v.1, 2010.
- BRITO, A.C.; OLIVEIRA, S.A.S.; OLIVEIRA, E.J. Genome-wide association study for resistance to cassava root rot. **The Journal of Agricultural Science**, v.155, p.1424-1441. 2017.
- BRITO, A.C.Q.; DE MELLO, J.F.; CÂMARA, M.P.S.; VIEIRA, J. C. B.; MICHEREFF, S. J.; SOUZA-MOTTA, C.M.; MACHADO, A.R. Diversity and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with black root rot and stem cutting dry rot in *Manihot esculenta* in Brazil. **The European Journal of Plant Pathology**, v. 157, p.583–598, 2020.
- BRITO, A.C.Q.; DE MELLO, J.F.; MICHEREFF, S.J.; DE SOUZA-MOTTA, C.M.; MACHADO, A.R. First report of *Macrophomina pseudophaseolina* causing stem dry rot in cassava in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, p.1245-1245, 2019.

BUA, B.; OKELLO, C. Isolation and identification of cassava root rot disease causal pathogens from Lira district, Uganda. **African Crop Science Conference Proceedings**, v.10, p.183-186, 2011.

CARMO, C.D.; SILVA, M.S.; OLIVEIRA, G.A.F.; OLIVEIRA, E.J. Molecular assisted selection for resistance to cassava mosaic disease in *Manihot esculenta* Crantz. **Scientia Agricola**, v.72, p.520-527, 2015.

CEBALLOS, H.; KULAKOW, P.; HERSHEY, C. Cassava breeding: current status, bottlenecks and the potential of biotechnology tools. **Tropical Plant Biology**, v.5, p.73–87, 2012.

CEBALLOS, H.; PÉREZ, J.C.; ORLANDO, J.B.; LENIS, J.I.; MORANTE, N.; CALLE, F.; PINO, L.; HERSHEY, C. Cassava breeding II: The value of breeding value. **Frontiers in Plant Science**, p.7, 2016.

CHANDRASEKARAN, M., THANGAVELU, B., CHUN, S.C.; SATHIYABAMA, M. Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. **Journal of General Plant Pathology**, v.82, p.233–239, 2016.

DAGUERRE, Y.; SIEGEL, K.; EDEL-HERMANN, V.; STEINBERG, C. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. **Fungal Biology Reviews**, v.28, p. 97-125, 2014.

DE-LA-PENA, C.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Biotic interactions in the rhizosphere: a diverse cooperative enterprise for plant productivity. **Plant Physiology**, v.166, p.701–719, 2014.

ESTEVEZ, A.C., SARAIVA, M., CORREIA, A., ALVES, A. Botryosphaeriales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, p. 332–342, 2014.

EVANS, A.S. Causation and disease: The Henle-Koch postulates revisited. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 49, n. 2, p. 175-195, 1976.

FEDER, V.; KMETZSCH, L.; STAATS, C.C.; VIDAL-FIGUEIREDO, N.; LIGABUE-BRAUN, R.; CARLINI, C.R.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. **FEBS Journal**, v.282, p. 1406-1418, 2015.

FÉLIX, C.; LIBORIO, S.; NUNES, M.; FELIX, R.; DUARTE, A.S.; ALVES, A.; ESTEVES, A.C. *Lasiodiplodia theobromae* as a producer of biotechnologically relevant enzymes. **International Journal of Molecular Science**, v.19, p. 29, 2018.

FOUNDATION AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). Database Gateway. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/>>. Acesso em: Abril. 2020.

FOUNDATION AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). **Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets – November 2018**.

FOUNDATION AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). Save and Grow: Cassava. A

guide to sustainable production intensification. Roma, 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/index_en.html>.

FREITAS, J.P.X.; SANTOS, V.S.; OLIVEIRA, E.J. Inbreeding depression in cassava for productive traits. **Euphytica**, v. 209, p. 137-145, 2016.

FREITAS, J.P.X.; DINIZ, R.P.; OLIVEIRA, S.A.S.; SILVA, S.V.; OLIVEIRA, E.J. Inbreeding depression for severity caused by leaf diseases in cassava. **Euphytica**, v. 213, p. 205, 2017.

GIBSON, D.M.; KING, B.C.; HAYES, M.L.; BERGSTROM, G.C. Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. **Current Opinion in Microbiology**, v.14, p. 264–270, 2011.

GILARDI, G.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Emerging foliar and soil-borne pathogens of leafy vegetable crops: a possible threat to Europe. **EPPO Bulletin**, v.48, p.116–127, 2018.

GILL, U.S.; UPPALAPATI, S.R.; GALLEGRO-GIRALDO, L.; ISHIGA, Y.; DIXON, R.A.; MYSORE, K.S. Metabolic flux towards (iso) flavonoid pathway in lignin modified alfalfa lines induces resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Medicaginis*. **Plant, Cell & Environment**, v. 41, p. 1997-2007, 2018.

HASSAN, A.G. Formulations as biocontrol and role of pectinase and cellulose in pathogenicity. **Journal of Agriculture, Food and Environment**, v.1, p. 1-5, 2019.

HOHENFELD, C.S., SANTANA, M.P., JUNIOR, L.R.C, OLIVEIRA, S.A.S, OLIVEIRA, E.J. Modelling growth characteristics and aggressiveness of *Neoscytalidium hyalinum* and *Fusarium solani* associated with black and dry root rot diseases on cassava. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, p.422–432, 2018.

JASHNI, M.K.; MEHRABI, R.; COLLEMARE, J.; MESARICH, C.H.; DE WIT, P.J.G.M. The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant-pathogen interactions. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p.584, 2015.

KARIM, H.; BOUBAKER, H.; ASKARNE, L.; CHERIFI, K.; LAKHTAR, H.; MSANDA, F.; BOUDYACH, E.H.; AIT BEN AOUMAR, A. Use of *Cistus* aqueous extracts as botanical fungicides in the control of Citrus sour rot. **Microbial Pathogenesis**, v.104, p. 263-267, 2017.

KING, B.C.; WAXMAN, K.D.; NENNI, N.V.; WALKER, L.P.; BERGSTROM, G.C.; GIBSON, D.M. Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, p.4, 2011.

KUBICEK, C.P.; STARR, T.L.; GLASS, N.L. Plant cell wall–degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v.52, p. 427-451, 2014.

LATGÉ, J.P.; BEAUVAIS, A. Functional duality of the cell wall. **Current Opinion in Microbiology**, v.20, p. 111-117, 2014.

LAZNIEWSKA, J.; MACIOSZEK, V.K.; KONONOWICZ, A.K. Plant-fungus interface: The role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi.

Physiological and Molecular Plant Pathology, v.78, p. 24-30, 2012.

LOPES, U.P.; MICHEREFF, S.J. Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos. **EDUFRPE**, 1. ed., 2018.

LOWE, R.G.T.; MCCORKELLE, O.; BLEACKLEY, M.; COLLINS, C.; FAOU, P.; MATHIVANAN, S.; MARILYN, A. Extracellular peptidases of the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p.962, 2015.

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; OLIVEIRA, S. A. S.; PEREIRA, O. L. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.39, p.464-470, 2014.

MAIEVES, H.A.; OLIVEIRA, D.C.; BERNARDO, C.; MULLER, C.M.D.; AMANTE, E.R. Microscopy and texture of raw and cooked cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. **Journal of Texture Studies**, v.4, p.164–173, 2012.

MALIK, A.I.; KONGSIL, P.; NGUYỄN, V.A.; OU, W.; SREAN, P.; SHEELA, M.N.; LUIS AUGUSTO BECERRA, L.A.; UTSUMI, Y.; LU, C.; KITTIPADAKUL, P.; et al. Cassava breeding and agronomy in Asia- 50 years of history and future directions. **Breeding Science**, v.20, p.145–166, 2020.

MARTINS, M.R; SANTOS, C.; SOARES, C.; SANTOS, C.; LIMA, N. *Gongronella eborensis* sp. nov., from vineyard soil of Alentejo (Portugal). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.70, 2020.

MCCALLUM, E.J.; ANJANAPPA, R.B.; GRUISSEM, W. Tackling agriculturally relevant diseases in the staple crop cassava (*Manihot esculenta*). **Current Opinion in Plant Biology**, v.38, p.50–58, 2017.

MIHAJLOVIC, M.; REKANOVIC, E.; HRUSTIC, J.; GRAHOVAC, M.; TANOVIC, B. Methods for management of soilborne plant pathogens. **Pestic Phytomed**, v.32, p. 9-24, 2017.

MOMMER, L.; COTTON, T.E.A.; RAAIJMAKERS, J.M.; TERMORSHUIZEN, A.J.; RUIJVEN, J.; HENDRIKS, M.; RIJSSEL, S.Q.; MORTEL, J.E.; PAAUW, J.W.; SCHIJLEN, E.G.W.M. et al. Lost in diversity: the interactions between soil-borne fungi, biodiversity and plant productivity. **New Phytologist**, v.218, p. 542–553, 2018.

MORA, D.; ARIOLI, S. Microbial urease in health and disease. **PLoS Pathogens**, v.10, 2014.

MORGANTE, C.V.; NUNES, S.P.; CHAVES, A.R.; FERREIRA, C. F.; AIDAR, S.T.; VITOR, A.B.; OLIVEIRA, E.J. Genetic and physiological analysis of early drought response in *Manihot esculenta* and its wild relative. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, p. 1-11, 2020.

MOSES, E.; AKROFI, S.; MENSAH, G. A. Characteristics and control of a new basidiomycetous root rot of cassava (*Manihot esculenta*) in Ghana. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 13, p.307-311, 2007.

MSIKITA, W.; BISSANG, B.; JAMES, B.D.; BAIMEY, H.; WILKINSON, H. T.; AHOUNOU, M.; FAGBEMISSI, R. Prevalence and severity of *Nattrassia mangiferae* root and

stem rot pathogen of cassava in Bénin. **Plant Disease**, v.89, p.12-16, 2005.

MUNK, L.; SITARZ, A.K.; KALYANI, D.C.; MIKKELSEN, J.D. MEYER, A. S. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? **Biotechnology Advances**, v.33, p.13–24, 2015.

MUÑOZ-ADALIA EJ, FLORES-PACHECO JA, MARTÍNEZ-ÁLVAREZ P ET AL Effect of mycoviruses on the virulence of *Fusarium circinatum* and laccase activity. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.94, p.8-15, 2016.

NEVES, R.J.; DINIZ, R.P.; OLIVEIRA, E.J. Productive potential of cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) propagated by leaf buds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 1733-1747, 2018.

NEVES, R.J.; SOUZA, L.S.; OLIVEIRA, E.J. A leaf bud technique for rapid propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Scientia agricola**, v. 77, p. 1-6, 2020.

NGEA, G.L.N.; GUILLON, F.; NGANG, J.J.E.; BONNIN, E.; BOUCHET, B.; SAULNIER, L. Modification of cell wall polysaccharides during retting of cassava roots. **Food Chemistry**, v.213, p. 402-409, 2016.

NOTARO, K.A.; MEDEIROS, E.V.; SILVA, C. A.D.; BARROS, J. A. Prospecção de fitopatógenos associados à podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. **Bioscience Journal**, v.5, p.1832-1839, 2013.

NOVAKOVSKIY, R.O.; KRASNOV, G.S.; ROZHMINA, T.A.; KUDRYAVTSEVA, L.P.; ZHUCHENKO, A.A.; PUSHKOVA, E.N.; POVKHOVA, L.V.; KEZIMANA, P.; DMITRIEV, A.A.; MELNIKOVA, N.V. Role of genes involved in lignin biosynthesis in flax response to *Fusarium oxysporum*. **Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology**, p.83–85, 2019.

NYAKA, N.G.A.I.C.; KAMMEGNE, D. P.; NTSOMBOH, N. G.; MBENOUN, M.; ZOK, S.; FONTEM, D. Isolation and identification of some pathogenic fungi associated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root rot disease in Cameroon. **African Journal of Agricultural Research**, v.10, p.4538–4542, 2015.

ODOCH, M., BUYS, E.M.; TAYLOR, J.R.N. Solid-state fermentation of cassava roots using cellulolytic-type alkaliphilic *Bacillus* spp. cultures to modify the cell walls and assist starch release. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.191, p.1395–1410, 2020.

OLIVEIRA, E. J.; MORGANTE, C. V.; AIDAR, S. T.; CHAVES, A. R. M.; ANTONIO, R. P.; CRUZ, J. L.; COELHO FILHO, M. A. Evaluation of cassava germplasm for drought tolerance under field conditions. **Euphytica**, v. 213, p. 188-2013, 2017a.

OLIVEIRA, E.J.; OLIVEIRA, S. A.S.; VILASBOAS, S.A.; HOHENFELD, C.; SILVA S. V. Selection of cassava accessions with multiple resistance to pathogens associated with root rot disease. **Euphytica**, v. 213, p. 185, 2017b.

OLIVEIRA, E.J.; OLIVEIRA, S.A.S.; OTTO, C.; ALICAI, T.; FREITAS, J.P.X.; CORTES, D.F.M.; PARIYO, A.; LIRI, C.; ADIGA, G.; BALMER, A.; KLAUSER, D.; ROBINSON, M. A novel seed treatment-based multiplication approach for cassava planting material. **PLoS**

One, v. 15, p. e0229943, 2020a.

OLIVEIRA, S. A. S.; VILAS BOAS, S. A.; BRAGANÇA, C. A. D.; OLIVEIRA, E. J. First report of *Phytophthora melonis* causing cassava wilt and root rot in Bahia State, Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 107, 2016.

OLIVEIRA, S.A.S.; SILVA, L. L.; NASCIMENTO, D. S.; DIAMANTINO, M. S. A. S.; FERREIRA, C. F.; OLIVEIRA, T.A.S. Colletotrichum species causing cassava (*Manihot esculenta* Crantz) anthracnose in different eco-zones within the Recôncavo Region of Bahia, Brazil. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.127, p.411–416, 2020b.

OLIVEIRA. S.A.S.; HOHENFELD. C.S.; SANTOS. V.S.; HADDAD. F.; OLIVEIRA. E.J. Resistance to *Fusarium* dry root rot disease in cassava accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1414-1417, 2013.

ONYEKA, T. J.; EKPO, E. J. A.; DIXON, A. G. O. Virulence and host–pathogen interaction of *Botryodiplodia theobromae* isolates of cassava root rot disease. **Journal of phytopathology**, v.153, p.726-729, 2005a.

ONYEKA, T. J.; DIXON, A. G. O.; EKPO, E. J. A. Identification of levels of resistance to cassava root rot disease (*Botryodiplodia theobromae*) in African landraces and improved germplasm using in vitro inoculation method. **Euphytica**, v.145, p.281-288, 2005b.

PACCANARO, M.C.; SELLA, L.; CASTIGLIONI, C.; GIACOMELLO, F.; MARTINEZ-ROCHA, A.L.; D'OVIDIO, R.; SCHAFER, W.; FAVARON, F. Synergistic effect of different plant cell wall-degrading enzymes is important for virulence of *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.30, p.886–895, 2017.

PIETERSE, C.M. J.; JONGE, R.; BERENDSEN, R. L. The soil-borne supremacy. **Trends in Plant Science**, v. 21, p. 171-173, 2016.

PINOSA, F.; BUHOT, N.; KWAAITAAL, M.; FAHLBERG, P.; THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ELLERSTROM, M.; ANDERSSON, M.X. *Arabidopsis* phospholipase D δ is involved in basal defense and non-host resistance to powdery mildew fungi. **Plant Physiology**, v. 163, p. 896-906, 2013.

POONSRIAWAT, A.; WANLAPATIT, S.; WANSUKSRI, R.; PIYACHOMKWAN, K.; PAEMANEE, A.; GAMONPILAS, C.; EURWILAICHITR, L.; CHAMPREDA, V. Synergistic effects of cell wall degrading enzymes on rheology of cassava root mash. **Process Biochemistry**, v.51, p. 2104-2111, 2016.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna. Austria. 2020. URL <https://www.R-project.org/>.

SANTIAGO, C.H.; SANTANA, M.P.; JUNIOR, L.R.C.; OLIVEIRA, S.A.S.; OLIVEIRA, E.J. Methodologies for selecting cassava with resistance to dry and black root rot under controlled conditions. **Bragantia**, v.77, p.440-451, 2018.

SANTOS SILVA, P.P.; SOUSA, M.B.; OLIVEIRA, E.J. Prediction models and selection of agronomic and physiological traits for tolerance to water deficit in cassava. **Euphytica**, v. 215,

p. 1-18, 2019.

SENTHIL, M.; NATH, V.S.; LAJAPATHYJEEVA, M.; HEGDE, V.M.; MISRA, R.S. In vitro standardisation of resistance screening methods in cassava against tuber rot disease. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.46, p.1255-1261, 2013.

SERRANO, M.; COLUCCIA, F.; TORRES, M.; L'HARIDON, F.; MÉTRAUX, J.P. The cuticle and plant defense to pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p.274, 2014.

SHARAFADDIN, A.H.; HAMAD, Y.K.; EL-KOMY, M.H.; IBRAHIM, Y.E.; WIDYAWAN, A.; MOLAN, Y.Y.; SALEH, A.A. Cell wall degrading enzymes and their impact on *Fusarium proliferatum* pathogenicity. **European Journal of Plant Pathology**, v.155, p. 871–880, 2019.

SHARMA, N.; GAUTAM, A.K. Early Pathogenicity events in Plant Pathogenic Fungi: A Comprehensive Review. **Biological Forum – An International Journal**, v.11, p.24-34, 2019.

SILVA, J.M.; MEDEIROS, E.V.; DUDA, G.P.; BARROS, J.A.; SANTOS, U.J. Fames and microbial activities involved in the suppression of cassava root rot by organic matter. **Revista Caatinga**, v.30, p.708-717, 2017.

SOBERANES-GUTIÉRREZ, C.V.; JUÁREZ-MONTIEL, M.; OLGUÍN-RODRÍGUEZ, O.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.; RUIZ-HERRERA, J.; VILLA-TANACA, L. The pep4 gene encoding proteinase A is involved in dimorphism and pathogenesis of *Ustilago maydis*. **Molecular Plant Pathology**, v.16, p.837–846, 2015.

TERRETT, O.M.; DUPREE, P. Covalent interactions between lignin and hemicelluloses in plant secondary cell walls. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 97-104, 2019.

TORRES, L.G.; RESENDE, M.D.V.; AZEVEDO, C.F.; SILVA, F.F.; OLIVEIRA, E.J. Genomic selection for productive traits in biparental cassava breeding populations. **PLoS One**, v. 14, p. e0220245, 2019.

VILAS BOAS, S.A.; HOHENFELD, C.S.; OLIVEIRA, S.A.S.; SANTOS, V.S.; OLIVEIRA, E.J. Sources of resistance to cassava root rot caused by *Fusarium* spp.: a genotypic approach. **Euphytica**, v.9, p.237–251, 2016.

VILAS BOAS, S.A.; OLIVEIRA, S.A.S.; BRAGANÇA, C.A.D.; RAMOS, J.B.; OLIVEIRA, E.J. Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. **Scientia Agricola**, v.74, p.60–67, 2017.

WOLFE, M.; DEL CARPIO, D.P.; ALABI, O.; EZENWAKA, L.; IKEOGLU, U.; KAYONDO, I.; LOZANO, R.; OKEKE, U.; OZIMATI, A.; WILLIAMS, E.; EGESI, C.; KAWUKI, R.; KULAKOW, P.; RABBI, I.; JANNINK, J.L. Prospects for genomic selection in cassava breeding. **Plant Genome**, v.10, 2017.

YAKOVLEV, I.A.; HIETALA, A.M.; COURTY, P.E.; LUNDELL, T.; SOLHEIM, H.; FOSSDAL, C.G. Genes associated with lignin degradation in the polyphagous white-rot pathogen *Heterobasidion irregulare* show substrate-specific regulation. **Fungal Genetics and Biology**, v.56, p.17–24, 2013.

ZHANG, Z.Y.; HAN, Y.F.; CHEN, W.H.; LIANG, Z.Q. *Gongronella sichuanensis* (Cunninghamellaceae, Mucorales), a new species isolated from soil in China. **Phytotaxa**, v.416, p. 167–174, 2019a.

ZHANG, W.; YAN, J.; LI, X.; QIKAI XING, Q.; THILINI CHETHANA, K.W.; ZHAO, W. Transcriptional response of grapevine to infection with the fungal pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. **Scientific Reports**, v.9, 2019b.

ZHAO, Z.; LIU, H.; WANG, C.; XU, J.R. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. **BMC Genomics**, v.14, p. 274, 2013.

ZINSOU, V.A.; AFOUDA, L.A.C.; AHOHUENDO, B.C.; WYDRA, K. Importance of fungal root rot pathogens of cassava in Benin. **Pakistan Journal of Botany**, v.49, p.2023-2028, 2017.

CAPÍTULO 2

RESISTÊNCIA GENÉTICA À PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA E MAPEAMENTO ASSOCIATIVO PARA ATRIBUTOS PRODUTIVOS

RESISTÊNCIA GENÉTICA À PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA E MAPEAMENTO ASSOCIATIVO PARA ATRIBUTOS PRODUTIVOS

Autora: Camila Santiago Hohenfeld

Orientadores: Dra. Adriana Rodrigues Passos

Dr. Eder Jorge de Oliveira

Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

Resumo – As podridões radiculares, causadas por um complexo de fitopatógenos do solo, possuem alta importância econômica por afetar diretamente a raiz que é o principal produto comercial da mandioca. O objetivo deste estudo foi avaliar genótipos de mandioca quanto à resistência à podridão radicular em condições de campo com histórico da doença em dois anos de avaliação e identificar possíveis regiões genômicas associadas à resistência em campo. Foram avaliados 148 genótipos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. A análise dos dados fenotípicos foi realizada por meio de modelos lineares mistos e a análise de associação genômica com base nos métodos ‘GLM’, ‘MLM’ e ‘FarmCPU’. O alto índice de doença (ω) influenciou diretamente na sobrevivência dos genótipos e, por conseguinte na altura de planta, na produtividade da parte aérea e de raízes. Os 148 genótipos foram agrupados em cinco clusters, que foram classificados quanto ao nível de resistência à podridão radicular como “Extremamente Suscetível”, “Suscetível”, “Moderadamente Suscetível”, “Moderadamente Resistente” e “Resistente”. Os 10 genótipos com melhor desempenho em campo (TOP-10) foram selecionados como potenciais parentais para o desenvolvimento de progênie segregantes. As estimativas de parentesco genômico entre estes genótipos variaram de - 0,183 a 0,671. Os genótipos BGM-1171 e BGM-1190 apresentaram os menores graus de parentesco com as demais fontes de resistência selecionadas. Os genótipos BGM-0209, BGM-0398 e BGM-0659 apresentaram valores negativos de parentesco com a maioria das variedades elite, e o BGM-0659 apresentou com todas as variedades locais. A análise de associação genômica ampla detectou cinco SNPs significativos para produtividade de raízes em solo infestado com podridões, cuja anotação gênica indica funções relacionadas a mecanismos de defesa contra estresses bióticos e abióticos.

Palavras-chave: *Fusarium* sp.; *Lasiodiplodia* sp.; GWAS; melhoramento; *Manihot esculenta*; doenças de solo.

GENETIC RESISTANCE TO CASSAVA ROOT ROT DISEASE AND GENOME-WIDE ASSOCIATION FOR PRODUCTIVE ATTRIBUTES

Author: Camila Santiago Hohenfeld

Advisors: Dra. Adriana Rodrigues Passos

Dr. Eder Jorge de Oliveira

Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

Abstract - Root rot disease, caused by a complex of soil phytopathogens, has high economic importance because it directly affects the root, which is the main commercial product of cassava. The aim of this study was to evaluate cassava genotypes for resistance to root rot in field conditions with a history of the disease in two years of evaluation and to identify possible genomic regions associated with field resistance. 148 genotypes of Embrapa Mandioca and Fruticultura were evaluated. The analysis of phenotypic data was performed using mixed linear models and the analysis of genomic association based on the methods 'GLM', 'MLM' and 'FarmCPU'. The high disease rate (ω) directly influenced the survival of genotypes and, therefore, plant height, shoot and root productivity. The 148 genotypes were grouped into five clusters, which were classified according to the level of root rot resistance as “Extremely Susceptible”, “Susceptible”, “Moderately Susceptible”, “Moderately Resistant”, “Resistant”. The 10 genotypes with the best performance in the field (TOP-10) were selected as potential progenitors for the development of segregating progenies. Estimates of genomic kinship between these genotypes ranged from - 0.183 to 0.671. The genotypes BGM-1171 and BGM-1190 showed the lowest degree of kinship with the other sources of resistance selected. The genotypes BGM-0209, BGM-0398 and BGM-0659 showed negative values of kinship with most elite varieties, and BGM-0659 presented with all local varieties. The broad genomic association analysis detected five significant SNPs for root productivity in soil infested with root rot, whose previous studies indicated functions related to defense mechanisms against biotic and abiotic stresses.

Key words: *Fusarium* sp.; *Lasiodiplodia* sp.; GWAS; Breeding; *Manihot esculenta*; soil-borne diseases.

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à família Euphorbiaceae, é uma planta arbustiva, ramificada e com um sistema radicular tuberoso, responsável pelo armazenamento de amido, que é uma importante fonte de carboidratos. Em nível mundial, a mandioca é uma das culturas básicas em maior expansão devido à sua ampla diversidade de usos, que permite sua exploração econômica desde o campo até setores industriais bastante sofisticados como o segmento têxtil, papel, indústria alimentícia, bebidas e energético (FAO, 2018).

De acordo com o último levantamento da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), em 2018 a produção mundial de raiz de mandioca correspondeu a 277,8 milhões de toneladas, em uma área de cerca de 24,59 milhões de hectares (FAOSTAT, 2020). O Brasil possui uma produção de 17,64 milhões de toneladas de raízes, cultivada em uma área de cerca de 1,20 milhão de hectares, sendo considerado o quinto produtor mundial, superado apenas pela Nigéria, Tailândia, República Democrática do Congo e Gana. Além disso, é considerado um importante centro de diversificação do gênero (ALLEM, 2002), o que garante ao país posição de destaque no cenário internacional em relação à maior variabilidade dos recursos genéticos do gênero *Manihot*.

Apesar do destaque na produção mundial, a expansão da mandiocultura possui entraves associados à baixa produtividade de raízes em comparação com o potencial da cultura, em decorrência do uso de variedades não melhoradas, e a ocorrência de estresses de origem abiótica, como a deterioração fisiológica pós-colheita e estresse hídrico (VENTURINI et al., 2015). De origem biótica, existem diversas doenças associadas a fungos, bactérias e vírus que comprometem severamente a produtividade da mandioca (MCCALLUM et al., 2017).

Entre as doenças mais destrutivas da cultura estão às podridões radiculares, sobretudo devido ao caráter contínuo (permanência dos agentes causais na área de cultivo, mesmo na ausência do hospedeiro) e devastador destas enfermidades. A importância econômica das podridões vem aumentando nos principais países produtores, por provocar queda progressiva na produtividade, com relatos de perdas de 37% na produtividade de raízes, mesmo em variedades melhoradas com algum nível de resistência (AFOLABI et al., 2011), podendo chegar a 100% de perda quando se utiliza variedades suscetíveis (ONYEKA et al., 2005), inviabilizando ciclos subsequentes da cultura. Também existem relatos de interferência na qualidade das raízes no momento da colheita, tornando-as impróprias para o consumo e/ou processamento (ONANA et al., 2015; CHILAKA et al., 2018).

As podridões radiculares da mandioca estão relacionadas a diferentes espécies de fitopatógenos e seus sintomas diferem dependendo da espécie associada (VILAS BOAS et al.,

2016). No Brasil, a podridão seca está associada a fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* e da espécie *Macrophomina pseudophaseolina*; a podridão mole à oomicetos dos gêneros *Phytophthora*, *Pythium* e *Phytopyhtium*; e a podridão negra está associada a espécies da família Botryosphaeraeaceae, como *Lasiodiplodia euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. parva*, *L. theobromae*, *L. brasiliense*, *L. caatinguensis*, *L. iraniensis*, *L. laeliocattleyae*, *L. pseudotheobromae* e *Neoscytalidium dimidiatum* (MACHADO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016; VILAS-BOAS et al., 2017; BOARI et al., 2018; BRITO et al., 2019; BRITO et al., 2020).

Apesar das hastes também apresentarem sintomas, o principal tecido afetado são as raízes, e por isso, existe dificuldade de reconhecimento da doença por parte dos produtores (AKROFI et al., 2018), já que, dependendo do patógeno, as plantas podem se manter assintomáticas por longos períodos, sendo em muitas situações identificada somente no momento da colheita. A planta de mandioca possui um sistema radicular que pode camuflar o efeito da podridão, e com isso dificultar o diagnóstico e monitoramento do desenvolvimento das epidemias, e por consequência, seu manejo (MSIKITA et al., 2005; BANDYOPADHYAY et al., 2006).

Práticas de controle integradas devem ser utilizadas para um manejo efetivo e sustentável da doença. Algumas medidas de controle para o plantio da mandioca em áreas infestadas por patógenos causadores de podridões radiculares envolvem o uso de microrganismos antagônicos (BARROS et al., 2014) e a supressividade do solo com uso de matéria orgânica (SILVA et al., 2017), além de estudos com extrato etanólico do capim-limão (JOHN et al., 2019) e solo com cultivo consorciado (MEDEIROS et al., 2019). Entretanto, o principal pilar deste manejo tem sido associado ao uso de variedades resistentes, uma vez que é a estratégia de manejo mais efetiva, mais econômica, de baixo impacto ambiental e fácil adoção pelos produtores (ONYEKA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013; AWOYEMI et al., 2016; VILAS BOAS et al., 2016).

Contudo, relatos da presença de mais de um gênero de fitopatógenos em uma mesma área de cultivo (MSIKITA et al., 2005; BANDYOPADHYAY et al., 2006; BUA; OKELLO, 2011; AFOLABI et al., 2011; VILAS BOAS et al., 2016; AWOYEMI et al., 2016; ZINSOU et al., 2017, BRITO et al., 2020) tornam complexo o desenvolvimento de variedades de mandioca resistentes à podridão radicular. Há diferentes regiões genômicas associadas à resistência para cada espécie relacionada à doença (BRITO et al., 2017), e a identificação dos patógenos presentes na área de seleção é fundamental para a indicação de variedades com ampla resistência.

As variedades ‘BRS Kiriris’ e ‘BRS Aramaris’ (sin= Cigana Preta), por exemplo, foram selecionadas no Nordeste brasileiro, como fontes de resistência à podridão de raízes, por meio da seleção em áreas propensas à ocorrência da podridão radicular na região dos tabuleiros costeiros no nordeste do país (FUKUDA et al., 2002), porém não se sabe ao certo se são variedades resistentes a todos os grupos de patógenos ou a um grupo específico, considerando comportamentos variados em locais diferentes daqueles onde as variedades foram selecionadas.

Atualmente, o *screening* de germoplasma na busca por fontes de resistência à podridão radicular tem sido realizado por meio da metodologia *in vitro* de raízes destacadas (OLIVEIRA et al., 2013; VILAS-BOAS et al., 2016). Embora a inoculação artificial em condições controladas permita obter classificações bem definidas dos genótipos quanto à suscetibilidade/resistência, a correlação destas informações com a resistência em campo é baixa. Uma das hipóteses para explicar esta falta de associação entre os estudos *in vitro* e a resistência em campo é o fato de que as plantas em campo interagem com uma grande variedade de microorganismos, diferentes condições climáticas e as propriedades físico-químicas do solo que podem influenciar processos metabólicos em princípio controlados nas inoculações *in vitro* (WILLE et al., 2018, SANTIAGO et al., 2018).

Avaliações do desempenho em áreas com histórico de altos níveis de doenças contribuem de forma significativa para identificação de parentais com elevada resistência genética ou mesmo genótipos para uso per se em ambientes com histórico de ocorrência da podridão radicular (ONYEKA et al., 2005; AWOYEMI et al., 2016). Embora a fenotipagem em campo possua custo elevado, essa abordagem permite uma seleção mais direta e consistente, visto que é possível avaliar um maior número de genótipos concomitantemente, excluir de imediato aqueles altamente suscetíveis, como também realizar a seleção considerando as características agronômicas de interesse para os ambientes alvo da recomendação (SUMMERS; BROWN, 2013). O objetivo deste estudo foi avaliar genótipos de mandioca, incluindo genótipos de germoplasma, variedades locais (landraces) e híbridos melhorados quanto à resistência à podridão radicular em condições de campo com histórico da doença e com alto potencial de inóculo, em dois anos de avaliação (2014-2015 e 2016-2017) e identificar possíveis regiões genômicas associadas à resistência em campo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos para avaliação da resistência à podridão radicular foram conduzidos no campo experimental da Embrapa Tabuleiros Costeiros na cidade de Umbaúba, Estado de Sergipe (11°22'37.9"S, 37°40'29.6"W), em dois anos agrícolas de 2014-2015 e 2016-2017, em

área de ocorrência natural da doença. Por meio de métodos morfológicos e moleculares foram identificados 71 isolados provenientes de 16 amostras de solo coletadas em diferentes pontos do campo experimental. Houve uma prevalência relativa em termos de frequência de isolamento igual a 77% de fungos do gênero *Fusarium* sp., 8% de fungos do gênero *Lasiodiplodia* sp. e 14% de outros fungos não patogênicos, constatando a presença de mais de uma espécie na área.

2.1. Paineis de fenotipagem e genotipagem

Foram avaliados 148 genótipos de germoplasma pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca (BAG-Mandioca) da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, Bahia). Fazem parte deste conjunto de genótipos: quatro clones elite (9975-01, 16-07, 2002-01-01, 9655-02), onze variedades melhoradas ('BRS Aipim Brasil', 'BRS Aramaris', 'BRS Caipira', 'BRS Dourada', 'BRS Formosa', 'BRS Gema de Ovo', 'BRS Kiriris', 'BRS Poti Branca', 'BRS Tapioqueira', 'BRS Verdinha' e 'IAC-90'), bem como sete variedades crioulas (Cascuda, Eucalipto, Fécula Branca, Iará, Mani Branca, Olho Junto e Salangor).

Os ensaios foram arranjados em delineamento em blocos ao acaso (DBC) com 6 blocos e 5 plantas de cada genótipo por parcela. O espaçamento utilizado foi de 0,90 m entre linhas e 0,80 m entre plantas. O campo foi mantido livre de ervas daninhas pela remoção manual e os tratamentos culturais foram realizados de acordo com recomendações da cultura. A colheita foi realizada manualmente aos 10 meses após o plantio, em cada um dos dois ciclos de cultivo.

2.2. Fenotipagem para resistência à podridão radicular e performance agrônômica em solos infestados com os patógenos

A avaliação da severidade da podridão foi realizada por meio da análise visual dos sintomas na parte aérea da planta. Um total de 14 avaliações foram realizadas. A primeira mensuração foi realizada aos 15 dias após o plantio (DAP), sendo sete avaliações posteriores com intervalo semanal; seguido de quatro avaliações quinzenais e por fim, três avaliações em intervalos de 30 dias. As plantas foram avaliadas com base em escala de notas (0 a 4) formulada a partir da dinâmica da doença em campo, sendo '0' ausência de sintomas e '1' amarelecimento e murcha do terço inferior; "2" amarelecimento e murcha do terço inferior e médio; "3" amarelecimento e murcha de toda a planta e "4" morte da planta. Os dados obtidos a partir da escala de notas foram convertidos em índice de doença (ω), de acordo com Czermaink (1999) e utilizados para calcular a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), conforme Campbell; Madden (1990). A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi

estimada pela fórmula: $AACPD = \Sigma[(y_1+y_2)/2]*(t_2-t_1)$, onde y_1 e y_2 , refere-se aos valores do índice de doença (ω) das duas avaliações sucessivas realizadas nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente.

No momento da colheita foi realizada a avaliação dos caracteres agronômicos. Para isso, todas as cinco plantas de cada parcela foram utilizadas, sendo mensuradas as seguintes características: (i) sobrevivência: expresso em percentual de plantas vivas; (ii) altura de plantas: mensurada em metros; (iii) produtividade de parte aérea: mensurado em $t\ ha^{-1}$ e (iv) produtividade total de raízes: mensurado em $t\ ha^{-1}$.

2.3. Análise dos dados agronômicos e de resistência à podridão radicular

Análise via modelos mistos

A análise dos dados fenotípicos foi realizada por meio de modelos lineares mistos. Para isso, foram obtidos os melhores preditores lineares não-viesados (BLUPs) para cada genótipo, combinando os dados dos dois anos, utilizando o seguinte modelo misto $y_{ijk} = \mu + g_i + e_i + (ge)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, em que y_{ijk} é a variável resposta, da k^{th} repetição do i^{th} genótipo do j^{th} ano de avaliação; μ é a média geral do experimento; g_i é o efeito aleatório do i^{th} genótipo; e_i é o efeito fixo do j^{th} ano de avaliação; $(ge)_{ij}$ é o efeito da interação do i^{th} genótipo do j^{th} ano de avaliação, e ε_{ijk} é o erro experimental associado com a ijk^{th} observação.

Análises de correlação e agrupamento

Com base nos BLUPs, estimou-se a correlação de Pearson, com auxílio do pacote “GGally”; a análise de agrupamento utilizando os pacotes “cluster”, “fpc” e “mclust”; a análise de componentes principais (PCA), utilizando os pacotes “factoextra”, “devtools” e “FactoMineR”; e a distribuição comparativa (boxplot), por meio do “ggpubr”. Todos os pacotes estão implementados no software R versão 3.6.3 (R CORE DEVELOPMENT TEAM, 2020).

Os dados da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foram submetidos à análise de variância pelo teste de F e as diferenças entre as médias, quando significativas, foram comparadas pelos testes de ScottKnott, ao nível de 5% de significância, utilizando o pacote “laercio”, e os gráficos foram construídos com auxílio do “ggplot2”, também implementados no software R versão 3.6.3 (R CORE DEVELOPMENT TEAM, 2020).

Índice de seleção

Para selecionar os genótipos com melhor desempenho em campo infestado por podridão

radicular, foi empregado o índice de Mulamba e Mock (1978), que inicialmente hierarquiza os genótipos para cada característica, por meio da atribuição de valores absolutos mais elevados àqueles de melhor desempenho. Em seguida, os valores atribuídos a cada característica são somados, obtendo-se a soma dos *ranks* que representa a classificação dos genótipos. Foram fornecidos diferentes pesos para as características avaliadas, conforme o interesse agrônomo associado à resistência, onde o índice de seleção foi obtido como: $IS = (PH * 1) + (ShY * 3) + (FRY * 5) + (DI * -5) + (Su * 5)$, em que *PH* é a altura das plantas, *ShY* é a produtividade da parte aérea, *FRY* é a produtividade de raízes, *DI* é o índice de doença e *Su* é a sobrevivência dos clones. Os ganhos esperados com a seleção (GS) foram obtidos considerando a média do grupo em comparação com a média da população original.

2.4. Mapeamento associativo

Extração de DNA e genotipagem

O DNA foi extraído a partir de folhas jovens, de acordo com o protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) conforme descrito por Doyle and Doyle (1987). A qualidade do DNA foi avaliada por quantificação em gel de agarose 1,0% (p/v) corado com brometo de etídio (1,0 mg/L) em tampão TBE 0,5 x (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA e q.s.p de água destilada), visualizado em luz UV e registrado com o fotodocumentador Gel Logic 212 Pro (Carestream Molecular Imaging, New Haven, USA) por comparação visual com uma série de concentrações de DNA conhecido do fago Lambda (Invitrogen, Carlsbad, CA). O DNA foi diluído em tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM) para uma concentração final de 60 ng/μL e a qualidade foi verificada pela digestão de 250 ng do DNA genômico a partir de 10 amostras aleatórias com a enzima de restrição *EcoRI* (New England Biolabs, Boston, EUA) a 65 °C durante duas horas e posteriormente, visualizada em gel de agarose.

As amostras de DNA foram genotipadas utilizando o protocolo básico da *genotyping-by-sequencing* (GBS) descrito por Elshire et al. (2011), no qual o DNA foi digerido pela enzima *ApeKI* recomendada por Hamblin; Rabbi (2014), uma endonuclease de restrição tipo II que reconhece uma sequência degenerada de 5 bases (GCWGC, onde W é A ou T) com comprimentos de 100 pb. A ligação entre os fragmentos com corte *ApeKI* e o adaptador, foi realizada após a digestão das amostras e implementação de sistema multiplex com 192 amostras para realização do sequenciamento. A GBS foi realizada utilizando o *Genome Analyzer 2000* (Illumina, Inc., San Diego, CA).

O controle de qualidade envolveu a remoção de dados ausentes em mais de 20% dos loci, menor frequência alélica <0,01 por loci, e remoção de indivíduos com mais de 80% de

dados perdidos por cromossomo. Com isso, foram identificadas um total de 27.045 SNPs bialélicos com uma correlação alélica $\geq 0,8$. A cobertura média de SNPs foi de 1.503 marcadores por cromossomo.

Estrutura populacional e análise de associação genômica

A análise de associação dos dados de resistência à podridão radicular, bem como dos atributos produtivos sob condições de campo infestado com patógenos da podridão radicular foi realizado com base nos métodos *general linear model* (GLM) tendo como covariáveis a análise componentes principais (PCA) como efeito fixo para explicar a estrutura da população; *mixed linear model* (MLM) com estrutura populacional (PCA) e matriz de parentesco incluídos como covariáveis; e *fixed and random model circulating probability unification* (FarmCPU) tendo estrutura populacional (PCA) e matriz de parentesco como covariáveis, além de algoritmos adicionais para resolução de problemas de confusão entre marcadores teste e covariáveis. Todos os modelos foram implementados com auxílio do pacote rMVP (YIN et al., 2020).

Para controlar a presença de falsos positivos causados pela estrutura população populacional, os cinco primeiros componentes principais foram ajustados como covariáveis no modelo. A matriz de parentesco genômico entre os genótipos de mandioca foi obtida de acordo com vanRaden (2008), na qual $U = \frac{ZZ'}{2 \sum \rho_i (1 - \rho_i)}$ em que $Z = M - P$, sendo M a matriz dos marcadores e P a matriz das frequências alélicas expressas por $2(\rho_i - 0,5)$. Esta matriz de parentesco foi combinada com a estrutura populacional para controlar a ocorrência de erros Tipo I. O limite para identificar associações significativas entre os SNPs e os fenótipos foram estimadas pelo teste Bonferroni ($p < 0,05$).

SNPs significativos foram localizados no genoma de referência da mandioca v6.1 (BREDESON et al., 2016) depositado no banco de dados do Phytozome v11.0 pela ferramenta JBrowse (GOODSTEIN et al., 2012). A anotação funcional de todos os genes foi identificada pela ferramenta *PhytoMine* do Phytozome v11.0 (GOODSTEIN et al., 2012).

3. RESULTADOS

3.1. Correlação entre parâmetros agronômicos e de resistência à podridão radicular

De modo geral, todos os coeficientes de correlação foram significativos (Figura 1). O índice de doença (ω) apresentou uma associação linear negativa com as demais variáveis, com

consequente alta correlação negativa com a sobrevivência das plantas em campo (-93%), bem como para produtividade de raízes e da parte aérea (-76 e -74%, respectivamente). Também foi observada correlação negativa moderada entre o índice de doença \times altura de planta (-34%). Esse resultado evidencia que a severidade da doença afeta severamente a performance agrônômica da maioria dos genótipos de mandioca e, conseqüentemente, a competitividade das lavouras.

Em contrapartida, houve uma correlação elevada e positiva entre a sobrevivência e características como produtividade da parte aérea (81%) e de raízes (79%), bem como uma alta correlação entre produtividade da parte aérea e de raízes (79%). Portanto, a sobrevivência dos clones durante todo o ciclo da cultura é um componente de fundamental importância, para avaliar a resistência genética à podridão radicular, considerando sua maior produtividade da parte aérea e de raiz.

As correlações entre altura de plantas e as demais características foram de magnitude moderada; isto é, 41% com a sobrevivência das plantas, 35% com a produtividade de raízes e 47% com a variável produtividade da parte aérea. Indicando que plantas com elevada estatura não necessariamente resultam em maior produtividade da parte aérea ou de raízes.

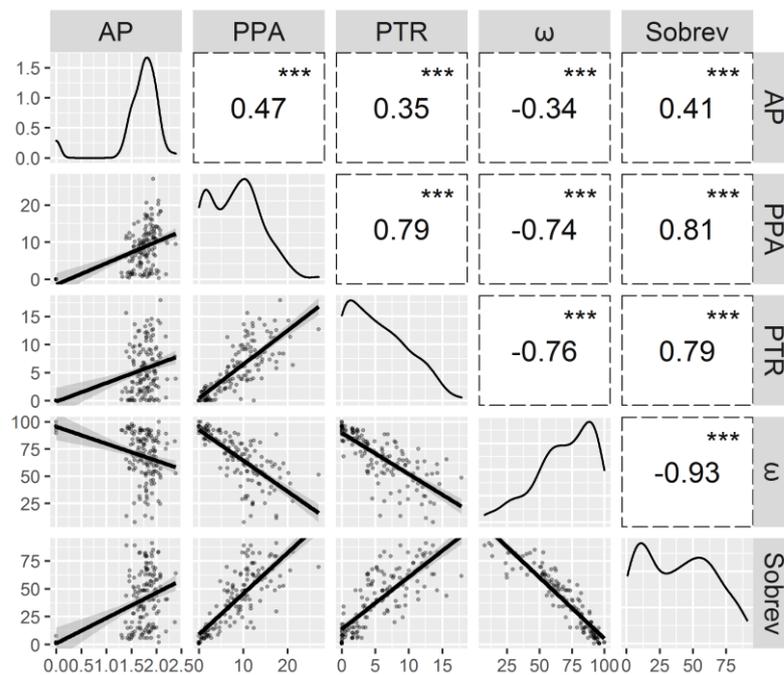


Figura 1. Correlação de Pearson entre quatro características agrônômicas oriundas da avaliação de 148 genótipos de mandioca submetidos a cultivo em área infestada por podridão radicular. AP: altura de planta. PPA: peso de parte aérea ($t\ ha^{-1}$). PTR: produtividade de raízes ($t\ ha^{-1}$). (ω): índice doença e Sobrev: sobrevivência. Nível de significância α : *** = 0.001; ** = 0.01.

3.2. Agrupamento dos dados agronômicos e de resistência à podridão radicular

Os 148 genótipos foram agrupados em cinco grupos com base na AACPD (Figura 2), cujo número de genótipos por grupo foi de nove ('G3'), 24 ('G4'), 35 ('G2'), 36 ('G1') e 44 ('G5'). Todos os grupos foram compostos por genótipos que apresentaram sintomas característicos da doença, como murcha e amarelecimento das folhas, e em casos mais extremos, genótipos que não enraizaram, em um período médio entre 15 e 38 dias após o plantio, e foram consideradas plantas mortas. Observou-se que os maiores danos foram apresentados a partir de 45 dias após o plantio e que os sintomas, na parte aérea, apresentaram uma tendência de estabilização a partir dos 180 dias. Os grupos 'G3' e 'G5' apresentaram os maiores índices de doença em todas as avaliações, seguidos pelo 'G1', 'G2' e por fim, o 'G4' (Figura 2 - A).

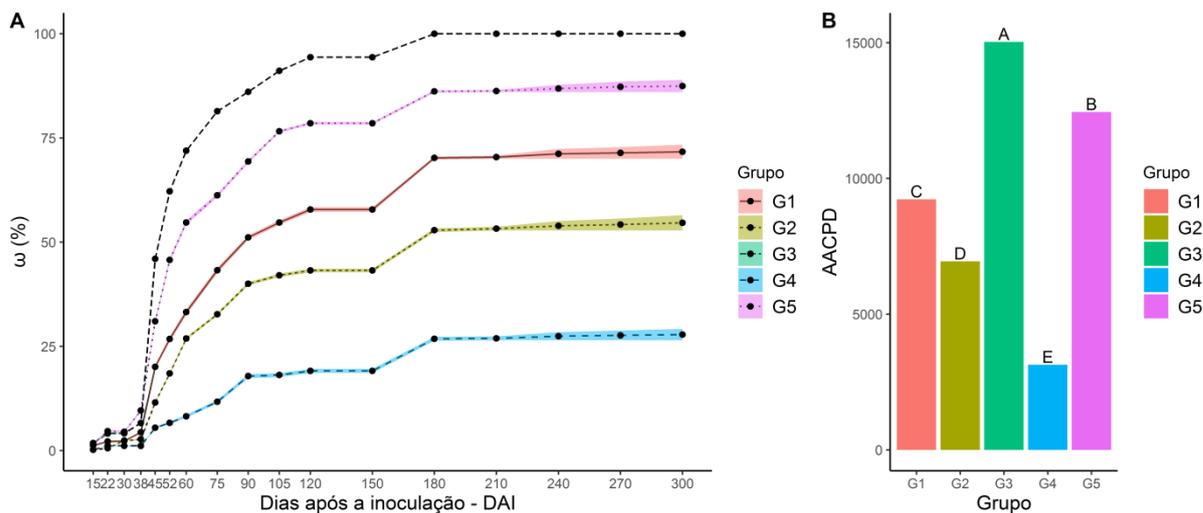


Figura 2. Valores médios do índice de doença (ω) e área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD) dos cinco grupos formados pela análise de agrupamento dos 148 genótipos de mandioca avaliados em área infestada por podridão radicular, entre 15 e 210 dias após o plantio. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

A comparação de média dos valores da AACPD demonstrou que houve variação no progresso da doença, com uma diferença significativa entre os cinco grupos avaliados quanto à resistência à podridão radicular em condições de campo (Figura 2 - B). Portanto, estes grupos foram classificados quanto ao nível de resistência à podridão radicular com base na severidade dos sintomas. Os grupos 'G3' e 'G5' apresentaram os maiores valores de AACPD, indicando um progresso mais rápido da doença durante o período de avaliação, desse modo foram classificados como "Extremamente Suscetível (ES)" e "Suscetível (S)", respectivamente. O

grupo ‘G1’ foi classificado como “Moderadamente Suscetível (MS)”, o ‘G2’ como “Moderadamente Resistente (MR)” e o ‘G4’, com o menor valor de AACPD, foi classificado como “Resistente (R)”.

Com relação à análise de componentes principais (PCA), os dois primeiros componentes principais captaram 88,6 % da variação total associado aos dados de altura da planta, produtividade de raízes e parte aérea, índice de doença e sobrevivência (Figura 3), o que indica boa capacidade de representação da diversidade genética dos genótipos de mandioca quanto à resistência à podridão radicular em condições de campo. Assim como na correlação de Pearson, pode-se verificar através da análise de componentes principais que o índice de doença foi negativamente correlacionado com as demais variáveis, principalmente com a sobrevivência. Do mesmo modo, as características sobrevivência, produtividade da parte aérea e de raízes possuem forte correlação positiva. Entretanto, a altura de plantas, apesar de correlacionada de forma positiva com a sobrevivência, produtividade da parte aérea e de raízes, praticamente se comportou como uma variável independente.

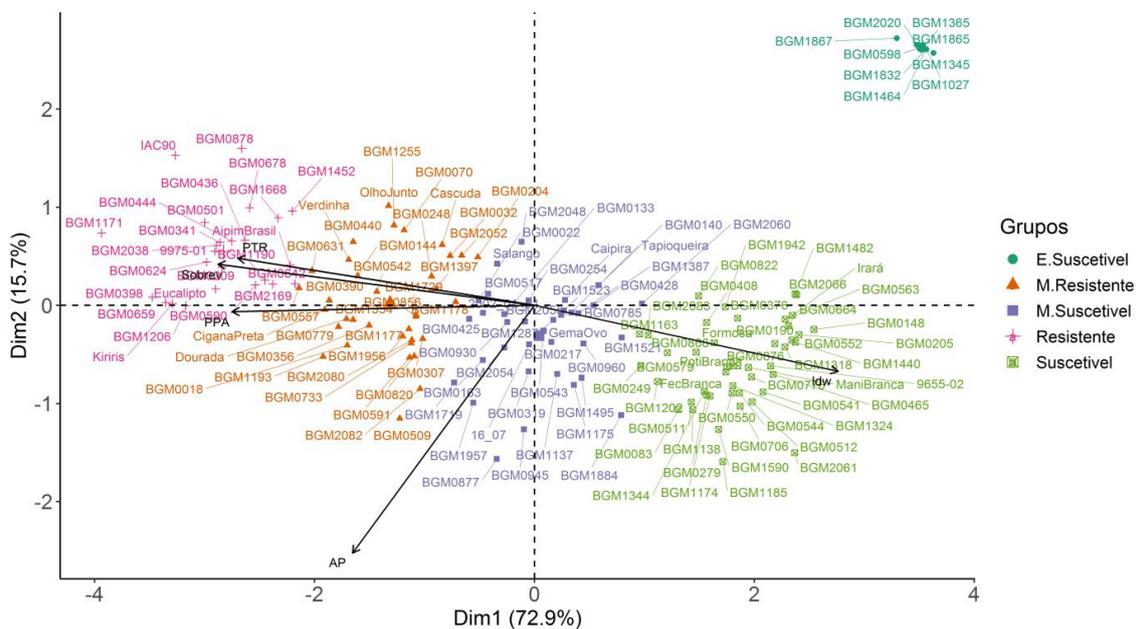


Figura 3. Análise de componentes principais (PCA) para características agrônômicas e de resistência à podridão radicular em 148 genótipos de mandioca cultivados em área infestada com a doença. AP: altura de plantas (m). PPA: peso de parte aérea (t ha⁻¹). PTR: produtividade de raízes (t ha⁻¹). (ω): índice de doença e Sobrev: sobrevivência.

3.3. Classificação dos genótipos quanto à resistência à podridão radicular

Os genótipos pertencentes ao grupo considerado 'Extremamente Suscetível – G3' (nove genótipos) apresentaram os menores valores de sobrevivência (1,97%), bem como maiores valores de índice de doença (ω médio = 95,11%), e obviamente sem avaliação para atributos agronômicos (Tabela 1). Em seguida, o grupo 'Suscetível – G5', com 44 genótipos, apresentou o segundo menor valor de sobrevivência (12,63%), assim como a segunda maior média de índice de doença (89,70%) e valores para altura da planta (1,70m), produtividade da parte aérea (2,51 t ha⁻¹) e produtividade de raízes (1,25 t ha⁻¹) em comparação com os demais grupos, indicando sua alta suscetibilidade à podridão radicular. Entre esses genótipos, estão clones e variedades melhoradas (9655-02, 'BRS Formosa' e 'BRS Poti Branca'), assim como variedades locais (Fécua Branca, Iará e Mani Branca).

O grupo considerado 'Moderadamente Suscetível – G1' foi composto por 36 genótipos. Os genótipos pertencentes a este grupo apresentaram valores intermediários de altura de plantas (1,79m), produtividade da parte aérea (em torno de 8,8 t ha⁻¹) e de raízes (em torno de 5,0 t ha⁻¹), porém o terceiro maior índice de doença (73,87 %) e sobrevivência abaixo de 40%. Entre esses genótipos, estão clones e variedades melhoradas ('BRS Caipira', 'BRS Gema de Ovo', 'BRS Tapioqueira', 2002-01-01 e 2002-16-07) e a variedade local Salangor.

De maneira geral, os genótipos pertencentes a estes três grupos apresentaram sintomas característicos da doença nas plantas ainda no estágio inicial de desenvolvimento e a infecção acarretou sua morte durante a emergência dos brotos ou até 40 dias após o plantio. Portanto, nenhum dos clones e variedades pertencentes a esses grupos são indicados para plantio em áreas com histórico da doença.

O grupo 'Moderadamente Resistente – G2', formado por 35 genótipos, apresentou a maior média de altura de planta (1,83m), e a segunda maior média de sobrevivência (56,74%), produtividade média da parte aérea de 12,0 t ha⁻¹ e de raízes em cerca de 8,0 t ha⁻¹, além de um índice de doença mediano (ω médio = 57,57). Fazem parte deste grupo as variedades locais 'Cascuda', 'BRS Aramaris' (sin = 'Cigana Preta') e 'Olho Junto', bem como as variedades melhoradas 'BRS Dourada' e 'BRS Verdinha'.

Os 24 genótipos do grupo "Resistente – G4" apresentaram a maior média de altura de planta (1,83m) (não diferindo do grupo 'M. Resistente' para esta característica), bem como a maior média de sobrevivência (76,80%), o menor índice de doença (ω médio = 33,13), maior produtividade média da parte aérea (15,0 t ha⁻¹) e de raízes (11,5 t ha⁻¹). Estão nesse grupo as variedades melhoradas 'BRS Aipim Brasil', 'IAC-90', 'BRS Kiriris' e o clone 9975-01, e a

variedade local 'Eucalipto'. Apesar da existência de genótipos promissores para características agronômicas de interesse, nenhum genótipo foi totalmente imune à podridão radicular.

Tabela 1. Médias de sobrevivência, índice de doença, altura de planta, produtividade da parte aérea e de raízes dos grupos formados pela análise de agrupamento, além do ganho de seleção (GS%) esperado em comparação com a população original.

Grupo	Sobrevivência (%)			
	Mínimo	Máximo	Média	GS%
M. Suscetível - G1	14.74	56.65	37.66	-3.21
M. Resistente - G2	35.16	73.24	56.74	45.85
E. Suscetível - G3	0.83	7.56	1.97	-94.94
Resistente - G4	59.87	90.88	76.80	97.40
Suscetível - G5	1.75	34.21	12.63	-67.55
População original	0.83	90.88	38.90	
Grupo	Índice de Doença (%)			
	Mínimo	Máximo	Média	GS%
M. Suscetível - G1	57.47	88.57	73.87	6.44
M. Resistente - G2	29.47	75.17	57.57	-17.05
E. Suscetível - G3	89.59	100.00	95.11	37.03
Resistente - G4	7.80	52.88	33.13	-52.27
Suscetível - G5	78.94	100.00	89.70	29.24
População original	7.80	100.00	69.41	
Grupo	Altura de Plantas (m)			
	Mínimo	Máximo	Média	GS%
M. Suscetível - G1	1.46	2.37	1.79	7.06
M. Resistente - G2	1.40	2.39	1.83	9.53
E. Suscetível - G3	0.00	0.00	0.00	-
Resistente - G4	1.40	2.08	1.83	9.41
Suscetível - G5	1.30	2.19	1.70	1.97
População original	0.00	2.39	1.67	
Grupo	Produtividade da parte aérea (t ha ⁻¹)			
	Mínimo	Máximo	Média	GS%
M. Suscetível - G1	4.82	17.44	8.79	7.33
M. Resistente - G2	6.30	19.03	12.08	47.55
E. Suscetível - G3	0.00	0.00	0.00	-
Resistente - G4	9.79	27.03	15.08	84.24
Suscetível - G5	0.30	8.07	2.51	-69.32
População original	0.00	27.03	8.19	

Grupo	Produtividade de raízes (t ha ⁻¹)			
	Mínimo	Máximo	Média	GS%
M. Suscetível - G1	0.02	9.11	4.97	-7.38
M. Resistente - G2	3.78	15.64	8.16	51.90
E. Suscetível - G3	0.00	0.00	0.00	-
Resistente - G4	5.75	17.88	11.47	113.53
Suscetível - G5	0.01	3.56	1.25	-76.72
População original	0.00	17.88	5.37	

Além da maior resistência à podridão radicular, os genótipos do grupo 'Resistente - (G4)' também apresentaram a melhor performance agrônômica em condições de solo infestado com patógenos causadores da doença. Portanto, para auxiliar na escolha de potenciais parentais para o desenvolvimento de progênes segregantes no programa de melhoramento genético de mandioca, foi realizada uma seleção com base na soma dos rankings dos genótipos para cada uma das características avaliadas, com base nos BLUPs fenotípicos dos dez melhores genótipos (Top-10), dentro dos 24 que compunham este grupo (Tabela 2).

Foi realizada a comparação das médias, pelo Teste t, entre os cinco grupos da análise de agrupamento e o grupo "Top-10", bem como a distribuição das variáveis numéricas entre os seis grupos (Figura 4). Para a altura da planta, a média do grupo "Top-10" diferiu estatisticamente dos demais grupos. Entretanto, para produtividade da parte aérea, produtividade de raízes, índice de doença e sobrevivência, não houve diferença estatística somente para as médias do grupo "Resistente". Portanto, os valores médios dos genótipos pertencentes a estes grupos foram superiores ao restante dos genótipos para todos os caracteres agrônômicos de interesse. Contudo, ao comparar a distribuição das características entre os "Top-10" e o grupo "Resistente", verificou-se que para produtividade da parte aérea e de raízes, o "Top-10" apresentou maior mediana que o grupo "Resistente". Além disso, o "Top-10" também apresentou uma menor dispersão entre os quartis para produtividade de raízes. Entretanto, o grupo "Resistente" apresentou uma menor mediana para o índice de doença (ω), indicando que os genótipos, no geral, tiveram menores notas para severidade da doença. Assim como para sobrevivência em campo, o grupo "Resistente" apresentou uma menor dispersão nos quartis e uma mediana um pouco mais elevada.

Houve elevado ganho genético médio com a seleção dos 10 melhores genótipos para a maioria das características avaliadas, em comparação com a população original (Tabela 2). Os ganhos esperados com a seleção dos "Top-10" foi de 115,63 % para produtividade de parte aérea, 139,69 % para produtividade de raiz, 17,45% para altura de planta, 92% para

sobrevivência das plantas em campo e redução da severidade da podridão radicular em 42,31%. Dentro dos “Top-10”, o genótipo BGM-1171 foi o que apresentou o menor índice de doença e a maior sobrevivência em campo infestado. A variedade ‘BRS Kiriris’ apresentou a maior produtividade de raízes, seguida da variedade local “Eucalipto”, que também apresentou a maior altura de planta, enquanto o genótipo BGM-0398 apresentou a maior produtividade da parte aérea. Portanto, esses genótipos são potenciais parentais a serem recombinados e utilizados para as próximas etapas do programa de melhoramento.

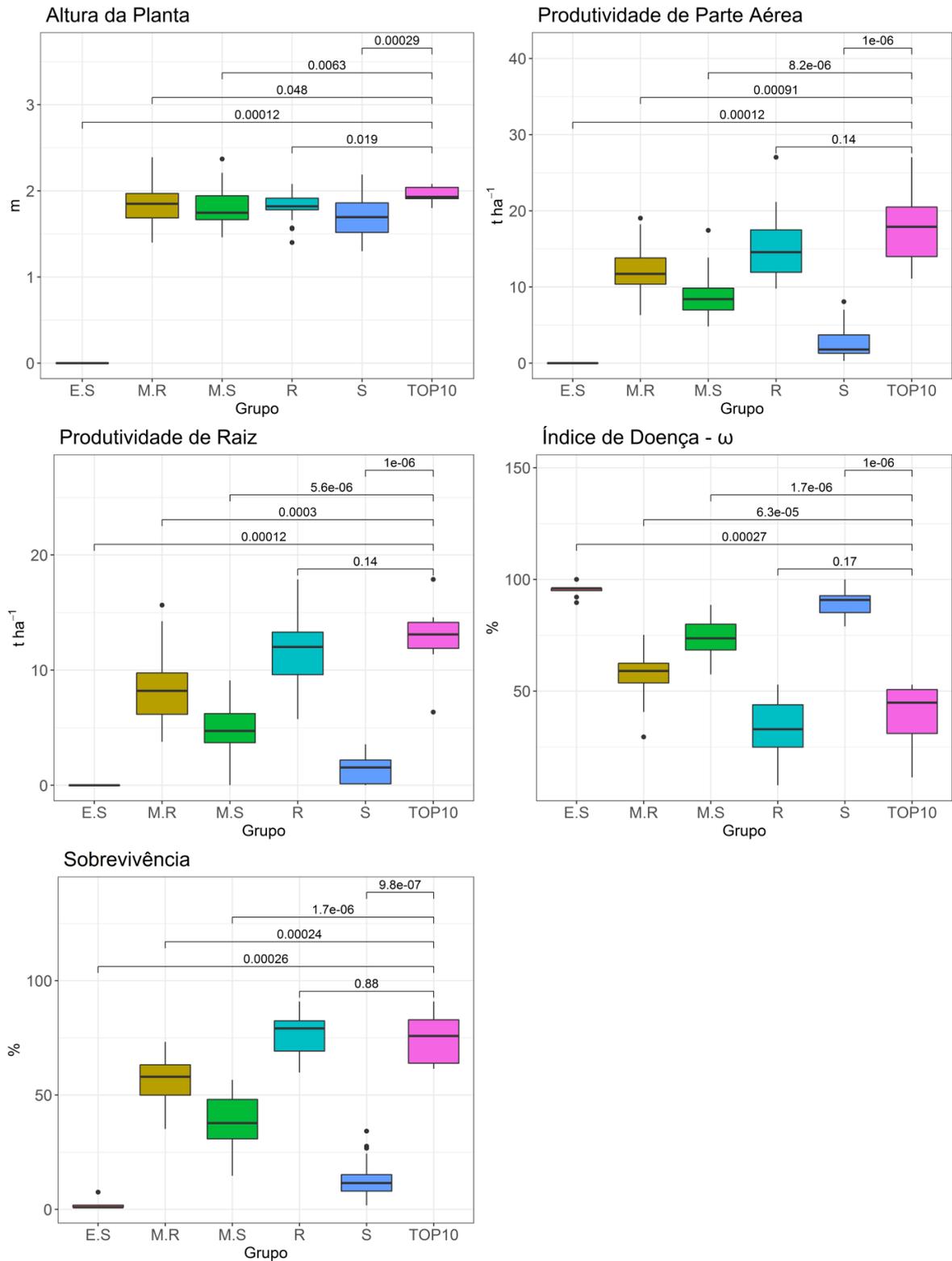


Figura 4. Boxplot dos agrupamentos formados com base nas características altura de plantas, produtividade da parte aérea e de raízes, sobrevivência e índice de doença (ω), avaliados em 148 genótipos de mandioca plantados em campo infestado com podridão radicular. ES: Extremamente Suscetível; S: Suscetível; M.S: Moderadamente Suscetível; M.R: Moderadamente Resistente; R: Resistente.

Tabela 2. Médias do índice de doença (ω), sobrevivência (Sobrev), altura de planta (AP), produtividade da parte aérea (PPA) e das raízes (PTR) com a seleção dos dez melhores genótipos pelo índice seleção, além do ganho de seleção (GS%) esperado em comparação com a população original.

Top10		Parâmetros									
Sum. Rk (MM)	Clone	ω (%)	GS (%)	Sobrev (%)	GS (%)	AP (m)	GS (%)	PPA (t ha ⁻¹)	GS (%)	PTR (t ha ⁻¹)	GS (%)
1	BGM1171	11.37	-83.62	90.88	133.60	1.91	14.68	17.49	113.61	12.56	133.92
1	BRS Kiriris	48.65	-29.90	61.48	58.03	2.08	24.60	18.31	123.74	17.88	232.89
1	BGM0659	52.88	-23.81	82.44	111.90	2.04	21.97	20.22	146.99	14.26	165.56
2	Eucalipto	24.62	-64.54	63.10	62.19	2.08	24.49	12.08	47.58	13.81	157.08
3	BGM0398	51.34	-26.03	69.55	78.76	1.93	15.78	27.03	230.17	12.71	136.70
4	BGM1206	27.05	-61.03	83.04	113.45	2.04	22.12	21.16	158.51	6.36	18.40
5	BGM0624	42.82	-38.30	82.06	110.93	1.91	14.16	13.71	67.50	14.59	171.76
6	BGM2169	52.10	-24.94	63.10	62.19	1.88	12.88	14.82	81.07	13.50	151.41
7	BGM1190	46.40	-33.15	85.00	118.49	1.93	15.84	11.10	35.58	11.67	117.26
8	BGM0209	43.16	-37.82	66.32	70.47	1.80	8.00	20.59	151.59	11.38	111.91
	Mínimo	11.37		61.48		1.80		11.10		6.36	
	Máximo	52.88		90.88		2.08		27.03		17.88	
	Média	40.04	42.31	74.70	92.00	1.96	17.45	17.65	115.63	12.87	139.69
	População Original	69.41		38.90		1.67		8.19		5.37	

As estimativas de parentesco genômico, com base nos marcadores SNPs entre todos os pares de genótipos de mandioca pertencentes ao grupo “Top-10”, apresentaram variação de -0.183 a 0.671 com média de $-0,00046$ (Figura 5). Os valores negativos de parentesco genômico indicam pares de indivíduos que compartilham poucos alelos em comparação ao esperado com base nas suas frequências alélicas. As maiores estimativas de parentesco genômico observadas foram entre os genótipos BGM-0209 \times BGM-0398 ($0,671$), BGM-1206 \times BRS Kiriris ($0,346$), BGM-0659 \times BGM-0209 ($0,282$) e o BGM-0659 \times BGM-0398 ($0,277$), bem como entre BGM-1171 \times BGM-1190 ($0,197$). Considerando a necessidade de maximização do potencial de ganhos de seleção, a realização de cruzamentos entre estes genótipos com alto grau de parentesco genômico deve ser evitada. Por outro lado, as combinações genotípicas mais contrastantes dentro do grupo “Top-10” foram entre os pares de genótipos o BGM-1171 \times BGM-0659 ($-0,183$), BGM-1171 \times Eucalipto ($-0,168$), BGM-1171 \times BGM-0209 ($-0,160$), BGM1171 \times BGM-0398 ($-0,155$), BGM-0624 \times BGM-0209 ($-0,147$), BGM-1190 \times BGM-0398 ($-0,119$), BGM-1190 \times BGM-0209 ($-0,115$) e BGM-1190 \times BGM-0659 ($-0,106$). Os genótipos BGM-1171 e BGM-1190 foram os que apresentaram os menores graus de parentesco com as demais fontes de resistência selecionadas e, portanto, são considerados potenciais parentais para melhoramento visando aumento da resistência à podridão radicular.

Além dos genótipos do grupo “Top-10” a matriz de parentesco genômico também incluiu 16 variedades elite e sete variedades locais de mandioca comumente utilizadas como parentais com alto valor genético para produtividade de raízes e amido. Neste caso, o foco seria selecionar parentais elite de mandioca com mínimo de parentesco genético com as fontes de resistência à podridão radicular e com isso maximizar as chances de obtenção de clones segregantes. Como resultado, as fontes de resistência BGM-0209, BGM-0398 e BGM-0659 apresentaram valores negativos de parentesco com 14 das 16 variedades elite de mandioca, sendo que as combinações genotípicas mais contrastantes para o BGM-0659 foram aquelas que envolveram as variedades BRS Verdinha ($-0,184$) e a IAC-90 ($-0,164$); enquanto que para o BGM-0209 o menor parentesco foi observado com as variedades a BRS Novo Horizonte ($-0,146$) e BRS Verdinha ($-0,135$). Por último, o menor parentesco genômico do genótipo BGM-0398 foi com as variedades BRS Novo Horizonte ($-0,142$) e BRS Aipim Brasil ($-0,128$).

Outras fontes de resistência à podridão radicular como BGM-0624, BGM-1206, BGM-1190 e BRS Kiriris também apresentaram valores negativos para estimativas de parentesco com outras 13 variedades elites. Para a variedade BRS Kiriris, as variedades elite com menor grau de parentesco genômico foram a BRS Caipira ($-0,126$) e BRS Mulatinha ($-0,119$); enquanto que para o genótipo BGM-0624 foi a BRS Aramaris ($-0,123$) e BRS Amansa Burro ($-0,114$).

Figura 5. *Heatmap* do parentesco genômico de dez fontes de resistência à podridão radicular da mandioca, 16 variedades elites e sete variedades locais de mandioca, com base na análise de 72.023 marcadores do tipo *Single-Nucleotide Polymorphism* (SNP).

Quando comparados com as variedades locais (Correntão, Aipim Abacate, Vassoura Preta, Cascuda, Olho Junto, Fécula Branca, Corrente), o genótipo BGM-0659 apresentou valores negativos de parentesco com todas as variedades, sendo as combinações mais contrastantes foram observadas com a Cascuda (-0,196) e Olho Junto (-0,195). Os genótipos resistentes BGM-2169 e BGM-1190 apresentaram baixo parentesco genômico com seis variedades locais de mandioca, sendo que os potenciais cruzamentos entre BGM-2169 × Cascuda (-0,127) e Olho Junto (-0,125), e entre BGM-1190 × Aipim Abacate (-0,106) e Correntão (-0,083) seriam promissores.

As fontes de resistência à podridão radicular (BGM-0209, BGM-0398, BGM-0624 e BRS Kiriris) apresentaram baixo grau de parentesco apenas com cinco variedades locais de mandioca, sendo que as combinações mais contrastantes seriam BRS Kiriris × Cascuda (-0,147) e Olho Junto (-0,146); BGM-0624 × Aipim Abacate (-0,133) e Correntão (-0,086); BGM-0209 × Fécula Branca (-0,113) e a Vassoura Preta (-0,083), e BGM-0398 × Fécula Branca (-0,112) e Cascuda (-0,084). Por outro lado, para as fontes de resistência BGM-1171, Eucalipto e BGM-1206 os cruzamentos com maior potencial de geração de populações segregantes seriam entre BGM-1171 × Correntão (-0,113) e Aipim Abacate (-0,106); Eucalipto × Olho Junto (-0,325) e a Cascuda (-0,316); BGM-1206 × Cascuda (-0,085) e Olho Junto (-0,079).

3.4. Mapeamento associativo

Com base no mapeamento associativo de 27.045 SNPs distribuídos nos 18 cromossomos de mandioca, foram identificados marcadores significativamente associados à característica produtividade de raízes pelos modelos FarmCPU e GLM (Figura 6), após a correção de Bonferroni ($p < 0,05$). A matriz de parentesco genômico representou de forma efetiva a estrutura da população nos diferentes modelos GWAS, uma vez que não foram observadas mais associações do que o esperado ao acaso em níveis baixos de significância nos gráficos QQ plot (Figura 7). Para as demais características avaliadas em área infestada com podridão radicular (altura da planta, produtividade de parte aérea, índice de doença e sobrevivência) não foram identificados marcadores em desequilíbrio de ligação.

Os cinco SNPs associados à produtividade de raízes em mandioca foram alocados em diferentes regiões gênicas localizados nos cromossomos 10, 11 e 16 (Tabela 3). Os SNPs

presentes nos cromossomos 11 e 16 explicaram a mesma proporção da variância fenotípica (0.1655), enquanto que o S10_24373837 explicou um pouco mais desta variância (0.1732).

O SNP S10_24373837 está localizado no cromossomo 10, no gene Manes.10G131800.1, descrito como “*Lung seven transmembrane receptor-like protein*”, um receptor de sinal transmembrana que transmitem sinais fisiológicos de fora para dentro da célula via proteínas G (GPCRs). Os GPCRs constituem a maior superfamília conhecida de receptores transmembrana que respondem a uma ampla variedade de estímulos extracelulares, incluindo peptídeos, lipídios, aminoácidos, hormônios e estímulos ambientais (LU et al., 2020).

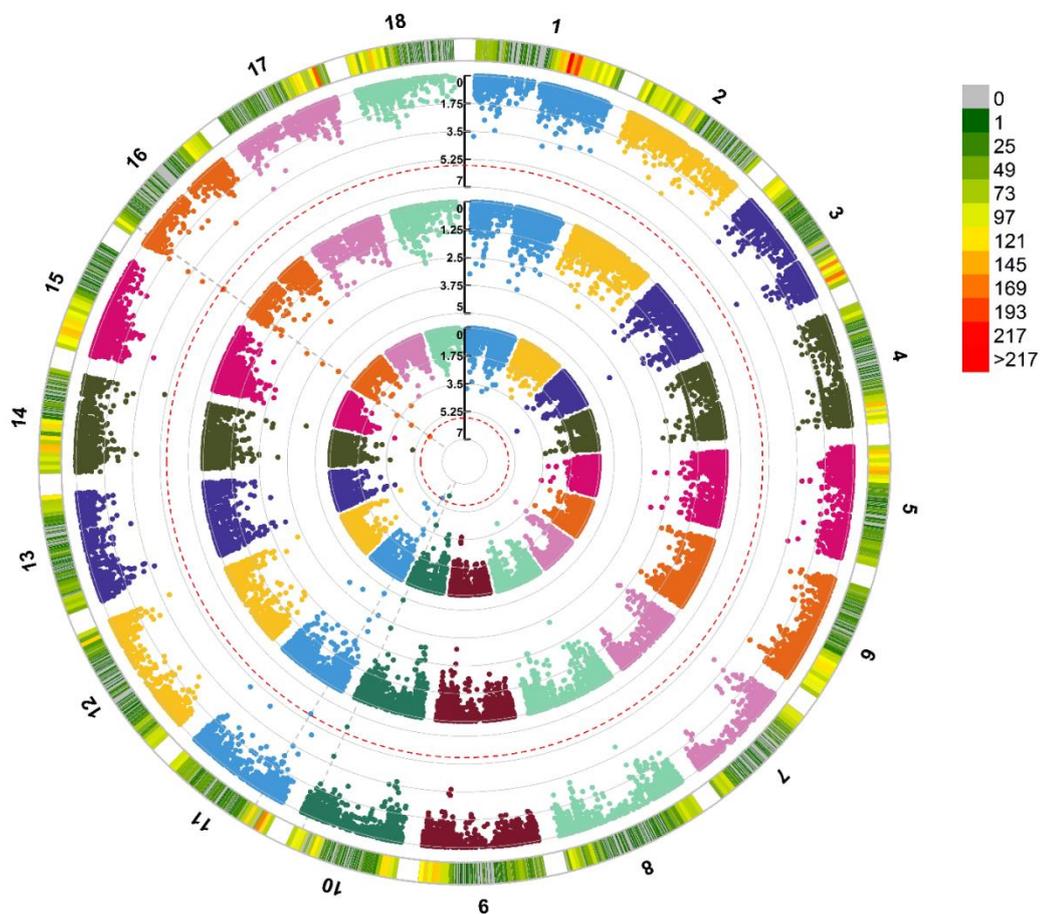


Figura 6. Gráfico circular *Manhattan plot* indicando *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) associados à produtividade de raízes pelos modelos FarmCPU (círculo externo), MLM (círculo mediano) e GLM (círculo interno). A linha vermelha pontilhada indica o valor do *threshold* para declarar associação significativa, de acordo com a correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

Os SNPs significativos S11_5550733 e S11_5585466, localizados no cromossomo 11, são relacionados aos genes Manes.11G056800.1 e Manes.11G057200.1, respectivamente. O transcrito Manes.11G056800.1 é descrito como “*Post-illumination chlorophyll fluorescence increase protein*” que codifica uma proteína cloroplastidial que é um componente essencial para

a redução não fotoquímica mediada por NADH desidrogenase do pool de plastoquinona durante o transporte de elétrons clororrespiratório, estando portanto envolvido na aclimação celular ao calor, processos de clororrespiração, eliminação não fotoquímica (LU et al., 2020). Por outro lado, o Manes.11G057200.1 (*Leucine-rich repeat-containing protein*) é um domínio evolutivamente conservado em muitas proteínas associadas à imunidade inata em plantas, que servem como uma primeira linha de defesa (NG; XAVIER, 2011). No cromossomo 16, o SNPs S16_2375953 está relacionado aos genes Manes.16G024300.1 (*U3 small nucleolar RNA-associated protein 18-UTP18*), envolvido no processamento nucleolar do pré-18S RNA ribossômico e na montagem do ribossomo, enquanto o SNP S16_2624456 do gene Manes.16G026800.1 (*E3 ubiquitin-protein ligase RNF5*), está associado ao processo de ubiquitinação da proteína-alvo por meio da enzima E3 ligase (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2019).

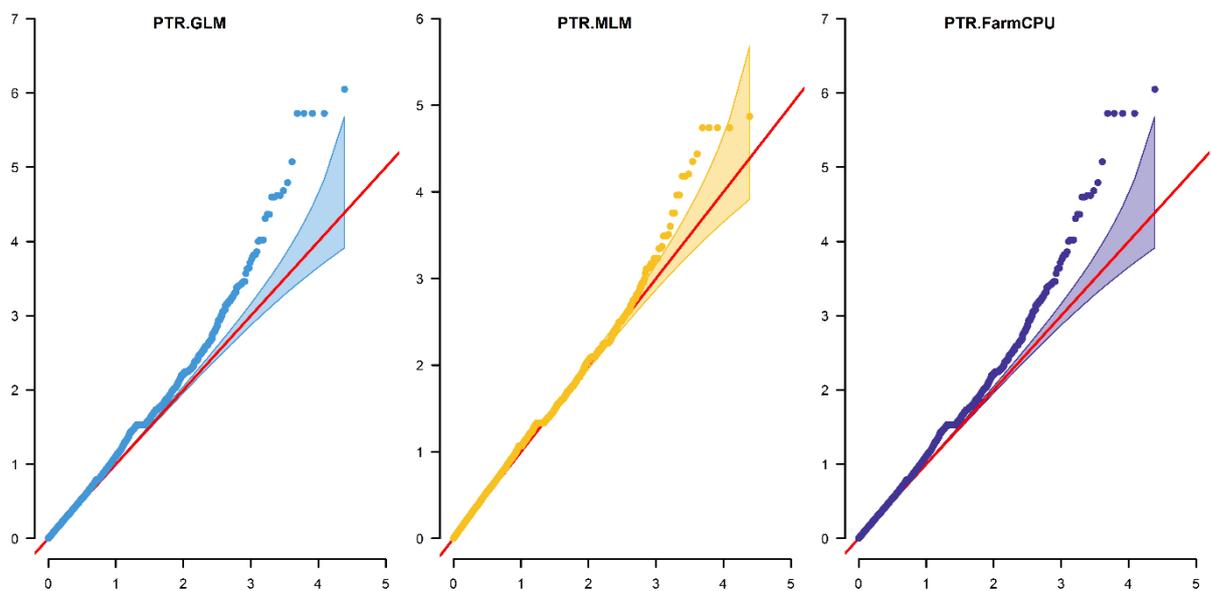


Figura 7. Gráficos Quantile-Quantile (QQ) dos níveis de significância esperados contra a significância observada para produtividade de raízes de mandioca com base nos modelos FarmCPU (círculo externo), MLM (círculo mediano) e GLM (círculo interno). As linhas diagonais vermelhas indicam a hipótese nula, onde os p-valores observados e esperados estariam situados se não houvesse associações. A área sombreada indica intervalo de confiança de 95%.

Tabela 3. Relação de marcadores *single-nucleotide polymorphism* (SNP) com associação marcador-característica corrigidos pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$) para produtividade de raízes em genótipos de mandioca. Crom: Cromossomo.

SNP	Crom.	p-valor (-log10)	r2	Transcrito	Descrição	Função
S10_24373837	10	60.485	0.1732	Manes.10G131800.1	lung seven transmembrane receptor-like protein	Receptor de sinal transmembrana
S11_5550733	11	57.228	0.1655	Manes.11G056800.1	post-illumination chlorophyll fluorescence increase	Resposta a condições de fotoinibição
S11_5585466	11	57.228	0.1655	Manes.11G057200.1	leucine-rich repeat-containing protein	Proteína de resposta antimicrobiana
S16_2375953	16	57.228	0.1655	Manes.16G024300.1	u3 small nucleolar rna-associated protein 18 (utp18)	Proteína de repetição WD
S16_2624456	16	57.228	0.1655	Manes.16G026800.1	e3 ubiquitin-protein ligase rnf5	Ubiquitinação pela enzima E3 ligase

4. DISCUSSÃO

4.1. Resistência à podridão radicular e parâmetros produtivos

Ao avaliar o desempenho dos genótipos de mandioca por dois ciclos de produção em área de ocorrência natural da doença, observou-se que a severidade da podridão radicular reduziu significativamente a sobrevivência e, conseqüentemente, a altura de plantas, o peso da parte aérea e a produtividade de raízes dos genótipos avaliados, o que é característico deste grupo de patógenos de solo. O impacto negativo da podridão radicular sobre os caracteres agronômicos em áreas infestadas com a doença, também foi constatada por outros autores a exemplo de Onyeka (2005). Entretanto, é sabido que a extensão das perdas na performance agronômica depende da distribuição do patógeno na área e sobretudo da suscetibilidade dos genótipos (AWOYEMI et al., 2016).

Aproximadamente 60% dos genótipos avaliados ('G1', 'G3' e 'G5') foram considerados suscetíveis à podridão radicular em condições de campo. As plantas não emitiram raízes ou apresentaram sintomas iniciais na fase de emergência dos brotos, e posteriormente morreram precocemente. Entretanto, no geral, a severidade da doença evoluiu com o desenvolvimento do sistema radicular, e os maiores danos ocorreram a partir de 45 dias após o plantio quando as plantas estavam iniciando seu processo de crescimento e formação da parte aérea. A partir dos 180 dias após o plantio houve uma tendência de estabilização dos sintomas na parte aérea, como murcha e morte de plantas. Estas observações indicam que o período crucial da interação planta-patógeno, a exemplo de respostas bioquímicas, fisiológicas e moleculares para impedir a morte de plantas infectadas, deve ocorrer nos meses iniciais de desenvolvimento das plantas.

O entendimento dos mecanismos genéticos responsáveis pelos diferentes níveis de resistência de genótipos de mandioca à podridão radicular, em condição de campo, ainda é pouco explorado. Os estudos desenvolvidos até o momento focaram na busca por fontes de resistência (OLIVEIRA et al., 2013; VILAS-BOAS et al., 2016) e na identificação de possíveis genes envolvidos nos mecanismos de defesa (BRITO et al., 2017; LIMA et al., 2018), utilizando a metodologia *in vitro* de inoculação em raiz destacada. Entretanto, para caracterizar a doença e o comportamento dos genótipos de mandioca em campo é preciso considerar os diferentes mecanismos de defesa não só dos tecidos do sistema radicular, mas também da parte aérea dos genótipos utilizados no plantio (SENTHIL et al., 2013; SANTIAGO et al., 2018). Embora genes ligados à resposta da planta ao ataque de patógenos e a processos oxidativos tenham sido descritos como possíveis genes envolvidos na resistência da raiz (BRITO et al., 2017; LIMA et al., 2018), é fundamental identificar e quantificar quais genes possuem expressão constitutiva,

bem como os quais estão sujeitos a controle de expressão temporal-específica e tecido-específica na interação mandioca vs podridão radicular.

Os genótipos dos grupos ‘G2’ e ‘G4’, considerados ‘Moderadamente Resistente’ e ‘Resistente’, respectivamente, apresentaram as maiores médias de altura de planta e produtividade da parte aérea. Apesar de não diferirem estatisticamente para as características relacionadas à parte aérea da planta, houve diferença entre os valores médios de produtividade de raiz destes dois grupos. Particularmente neste *screening* por fontes de resistência à podridão radicular, as principais características sob seleção são a sobrevivência das plantas e a performance agrônômica em termos de produtividade da parte aérea e raízes.

Embora a síntese do amido ocorra nas folhas e posteriormente seja transportado para o órgão de reserva que são as raízes (PFISTER; ZEEMAN, 2016), foi possível observar que os genótipos com maior altura de planta e produtividade da parte aérea não foram necessariamente os que tiveram maior produtividade de raízes em solos infestados com patógenos causadores da podridão radicular da mandioca. Levando em consideração que os mecanismos de resistência à podridão radicular são diferentes em cada tecido da planta (SENTHIL et al., 2013, SANTIAGO et al., 2018), é provável que ambos os grupos apresentem mecanismos estruturais e bioquímicos, que podem retardar ou bloquear a entrada e a subsequente atividade dos patógenos na haste. Entretanto, é possível que os genótipos do grupo ‘Moderadamente Resistente’, não possuam mecanismos genéticos de resistência à colonização e a capacidade de regeneração do sistema radicular, culminando na redução das raízes tuberosas pelas podridões radiculares, ao serem plantados em campo infestado. Por outro lado, o grupo ‘Resistente – G4’ foi composto por genótipos que além de apresentarem elevado desempenho para a produção de biomassa vegetal, tiveram o menor valor de AACPD, maior produtividade de raízes, menor índice de doença e maior sobrevivência em campo. Captação e mobilização eficiente de nutrientes para o crescimento, bem como a capacidade de lidar com estressores externos são fatores fundamentais para um elevado índice de colheita de genótipos de mandioca (CHIEWCHANKASET et al., 2019).

A raiz tuberosa é o principal tecido afetado pela podridão radicular (AIGBE; REMISON, 2010). Desse modo, genótipos que consigam produzir em áreas infestadas pela doença garantem o sucesso do plantio ao produtor e são promissores para os programas de melhoramento. Todavia, para garantir ciclos subsequentes é necessário um alto rendimento de parte aérea, material utilizado para propagação. O que aponta a possibilidade, dentro desse grupo, da seleção simultânea de clones com elevada produtividade de raízes e da parte aérea, além do menor índice de doença.

O ranqueamento dos genótipos de mandioca permitiu a seleção de dez fontes de resistência promissoras quanto a obtenção de ganhos simultâneos para a sobrevivência das plantas e a performance agrônômica, em termos de produtividade da parte aérea e raízes, requisitos para garantir rendimento em áreas infestadas por podridão radicular. A variação dos uBLUPs para produtividade da parte aérea dos “Top10” foi de 11,10 a 27,03 (o que significaria de 10,58 a 29,49 t ha⁻¹ em termos fenotípicos) e de raízes variou de 6,36 a 17,88 (cerca de 6,69 a 26,91 t ha⁻¹ em termos fenotípicos). Considerando que a produtividade média do Nordeste brasileiro situa-se em torno de 9,40 t ha⁻¹ (IBGE, 2019), as médias do grupo “Top-10” evidencia a potencialidade desses genótipos quanto à produtividade em área infestada e reforça a perspectiva de obtenção de ganhos consideráveis se utilizados como parentais na formação de populações segregantes.

As únicas variedades comerciais pertencentes ao grupo “TOP-10” foram a “BRS Kiriris”, que já foi selecionada no Nordeste brasileiro como fonte de resistência à podridão de raízes (FUKUDA et al., 2002) e apresentou o melhor desempenho em relação a altura da planta e produtividade de raiz, e a “Eucalipto”, uma variedade local de mesa, que obteve baixos índices de doença. São genótipos com resistência à podridão e que apresentam vantagem de já serem adaptadas e com características agrônômicas favoráveis para o consumo *in natura* e o uso industrial. Em contrapartida, oito acessos pertencentes ao BAG-Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, foram descritos pela primeira vez como possíveis fontes de resistência à podridão radicular. O BGM-1171, por exemplo, foi o genótipo com melhor desempenho quanto à sobrevivência em campo infestado e menores índices de doença, bem como o BGM-0398, que apresentou a maior média para produtividade de parte aérea.

4.2. Combinações híbridas potenciais para incorporação de resistência à podridão em variedades com alto valor genético

A seleção de fontes de resistência é uma etapa fundamental para o manejo efetivo da podridão radicular. Entretanto para que os programas de melhoramento obtenham sucesso, além da disponibilidade de fontes de resistência, é fundamental conhecer a complexidade da herança da resistência, além de dispor de um processo eficiente de melhoramento onde os ensaios para seleção da resistência a doenças estejam integrados com outros caracteres agrônômicos importantes para a cultura (BROWN, 2015).

As estimativas de parentesco genômico demonstraram alto contraste entre as fontes de resistência selecionadas *versus* variedades elite e locais. O menor número de potenciais combinações genotípicas contrastantes foi observado para o genótipo BGM-2169 com

estimativas de parentesco próximas a zero para 64% das variedades elite avaliadas. Por outro lado, o maior número de potenciais combinações híbridas foi observada nos genótipos BGM-0209, BGM-0398 e BGM-0659 que apresentaram baixas estimativas de parentesco genômico com mais de 87% das variedades elite. No grupo “Top-10” com resistência à podridão radicular, 57% das combinações dos genótipos BGM-1171, Eucalipto e BGM-1206 com as variedades elites apresentaram baixo parentesco genômico, enquanto que a fonte BGM-0659 apresentou baixo parentesco genômico com todas as sete variedades locais analisadas.

A geração e avaliação de populações segregantes a partir de cruzamentos entre fontes de resistência com variedades elite e locais possibilita maiores avanços no desenvolvimento de variedades de mandioca, integrando a resistência às características agrônomicas de interesse, bem como a adaptação às principais regiões de cultivo (CARMO et al., 2015).

O rastreamento de populações geneticamente segregadas, provenientes de cruzamentos entre genótipos resistentes e variedades elite/ou locais, tem sido utilizado para o mapeamento de loci de características quantitativas (QTLs) que conferem resistência a algumas doenças que acometem a mandioca como a bacteriose (SEDANO et al., 2017), os complexos do mosaico africano (Cassava Mosaic Disease - CMD) e da estria marrom da mandioca (Cassava Brown Streak Disease - CBD) (MASUMBA et al., 2017; GARCIA-OLIVEIRA et al., 2020), entretanto não há descrição de estudos semelhantes relacionados à podridão radicular.

4.3. Mapeamento de características associadas à resistência à podridão radicular

A GWAS dos 148 genótipos plantados em dois diferentes ciclos de cultivo em área de ocorrência natural da doença detectou cinco *SNPs* significativos para *produtividade de raízes*. Contudo não possibilitou a identificação de regiões genômicas associadas à sobrevivência e índices de severidade (ω) da podridão radicular da mandioca em condições de campo, mesmo havendo uma importante variação fenotípica quanto aos níveis de resistência à podridão radicular. A ausência de SNPs significativamente associados a estas duas últimas características pode estar associada a presença de alelos principais que são exclusivos de determinados backgrounds genéticos, e que portanto somente podem ser detectadas quando se analisa um grande painel de genótipos. De fato, alguns autores demonstraram que o aumento no tamanho da população de análise têm um impacto maior no poder de detecção de QTLs associados à determinada característica do que aumentos na densidade de marcadores moleculares, pois permitem exploração QTLs de menor efeito (ZHU et al., 2008). Entretanto, os passos seguintes deste estudo envolverão o cruzamento entre as fontes de resistência à podridão radicular e variedades elites de mandioca e posterior fenotipagem das populações segregantes em área com

alta infestação da doença. Como geralmente são gerados milhares de indivíduos nestas populações, este painel de genótipos constitui-se em uma excelente oportunidade para realização de novas análises GWAS em busca dos genes ligados diretamente à sobrevivência e menor ω em condições de campo.

Alguns relatos prévios demonstraram que a resistência à podridão radicular da mandioca tem um caráter poligênico (BRITO et al., 2017; LIMA et al., 2018). A resistência quantitativa é controlada por múltiplos genes de pequenos efeitos na planta, promovendo resistência parcial ao patógeno e uma diminuição na severidade de sintomas e/ou no progresso das epidemias ao longo do tempo (St.CLAIR, 2010). A arquitetura genética da resistência quantitativa às doenças tem sido frequentemente associada a um pequeno número de QTL detectados, alguns genes de efeito principal e outros com efeitos secundários (PILET-NAYEL et al., 2017). Isso reforça a necessidade de uma abordagem futura relacionada ao estudo das populações segregantes resultantes dos cruzamentos dirigidos mencionados anteriormente, visando a produção de grandes populações que permitam a detecção de locos de pequeno efeito associados à podridão radicular da mandioca.

Adicionalmente, o entendimento dos mecanismos que possibilitam a maior produtividade de raízes de mandioca em área infestada por podridão radicular. Todos os SNPs significativamente associados à produtividade de raízes nestas condições foram localizados em regiões gênicas com funções proteicas já descritas, com atuação nos mecanismos de defesa contra estresses bióticos e abióticos. A identificação dos genes subjacentes ao QTL envolvido em resistência ou pelo menos marcas moleculares ligadas a eles possibilita a projeção de abordagens de seleção assistida por marcadores na seleção de genótipos resistentes (WILLE et al., 2018). O transcrito Manes.10G131800.1, por exemplo, codifica a proteína do receptor de sinal transmembrana acoplada à proteína G (*Lung seven transmembrane receptor-like protein*). Os receptores acoplados à proteína G são a maior família de proteínas de membrana, que atuam como componentes-chave das vias de transdução de sinal em diversas espécies de plantas, atuando em diferentes processos fisiológicos (CHAKRABORTY et al., 2015; AMORA et al., 2016). Embora o seu mecanismo de ação não tenha sido elucidado, a “*Lung seven transmembrane receptor-like protein*” foi descrita em trabalhos com foco na interação planta-patógeno da mostarda (MARIK et al., 2016), na identificação de QTLs e genes candidatos associados à resistência à mancha bacteriana do feijão (ZHU et al., 2016) e de plantas hospedeiras do *Candidatus Phytoplasma*, (LI et al., 2013).

O Manes.11G056800.1 é o codificador da “*Post-illumination chlorophyll fluorescence increase protein*”, proteína associada à resposta a condições de fotoinibição sob condições de

deficiência de água (SHAO et al., 2018). Apesar de afetarem principalmente as raízes da mandioca (AKROFI et al., 2018) e influenciar na absorção de água, os fungos associados à podridão radicular podem colonizar as hastes da planta (SANTIAGO et al., 2018), conseqüentemente bloquear o fluxo das seivas, causar murcha na parte aérea e até mesmo morte da planta. Desse modo, proteínas que atuem no reparo de danos causados no sistema fotossintético da mandioca, em função de diversos tipos de estresse, podem auxiliar no crescimento da planta e no desenvolvimento do sistema radicular.

O Manes.11G057200.1 codifica a “*Leucine-rich repeat-containing protein (NLR)*”, envolvida na resposta antimicrobiana. Os genes de resistência que codificam proteínas da família NLR (contendo o domínio de ligação de nucleotídeo rico em leucina) reconhecem a presença de proteínas efetoras de patógenos e induz uma resposta imune frequentemente associada à morte celular em locais de infecção (CESARI, 2018). A “*Leucine-rich repeat-containing protein (NLR)*” atua como regulador crucial na resposta do sistema imune das plantas contra várias doenças, desde aquelas que causam murchas vasculares e podridões de raiz/colo, como a podridão e murcha da soja, causada por *Phytophthora sojae* (LI et al., 2016) e *Fusarium virguliforme* (ZHANG et al., 2015), respectivamente, até doenças que afetam a parte aérea das plantas, como a ferrugem do trigo (HUANG et al., 2013) e a mancha de *Corynespora* da seringueira (ROY et al., 2019).

O Manes.16G024300.1 codifica proteínas de repetição WD (*U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 - UTP18*), uma superfamília diversa de proteínas reguladoras. Proteínas contendo WDR estão envolvidas em mecanismos fundamentais, como transdução de sinal, modificação da cromatina e regulação da transcrição (VILLANUEVA et al., 2016; JAIN; PANDEY, 2018). Em plantas, têm desempenhado papéis importantes como desenvolvimento floral (CHEN et al., 2016), biossíntese de flavonoides em raízes tuberosas (DONG et al., 2014), resposta ao estresse abiótico (KONG et al., 2015) e na sinalização imunológica e regulação transcricional das defesas químicas (CHUANG et al., 2015; MILLER et al., 2016, LIU et al., 2019; MILLER et al., 2019).

Por fim, o Manes.16G026800.1 (*E3 ubiquitin-protein ligase RNF5*), está associado ao processo de ubiquitinação da proteína-alvo por meio da enzima E3 ligase. A ubiquitinação é um dos tipos mais abundantes de modificação pós - tradução de proteínas (PTM) em células vegetais, regula uma infinidade de funções celulares desde o crescimento e o desenvolvimento até as respostas a estímulos bióticos e abióticos (CHEN; HELLMANN, 2013; CALLIS, 2014; SHU; YANG, 2017; SERRANO et al., 2018). As enzimas E3 ubiquitina (Ub) - ligase são os componentes mais estudados da cascata de ubiquitinação (CALLIS, 2014), estão envolvidas

em vários aspectos da imunidade da planta, variando da percepção do patógeno à transdução de sinal e as respostas imunológicas (DUPLAN; RIVAS, 2014; WANG et al., 2015; ZHOU; ZENG, 2017; SERRANO et al., 2018; FURNISS et al., 2018; ADAMS; SPOEL, 2018).

Os cinco SNPs associados à produtividade de raízes não foram coincidentes com os 38 SNPs significativos associados à resistência à podridão radicular com base na análise de raízes destacadas e inoculadas artificialmente (BRITO et al., 2017). As interações complexas do campo (GAO et al., 2014; FACELLI et al., 2018) podem não ser refletidas em estudos com inoculação artificial, em ambientes controlados (WILLE et al., 2018, SANTIAGO et al., 2018). Desse modo, para trabalhos futuros, além de maior correlação fenotípica entre os genótipos, análises que integrem diferentes condições de campo e diversos ensaios de condições controladas possibilitariam detectar QTL consistente nos diferentes ambientes, contribuindo consideravelmente ao progresso na identificação de regiões genômicas envolvidas na resistência contra patógenos radiculares (HAMON et al., 2013; DESGROUX et al., 2018, MA et al., 2020).

Devido ao caráter devastador da podridão radicular, a necessidade de desenvolvimento de variedades de mandioca com resistência durável a múltiplos patógenos é cada vez mais importante para a segurança alimentar e desenvolvimento econômico (OLIVEIRA et al., 2017; BRITO et al., 2017). Contudo, por ser uma resistência controlada por muitos genes, qualquer método adotado deve considerar elementos que dificultam o melhoramento genético a exemplo da baixa herdabilidade e alta influência do ambiente, especialmente quando não há presença de genes maiores. Uma vez identificada às fontes de resistência, é imprescindível o estabelecimento de estratégias que permitam o acúmulo gradual de alelos favoráveis para os vários genes que controlam a resistência à podridão radicular. Entretanto, qualquer nova resistência a doenças precisa ser selecionada dentro de um contexto genético que atenda aos requisitos atuais de rendimento e características agronômicas de interesse (SUMMERS; BROWN, 2013). Desse modo, a recombinação dos genótipos aqui selecionados deve possibilitar a obtenção de populações segregantes com média alta e suficiente variância genética para resistência a esta doença, bem como para características agronômicas de interesse para o programa de melhoramento genético da espécie. Em paralelo, o mapeamento dos QTLs relacionados à produtividade em área infestada possibilitará a projeção de abordagens de seleção assistida por marcadores na seleção de genótipos resistentes.

5. CONCLUSÃO

Para selecionar genótipos de mandioca com resistência à podridão radicular foram analisados diversas características fenotípicas e as observações de campo indicaram a existência de ampla variabilidade para resistência à podridão radicular em *M. esculenta*, associada à uma importante variação agrônômica passível de seleção. A análise de correlação e o agrupamento dos genótipos com base nesses dados indicam que o alto índice de doença (ω) influencia diretamente na sobrevivência dos genótipos e, por conseguinte na altura de planta, na produtividade da parte aérea e de raízes.

Os genótipos com alta produtividade de parte aérea não foram necessariamente os que apresentaram maior produtividade de raízes em solo infestado com podridão radicular, indicando diferença nos mecanismos de resistências nos diferentes tecidos da planta. Portanto, é preciso esforços para fornecer germoplasma com maior produtividade e garantir a sustentabilidade da produção em áreas infestadas. Atendendo a estes requisitos, os genótipos pertencentes ao grupo “Top-10” foram selecionados e serão utilizados como parentais nas próximas etapas do programa de melhoramento de mandioca, com foco em resistência à podridão radicular. Pertencem a este grupo as variedades comerciais ‘BRS Kiriris’ e ‘Eucalipto’, indicadas para o uso direto de produção em área infestada. Bem como os genótipos BGM1171, BGM0659, BGM0398, BGM1206, BGM0624, BGM2169, BGM1190, BGM0209, descritos pela primeira vez como fontes alternativas para resistência à podridão radicular.

Foram detectados cinco SNPs significativos para produtividade de raízes sob condições de estresse em área infestada por podridões radiculares. Análises futuras e posterior validação dos genes aqui descritos em populações segregantes de maior tamanho nos permitirão ilustrar alguns dos mecanismos moleculares na mandioca para resistência à podridão radicular.

6. REFERÊNCIAS

- ADAMS, E.H.G.; SPOEL, S.H. The ubiquitin–proteasome system as a transcriptional regulator of plant immunity. **Journal of Experimental Botany**, v.69, p.4529–4537, 2018.
- AFOLABI, C.G.; OKECHUKWU, O.C.; KEHINDE, I.A.; OKECHUKWU R.U. Assessments of farmers' field for root rot disease on improved cassava varieties released in Nigeria. **African Journal of Root and Tuber Crops**, v. 9, p. 50-57, 2011.
- AIGBE, S.O.; REMISON, S.U. The influence of root rot incidence on cassava genotype on consumers' acceptability of the gari produced from it. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 6146–6150, 2010.
- AKROFI, S.; AKUOKO, K. O.; BOUR, K.B.; NYARKO, J. A. Farmers' knowledge and perception of the dry cassava root rot disease in Brong Ahafo region of Ghana. **Ghana Journal of Agricultural Science**, v.52, p. 33-42, 2018.
- ALLEM, A.C. The origin and taxonomy of cassava. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. **Cassava: biology, production and utilization**, p. 1-16, 2002.
- AMORA, D.X.; BRESSO, E.; TOGAWA, R.C; GRYNBERG, P.; MAIGRET, B.; MARTINS, N.F. Prediction of G protein coupled receptors from plant genomes. **International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology**, v.3, p.92-107, 2016.
- AWOYEMI, S.O.; AFOLABI, C.G.; POPOOLAA, A.K.; ODEDINAB, J.N.; ADIGBO, S.O. Performances of improved cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars against root rot disease and yield in cassava-maize intercropping systems under natural infection. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.9, p.386–401, 2016.
- BANDYOPADHYAY, R.; MWANGI, M.; AIGBE, S.O.; LESLIE, J.F. *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. **Phytopathology**, v. 96, p.673–676, 2006.
- BARROS, J.A.; MEDEIROS, E.V.; NOTARO, K.A.; MORAES, W.S.; SILVA, T.C.E.S.; MOREIRA, K.A. Different cover promote sandy soil suppressiveness to root rot disease of cassava caused by *Fusarium solani*. **African Journal of Microbiology Research**, v.8, p.967–973, 2014.
- BOARI, A.J.; CUNHA, E.M.; QUADROS, A.F.F.; BARRETO, R.W.; FERNANDES, A.F. First report of *Phytophthium* sp. causing storage root rot and foliage blight of cassava in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, p.1042, 2018.
- BREDESON, J. V.; LYONS, J. B.; PROCHNIK, S. E.; WU, G. A.; HA, C. M.; EDSINGER-GONZALES, E.; GRIMWOOD, J.; SCHMUTZ, J.; RABBI, I.Y.; EGESI, C.; NAULUVULA, P.; LEBOT, V.; NDUNGURU, J.; MKAMILO, G.; BART, R. S.; SETTER, T. L.; GLEADOW, R. M.; KULAKOW, P.; FERGUSON, M. E.; ROUNSLEY, S.; ROKHSAR, D. S. Sequencing wild and cultivated cassava and related species reveals extensive interspecific hybridization and

genetic diversity. **Nature biotechnology**, v. 34, p. 562–570, 2016.

BRITO, A.C.; OLIVEIRA, S.A.S.; OLIVEIRA, E.J. Genome-wide association study for resistance to cassava root rot. **The Journal of Agricultural Science**, v.155, p.1424-1441. 2017.

BRITO, A.C.Q.; DE MELLO, J.F.; CÂMARA, M.P.S.; VIEIRA, J. C. B.; MICHEREFF, S. J.; SOUZA-MOTTA, C.M.; MACHADO, A.R. Diversity and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with black root rot and stem cutting dry rot in *Manihot esculenta* in Brazil. **The European Journal of Plant Pathology**, v. 157, p.583–598, 2020.

BRITO, A.C.Q.; DE MELLO, J.F.; MICHEREFF, S.J.; DE SOUZA-MOTTA, C.M.; MACHADO, A.R. First report of *Macrophomina pseudophaseolina* causing stem dry rot in cassava in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, p.1245-1245, 2019.

BROWN, J.K.M. Durable resistance of crops to disease: a Darwinian perspective. **Annual Review of Phytopathology**, v.53, p.513-539, 2015.

BUA, B.; OKELLO, C. Isolation and identification of cassava root rot disease causal pathogens from Lira district, Uganda. **African Crop Science Conference Proceedings**, v.10, p.183-186, 2011.

CALLIS, J. The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. **The Arabidopsis Book**, v.12, 2014.

CAMPBELL, C.L; MADDEN, L.V. Introduction to plant disease epidemiology. **John Wiley & Sons**, 1990.

CARMO, C. D.; SILVA, M. S. ; OLIVEIRA, G. A. F. ; OLIVEIRA, E. J. . Molecular-assisted selection for resistance to cassava mosaic disease in *Manihot esculenta* Crantz. **Scientia Agricola**, v. 72, p. 520-527, 2015.

CESARI, S. Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. **New Phytologist**, v.219, p.17-42, 2018.

CHAKRABORTY, N.; SINGH, N.; KAUR, K.; RAGHURAM, N. G-protein signaling components GCR1 and GPA1 mediate responses to multiple abiotic stresses in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, v.6, 2015.

CHEN, C.; YIN, S.; LIU, X.; LIU, B.; YANG, S.; XUE, S.; CAI, Y.; BLACK, K.; LIU, H.; DONG, M.; ZHANG, Y.; ZHAO, B.; REN, H. THE WD-REPEAT PROTEIN CSTTG1 Regulates fruit wart formation through interaction with the homeodomain-leucine zipper I protein mict. **Plant Physiology**, v.171, p.1156-1168, 2016.

CHEN, L.; HELLMANN, H. Plant E3 Ligases: Flexible Enzymes in a Sessile World. **Molecular Plant**, v.6, p.1388-1404, 2013.

CHIEWCHANKASET, P.; SIRIWAT, W.; SUKSANGPANOMRUNG, M.; BOONSENG, O.; MEECHAI, A.; TANTICHAROEN, M.; KALAPANULAK, S.; SAITHONG, T. Understanding carbon utilization routes between high and low starch-producing cultivars of cassava through Flux Balance Analysis. **Scientific Reports**, v.9, 2019.

- CHILAKA, C.A.; DE BOEVRE, M.; ATANDA, O.O.; DE SAEGER, S. Prevalence of *Fusarium* mycotoxins in cassava and yam products from some selected Nigerian markets. **Food Control**, v.84, p. 226-231, 2018.
- CHUANG, H.W.; FENG, J.H.; FENG, Y.L.; WEI, M.J. An *Arabidopsis* WDR protein coordinates cellular networks involved in light: stress response and hormone signals. **Plant Science**, v.241, p. 23-31, 2015.
- CZERMAINSKY, A.B.C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças em plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1545-1555, 1999.
- DESGROUX, A.; BAUDAIS, V. N.; AUBERT, V.; LE ROY, G.; DE LARAMBERGUE, H.; MITEUL, H.; BOURION, V. Comparative genome-wide-association mapping identifies common loci controlling root system architecture and resistance to *Aphanomyces euteiches* in pea. **Frontiers in Plant Science**, 2018.
- DONG, W.; NIU, L.; GU, J.; GAO, F. Isolation of a WD40-repeat gene regulating anthocyanin biosynthesis in storage roots of purple-fleshed sweet potato. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, p.1123–1132, 2014.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. 1987
- DUPLAN, V.; RIVAS, S. E3 ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of plant innate immunity. **Frontiers in Plant Science**, v.5, p. 42, 2014.
- ELSHIRE, R. J.; GLAUBITZ, J. C.; SUN, Q.; POLAND, J. A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E. S.; MITCHELL, S. E. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. 1–10, 2011.
- FACELLI, E.; MCKAY, S.F.; FACELLI, J.M.; SCOTT, E.S. A soil-borne generalist pathogen regulates complex plant interactions. **Plant Soil**, v.433, p.101–109, 2018.
- FOUNDATION AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). **Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets – November 2018**.
- FOUNDATION AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). Database Gateway. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/>>. Acesso em: Abril. 2020.
- FUKUDA, W.M.G.; SILVA, S. de O.; IGLESIAS, C. Cassava breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, p.617-638, 2002.
- FURNISS, J.J.; GREY, H.; WANG, Z.; NOMOTO, M.; JACKSON, L.; TADA, Y.; SPOEL, S.H. Proteasome-associated HECT-type ubiquitin ligase activity is required for plant immunity. **PLoS Pathogens**, v.14, 2018.

GAO, X.; WU, M.; XU, R.; WANG, X.; PAN, R.; KIM, H.J.; LIAO, H. Root interactions in a maize/soybean intercropping system control soybean soil-borne disease, Red crown Rot. **PLoS ONE**, v.9, 2014.

GOODSTEIN, D. M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R. D.; FAZO, J.; MITROS, T.; DIRKS, W.; HELLSTEN, U.; PUTNAM, N.; ROKHSAR, D. S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p.1178–1186, 2012.

HAMBLIN, M.T.; RABBI, I.Y. The effects of restriction-enzyme choice on properties of genotyping-by-sequencing libraries: A study in cassava (*Manihot esculenta*). **Crop Science**, v. 54, p. 1–6, 2014.

HAMON, C.; COYNE, C.J.; MCGEE, R.J.; LESNÉ, A.; ESNAULT, R.; MANGIN, P.; HERVÉ, M.; LE GOFF, I.; DENIOT, G.; ROUX-DUPARQUE, M.; MORIN, G.; MCPHEE, K.; DELOURME, R.; BARANGER, A.; PILET-NAYEL, M. QTL meta-analysis provides a comprehensive view of loci controlling partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in four sources of resistance in pea. **BMC Plant Biology**, v.13, p.45, 2013.

HUANG, X.L.; MA, J.B.; CHEN, X.; WANG, X.J.; DING, K.; HAN, D.J.; QU, Z.P.; HUANG, L.L.; KANG, Z.S. Genes involved in adult plant resistance to stripe rust in wheat cultivar Xingzi 9104. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.81, p. 26-32, 2013.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola**. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2019_dez.pdf> Acesso em Agosto de 2019.

JAIN, B.P; PANDEY, S. WD40 Repeat Proteins: Signaling Scaffold with Diverse Functions. **Protein Journal**, v.37, p. 391–406, 2018.

JOHN, W. C.; OKE, O.; ISHAYA, M.; OLORUNDARE, O. O.; JANFA, N.; MAFUYAI, M. J. Bioassay of Lemongrass on Fungi Pathogen Associated with Cassava Tubers Rot in Farin Gada Market, Jos. **Microbiology Research Journal International**, v. 29, p. 1-8, 2019.

KONG, D.; LI, M.; DONG, Z.; JI, H.; LI, X. Identification of TaWD40D, a wheat WD40 repeat-containing protein that is associated with plant tolerance to abiotic stresses. **Plant Cell Reports**, v. 34, p. 395–410, 2015.

LI, L.; GUO, N.; NIU, J.; WANG, Z.; CUI, X.; SUN, J.; ZHAO, T.; XING, H. Loci and candidate gene identification for resistance to *Phytophthora sojae* via association analysis in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Molecular Genetics & Genomics**, v.291, p.1095–1103, 2016.

LI, Y.; CHEN, W.; MA, D.; WU, Y. CDNA-AFLP analysis revealed genes potentially implicated in *Catharanthus roseus* flowers during wheat blue dwarf phytoplasma infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.84, p. 1-9, 2013.

LIMA, A.M; MOURAD, E.F; ISHIDAD, A.K.N; PEREIRA, A.C.C; REIS, S.P; SOUZA, C.R.B. 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, p.23–30, 2018.

LIU, J.; ZHI, P.; WANG, X.; FAN, Q.; CHANG, C. Wheat WD40-repeat protein TaHOS15 functions in a histone deacetylase complex to fine-tune defense responses to *Blumeria graminis f.sp. tritici* **Journal of Experimental Botany**, v.70, p.255-268, 2019.

LU, S.; WANG, J.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M.K.; GEER, R.C.; GONZALES, N.R.; GWADZ, M.; HURWITZ, D.I.; MARCHLER, G.H.; SONG, J.S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R.A.; YANG, M.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; LANCZYCKI, C.J.; MARCHLER-BAUER, A. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. **Nucleic Acids Research**, V.48, 265–268, 2020.

MA, Y.; MARZOUGUI, A.; COYNE, C.J.; SANKARAN, S.; MAIN, D.; PORTER, L.D.; MUGABE, D.; SMITCHGER, J.A.; ZHANG, C.; AMIN, M.N.; RASHEED, N.; FICKLIN, S.P.; MCGEE, R.J. Dissecting the genetic architecture of *Aphanomyces* root rot resistance in lentil by QTL mapping and genome-wide association study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 21-29, 2020.

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; OLIVEIRA, S. A. S.; PEREIRA, O. L. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.39, p.464-470, 2014.

MARIK, A.; NAIYA, H.; DAS, M.; MUKHERJEE, G.; BASU, S.; SAHA, C.; RAJDEEP CHOWDHURY, R.; BHATTACHARYYA, K.; SEAL, A. Split-ubiquitin yeast two-hybrid interaction reveals a novel interaction between a natural resistance associated macrophage protein and a membrane bound thioredoxin in *Brassica juncea*. **Plant Molecular Biology**, v.92, p.519–537, 2016.

MCCALLUM, E.J.; ANJANAPPA, R.B.; GRUISSEM, W. Tackling agriculturally relevant diseases in the staple crop cassava (*Manihot esculenta*). **Current Opinion in Plant Biology**, v.38, p.50–58, 2017.

MEDEIROS, E.V.; NOTARO, K.A.; BARROS, J.A.; DUDA, G.P.; MORAES, M.D.; AMBROSIO, M.; NEGREIROS, A.M.; SALES JÚNIOR, R. Soils from intercropped fields have a higher capacity to suppress black root rot in cassava, caused by *Scytalidium lignicola*. **Journal Phytopathology**, v.167, p. 209-217, 2019.

MILLER, J.C.; BARCO, B.; CLAY, N.K. Discovery of novel Defense Regulated WD40-repeat proteins DRW1/2 and their roles in plant immunity. **BioRxiv**, 2019.

MSIKITA, W.; BISSANG, B.; JAMES, B. D.; BAIMEY, H.; WILKINSON, H. T.; AHOUNOU, M.; FAGBEMISSI, R. Prevalence and severity of *Nattrassia mangiferae* root and stem rot pathogen of cassava in Bénin. **Plant Disease**, v.89, p.12-16, 2005.

MULAMBA, N.N.; MOCK, J.J. Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. **Egyptian Journal of Genetics and Cytology**, v.7, p.40 – 51, 1978.

NG, A.; XAVIER, R.J. Leucine-rich repeat (LRR) proteins: integrators of pattern recognition

and signalling in immunity. **Autophagy**, v.7, p.1082-1084, 2011.

OLIVEIRA, S.A.S.; HOHENFELD, C.S.; SANTOS, V.S.; HADDAD, F.; OLIVEIRA, E.J. Resistance to *Fusarium* dry root rot disease in cassava accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1414-1417, 2013.

OLIVEIRA, S. A. S.; VILAS BOAS, S. A.; BRAGANÇA, C. A. D.; OLIVEIRA, E. J. First report of *Phytophthora melonis* causing cassava wilt and root rot in Bahia State, Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 107, 2016.

OLIVEIRA, E.J.; OLIVEIRA, S. A.S.; VILASBOAS, S.A.; HOHENFELD, C.; SILVA S. V. Selection of cassava accessions with multiple resistance to pathogens associated with root rot disease. **Euphytica**, v. 213, p. 185, 2017.

ONANA, B.; ESSONO, G.; NYEGUE, M.; R. TCHIKOUA, R.; Z. AMBANG, Z.; AYODELE, M. Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisins in stored cassava chips. **African Journal of Microbiology Research**, v.9, p.2257-2269, 2015.

ONYEKA, T. J.; DIXON, A. G. O.; EKPO, E. J. A. Identification of levels of resistance to cassava root rot disease (*Botryodiplodia theobromae*) in African landraces and improved germplasm using in vitro inoculation method. **Euphytica**, v.145, p.281-288, 2005.

PFISTER, B.; ZEEMAN, S. C. Formation of starch in plant cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.73, p. 2781–2807, 2016.

PILET-NAYEL, M.L.; MOURY, B.; CAFFIER, V.; MONTARRY, J.; KERLAN, M.C.; FOURNET, S.; DUREL, C.E.; DELOURME, R. Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. **Frontiers in Plant Science**, v.8, 2017.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna. Austria. 2020. URL <https://www.R-project.org/>.

ROY, C.B.; LIU, H.; RAJAMANI, A.; SAHA, T. Transcriptome profiling reveals genetic basis of disease resistance against *Corynespora cassiicola* in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Current Plant Biology**, v.17, p.2–16, 2019.

SANTIAGO, C.H.; SANTANA, M.P.; JUNIOR, L.R.C.; OLIVEIRA, S.A.S.; OLIVEIRA, E.J. Methodologies for selecting cassava with resistance to dry and black root rot under controlled conditions. **Bragantia**, v.77, p.440-451, 2018.

SENTHIL, M.; NATH, V. S.; LAJAPATHYJEEVA, M.; HEGDE, V. M.; MISRA, R. S. In vitro standardisation of resistance screening methods in cassava against tuber rot disease. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.46, p.1255-1261, 2013.

SERRANO, I.; CAMPOS, L.; RIVAS, S. Roles of E3 ubiquitin-ligases in nuclear protein homeostasis during plant stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v.9, p.139, 2018.

SHAO, R.; ZHENG, H.; JIA, S.; JIANG, Y.; YANG, Q.; KANG, G. Nitric Oxide Enhancing Resistance to PEG-induced water deficiency is associated with the primary photosynthesis reaction in *Triticum aestivum* L. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, 2018.

SHU, K.; YANG, W. E3 Ubiquitin Ligases: Ubiquitous Actors in Plant Development and Abiotic Stress Responses. **Plant and Cell Physiology**, v.8, p.1461–1476, 2017.

SILVA, J.M.; MEDEIROS, E.V.; DUDA, G.P.; BARROS, J.A.; SANTOS, U.J. Fames and microbial activities involved in the suppression of cassava root rot by organic matter. **Revista Caatinga**, v.30, p.708-717, 2017.

ST. CLAIR, D. A. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. **Annual Review of Phytopathology**, v.48, p.247-68, 2010.

SUMMERS, R.W.; BROWN, J.K.M. Constraints on breeding for disease resistance in commercially competitive wheat cultivars. **Plant Pathology**, v.62, p.115–121, 2013.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, v.47, 506–515, 2019.

VANRADEN, P. Efficient methods to compute genomic predictions. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4414-4423, 2008.

VENTURINI, M.T.; SANTOS, V.S.; OLIVEIRA, E.J. Procedures for evaluating the tolerance of cassava genotypes to postharvest physiological deterioration. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.50, p.562-570, 2015.

VILAS BOAS, S.A.; HOHENFELD, C.S.; OLIVEIRA, S.A.S.; SANTOS, V.S.; OLIVEIRA, E.J. Sources of resistance to cassava root rot caused by *Fusarium* spp.: a genotypic approach. **Euphytica**, v.9, p.237–251, 2016.

VILAS BOAS, S.A.; OLIVEIRA, S.A.S.; BRAGANÇA, C.A.D.; RAMOS, J.B.; OLIVEIRA, E.J. Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. **Scientia Agricola**, v.74, p.60–67, 2017.

VILLANUEVA, M.A.; ISLAS-FLORES, T.; ULLAH, H. Editorial: Signaling through WD-Repeat Proteins in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p.1157, 2016.

WANG, J.; QU, B.; DOU, S.; LI, L.; YIN, D.; PANG, Z.; ZHOU, Z.; TIAN, M.; LIU, G.; XIE, Q.; TANG, D.; CHEN, X.; ZHU, L. The E3 ligase OsPUB15 interacts with the receptor-like kinase PID2 and regulates plant cell death and innate immunity. **BMC Plant Biology**, v.15, 2015.

WILLE, L.; MESSMER, M.M.; STUDER, B.; HOHMANN, P. Insights to plant-microbe interactions provide opportunities to improve resistance breeding against root diseases in grain legumes. **Plant, Cell & Environment**, p.1-21, 2018.

YIN, L.; ZHANG, H.; TANG, Z.; XU, J.; YIN, D.; ZHANG, Z.; YUAN, X.; ZHU, M.; ZHAO, S.; LI, X.; LIU, X. rMVP: A Memory-efficient, Visualization-enhanced, and Parallel-accelerated tool for Genome-Wide Association Study. **bioRxiv** 2020

ZHANG, J.; SINGH, A.; MUELLER, D.S.; SINGH, A.K. Genome-wide association and epistasis studies unravel the genetic architecture of sudden death syndrome resistance in

soybean. **Plant Journal**, v.31, p. 1–12, 2015.

ZHOU, B.J.; ZENG, L.R. Conventional and unconventional ubiquitination in plant immunity. **Molecular Plant Pathology**, v.18, p.1313–1330, 2017.

ZHU, C.; GORE, M.; BUCKLER, E.S.; YU, J. Status and prospects of association mapping in plants. *Plant Genome*, v.1, p.5–20, 2008.

ZHU, J.; WU, J.; WANG, L.; BLAIR, M.W.; ZHU, Z.; WANG, S. QTL and candidate genes associated with common bacterial blight resistance in the common bean cultivar Longyundou 5 from China. **Crop Journal**, v.4, p. 344-352, 2016.

ZINSOU, V.A.; AFOUDA, L.A.C.; AHOHUENDO, B.C.; WYDRA, K. Importance of fungal root rot pathogens of cassava in Benin. **Pakistan Journal of Botany**, v.49, p.2023-2028, 2017.

7. ANEXOS

Tabela 3. Médias observadas para sobrevivência, índice de doença (ω), altura de planta, peso de parte aérea e peso de raiz do grupo ‘Moderadamente Suscetível – G1’ formado pela análise de cluster.

Moderadamente Suscetível - (G1)					
Clone	Sobrevivência	Id (ω)	Altura da planta	Produtividade da parte aérea	Produtividade de raízes
16_07	39.52	71.10	1.86	7.94	5.16
2002_01_01	48.48	70.24	1.74	10.30	6.13
BGM0022	48.07	64.77	1.71	9.76	6.08
BGM0133	24.41	70.34	1.74	9.78	9.11
BGM0140	35.08	70.76	1.51	6.04	3.39
BGM0163	40.18	68.40	1.95	11.45	5.20
BGM0217	32.04	78.21	1.75	11.69	3.76
BGM0254	34.09	76.47	1.65	8.32	8.20
BGM0319	48.48	72.37	1.97	8.48	2.80
BGM0425	53.24	61.13	1.81	10.04	4.44
BGM0428	48.48	70.89	1.67	5.78	2.06
BGM0517	34.09	65.13	1.68	9.02	8.60
BGM0543	53.24	79.25	1.76	7.65	3.92
BGM0785	36.59	71.58	1.69	7.11	4.67
BGM0877	19.94	82.15	2.37	11.70	7.88
BGM0930	54.62	64.80	1.81	6.47	4.43
BGM0945	40.53	79.91	2.21	9.71	3.82
BGM0960	34.09	68.07	1.75	9.44	0.27
BGM1137	34.21	73.40	1.98	6.33	4.78
BGM1175	15.18	73.82	1.94	10.85	3.53
BGM1287	38.86	75.65	1.72	6.57	5.98
BGM1387	27.64	88.57	1.55	8.89	6.41
BGM1495	32.08	76.13	1.95	6.75	3.46
BGM1521	24.41	81.69	1.69	7.06	3.76
BGM1523	46.10	82.08	1.64	7.44	4.90
BGM1719	38.97	80.88	2.04	13.86	8.03
BGM1884	14.74	82.71	1.97	12.37	0.02
BGM1957	29.45	88.57	2.04	17.44	6.89
BGM2048	56.65	57.47	1.46	4.82	4.65
BGM2054	40.53	68.06	1.92	7.94	6.17
BGM2055	48.23	73.85	1.77	6.61	6.04
BGM2060	27.64	80.01	1.53	5.50	3.24
Caipira	42.14	68.45	1.61	7.26	3.00
Gema de					
Ovo	30.86	79.93	1.74	9.42	6.80
Salangó	51.85	68.29	1.54	7.63	7.17
Tapioqueira	30.86	74.36	1.63	8.90	4.31
Mínimo	14.74	57.47	1.46	4.82	0.02

Máximo	56.65	88.57	2.37	17.44	9.11
Média	37.66	73.87	1.79	8.79	4.97

Tabela 4. Médias observadas para sobrevivência, índice de doença (ω), altura de planta, peso de parte aérea e peso de raiz do grupo ‘Moderadamente Resistente – G2’ formado pela análise de cluster.

Moderadamente Resistente – (G2)					
Clone	Sobrevivência	Id (ω)	Altura da planta	Produtividade da parte aérea	Produtividade de raízes
BGM0018	59.87	51.12	2.08	13.16	7.67
BGM0032	35.16	60.66	1.53	11.72	9.52
BGM0070	61.49	56.93	1.46	12.47	7.75
BGM0144	67.36	29.47	1.81	10.56	4.53
BGM0204	43.84	55.73	1.55	8.69	6.84
BGM0248	65.40	53.50	1.70	8.14	5.98
BGM0307	62.75	54.56	1.96	10.94	3.78
BGM0356	58.00	54.56	1.99	10.82	9.19
BGM0390	67.36	59.02	1.83	16.64	8.20
BGM0440	62.46	40.61	1.67	9.40	9.83
BGM0509	63.69	52.48	2.39	9.45	3.88
BGM0542	62.75	52.46	1.78	13.46	6.37
BGM0557	48.59	61.00	1.82	17.16	14.25
BGM0591	58.00	59.45	2.01	14.17	3.95
BGM0631	73.24	52.22	1.79	12.52	10.66
BGM0733	68.34	62.11	1.98	10.93	5.20
BGM0779	52.47	61.61	1.90	19.03	8.33
BGM0820	49.72	67.55	1.99	14.18	6.83
BGM0856	62.75	54.49	1.85	12.26	3.95
BGM1177	56.65	73.11	1.89	12.66	8.96
BGM1178	48.48	61.91	1.75	10.41	6.69
BGM1193	51.82	56.98	2.08	18.23	8.41
BGM1255	66.32	62.79	1.47	11.08	10.01
BGM1354	61.48	53.83	1.93	14.31	7.39
BGM1397	69.55	50.51	1.79	6.30	5.21
BGM1729	53.24	64.31	1.86	10.34	9.12
BGM1956	55.30	59.17	1.95	12.89	6.35
BGM2052	50.20	64.99	1.56	7.69	9.68
BGM2080	43.76	59.78	2.00	10.31	9.52
BGM2082	40.32	75.17	2.19	10.44	11.41
Cascuda	46.98	57.46	1.58	6.39	11.33
Cigana Preta	56.65	62.93	1.89	16.22	11.30
Dourada	66.32	43.36	1.96	13.44	5.43
Olho Junto	43.76	65.53	1.40	10.93	15.64
Verdinha	51.85	63.64	1.63	15.42	12.35

Mínimo	35.16	29.47	1.40	6.30	3.78
Máximo	73.24	75.17	2.39	19.03	15.64
Média	56.74	57.57	1.83	12.08	8.16

Tabela 5. Médias observadas para sobrevivência, índice de doença (ω), altura de planta, peso de parte aérea e peso de raiz do grupo ‘Extremamente Suscetível - (G3)’ formado pela análise de cluster.

Extremamente Suscetível - (G3)					
Clone	Sobrevivência	Id (ω)	Altura da planta	Produtividade da parte aérea	Produtividade de raízes
BGM0598	2.06	94.94	0.00	0.00	0.00
BGM1027	0.83	96.12	0.00	0.00	0.00
BGM1345	1.85	100.00	0.00	0.00	0.00
BGM1365	1.76	95.26	0.00	0.00	0.00
BGM1464	0.91	96.00	0.00	0.00	0.00
BGM1832	0.91	96.00	0.00	0.00	0.00
BGM1865	0.91	96.00	0.00	0.00	0.00
BGM1867	7.56	89.59	0.00	0.00	0.00
BGM2020	0.91	92.08	0.00	0.00	0.00
Mínimo	0.83	89.59	0.00	0.00	0.00
Máximo	7.56	100.00	0.00	0.00	0.00
Média	1.97	95.11	0.00	0.00	0.00

Tabela 6. Médias observadas para sobrevivência, índice de doença (ω), altura de planta, peso de parte aérea e peso de raiz do grupo ‘Resistente - (G4)’ formado pela análise de cluster.

Resistente - (G4)					
Clone	Sobrevivência	Id (ω)	Altura da planta	Produtividade da parte aérea	Produtividade de raízes
9975-01	79.12	37.07	1.80	17.06	11.23
AipimBrasil	68.34	35.93	1.80	14.33	8.62
BGM0209	66.32	43.16	1.80	20.59	11.38
BGM0341	79.12	13.60	1.78	17.50	5.75
BGM0398	69.55	51.34	1.93	27.03	12.71
BGM0436	79.12	31.80	1.81	11.01	12.25
BGM0444	72.77	23.97	1.83	12.10	11.95
BGM0501	82.06	25.81	1.78	12.17	13.23
BGM0590	79.12	34.05	1.91	15.96	7.33
BGM0624	82.06	42.82	1.91	13.71	14.59
BGM0642	73.24	46.05	1.90	12.00	10.67
BGM0659	82.44	52.88	2.04	20.22	14.26
BGM0678	82.06	31.42	1.66	10.53	12.47
BGM0878	88.89	13.21	1.40	11.70	8.74
BGM1171	90.88	11.37	1.91	17.49	12.56
BGM1190	85.00	46.40	1.93	11.10	11.67
BGM1206	83.04	27.05	2.04	21.16	6.36
BGM1452	59.87	24.98	1.56	14.87	8.66
BGM1668	82.44	28.80	1.67	9.79	9.90
BGM2038	81.08	40.12	1.78	16.30	12.08
BGM2169	63.10	52.10	1.88	14.82	13.50
Eucalipto	63.10	24.62	2.08	12.08	13.81
IAC90	88.89	7.80	1.57	10.12	13.61
BRS Kiriris	61.48	48.65	2.08	18.31	17.88
Mínimo	59.87	7.80	1.40	9.79	5.75
Máximo	90.88	52.88	2.08	27.03	17.88
Média	76.80	33.13	1.83	15.08	11.47

Tabela 7. Médias observadas para sobrevivência, índice de doença (ω), altura de planta, peso de parte aérea e peso de raiz do grupo ‘Suscetível - (G5)’ formado pela análise de cluster.

Suscetível - (G5)					
Clone	Sobrevivência	Id (ω)	Altura da planta	Produtividade da parte aérea	Produtividade de raízes
9655-02	5.67	94.04	1.68	1.15	1.59
BGM0083	27.64	82.23	2.01	2.41	0.26
BGM0148	4.64	94.82	1.45	0.42	0.06
BGM0190	11.52	91.02	1.57	1.35	0.02
BGM0205	5.07	92.98	1.49	1.19	0.06
BGM0249	26.75	82.77	1.81	5.85	2.19
BGM0279	15.18	84.87	1.91	1.50	1.86
BGM0376	10.43	83.89	1.52	1.34	2.23
BGM0408	19.94	89.80	1.52	4.88	1.64
BGM0465	8.56	92.30	1.72	0.77	0.55
BGM0511	17.97	81.97	1.93	3.76	0.18
BGM0512	11.52	90.54	1.87	1.48	0.05
BGM0541	5.67	92.63	1.82	0.63	1.55
BGM0544	10.43	90.12	1.86	1.05	1.66
BGM0550	17.97	88.11	1.86	1.64	0.05
BGM0552	6.60	95.84	1.51	1.67	0.49
BGM0563	14.74	95.63	1.43	1.65	0.07
BGM0579	19.94	89.80	1.66	8.07	1.67
BGM0664	8.30	93.45	1.45	1.88	0.15
BGM0706	12.48	91.85	1.89	2.09	0.56
BGM0776	5.67	92.08	1.76	1.22	2.30
BGM0822	19.94	90.12	1.39	6.06	2.22
BGM0868	15.18	92.08	1.67	4.61	3.19
BGM0876	10.43	84.44	1.75	1.13	1.55
BGM1138	15.18	85.21	2.00	1.51	2.61
BGM1163	34.21	83.25	1.69	3.97	3.20
BGM1174	5.67	87.49	1.89	2.75	2.96
BGM1185	11.50	89.08	2.19	1.32	0.54
BGM1202	16.40	86.58	1.84	7.01	2.35
BGM1318	8.30	96.10	1.54	2.45	0.05
BGM1324	14.74	88.33	1.81	2.69	0.07
BGM1344	11.52	93.08	1.84	4.70	2.34
BGM1440	8.30	97.72	1.51	1.96	0.05
BGM1482	5.67	92.08	1.32	0.59	1.55
BGM1590	7.07	91.01	2.04	2.09	2.39
BGM1942	15.18	78.94	1.49	1.35	1.57
BGM2061	1.75	100.00	2.05	0.30	0.01
BGM2066	8.30	92.10	1.30	1.72	0.17
BGM2083	24.41	82.03	1.68	4.55	3.56
Fécula Branca	12.48	83.98	1.77	1.93	0.98
Formosa Irará	14.74	84.40	1.63	3.69	1.11
Mani Branca	5.67	93.72	1.42	0.58	1.55
Poti Branca	13.64	92.36	1.68	3.22	0.05
	8.56	91.97	1.70	4.32	1.77
Mínimo	1.75	78.94	1.30	0.30	0.01
Máximo	34.21	100.00	2.19	8.07	3.56
Média	12.63	89.70	1.70	2.51	1.25

CAPÍTULO 3

ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRIPTOMA DE RAÍZES DE MANDIOCA INFECTADAS REVELAM GENES CANDIDATOS À RESISTÊNCIA À PODRIDÃO RADICULAR

ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRIPTOMA DE RAÍZES DE MANDIOCA INFECTADAS REVELAM GENES CANDIDATOS À RESISTÊNCIA À PODRIDÃO RADICULAR

Autora: Camila Santiago Hohenfeld

Orientadores: Dra. Adriana Rodrigues Passos

Dr. Eder Jorge de Oliveira

Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

Resumo – As podridões radiculares, incitadas por patógenos habitantes de solo, são um problema grave para a mandiocultura por atingir diretamente o seu produto comercial, onde o uso de cultivares resistentes é o método de controle mais eficaz e ambientalmente sustentável para seu manejo. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi analisar o transcriptoma, por meio da técnica RNASeq, de dois genótipos de mandioca contrastantes em resposta à infecção por podridão radicular, compreender a resposta transcriptômica do genótipo resistente e identificar genes candidatos para resistência à doença. Mudanças de dois genótipos de mandioca, com comportamento contrastantes (resistente e suscetível) à podridão radicular, foram plantadas em solo infestado (inoculado) e em solo esterilizado (não inoculado). As respostas temporais pós-infeccionais foram agrupadas em dois momentos após o plantio em solo infestado: (i) ‘Tempo Inicial’: formado por um “mix” de amostras obtidas aos 5, 10, 15 e vinte dias após o plantio (DAP); e (ii) ‘Tempo Final’: formado por “mix” de amostras coletadas aos 30; 45 e 60 DAP. Como testemunha dos experimentos (controle), foram utilizadas amostras de plantas antes do plantio em solo infestado (controle absoluto) e plantas crescidas em solo esterilizado (controle relativo), estas foram coletadas nas mesmas condições e tempos descritos para os tratamentos inoculados. Foi observada a presença de estruturas típicas de patógenos em todos os tempos de coleta tanto no genótipo resistente quanto no suscetível, no entanto, a infecção no genótipo resistente não impediu a expansão do seu sistema radicular. Por outro lado, no genótipo suscetível, foi verificada a presença de estruturas do patógeno a partir dos 15 dias após o plantio e uma redução do seu sistema radicular a partir deste momento. Com base na análise da expressão diferencial de genes (DEGs), 23.912 genes estavam diferencialmente expressos no genótipo resistente. Dentre esses, 10.307 foram diferencialmente expressos (DE) no tratamento “Controle” (5.165 regulados negativamente e 5.142 regulados positivamente). Para o momento “Tempo Inicial” houve apenas 15 genes DE, sendo cinco regulados negativamente e dez regulados positivamente. Para o momento “Tempo Final”, foram detectados 366 genes DE, sendo 235 regulados negativamente e 131 regulados positivamente. A resposta inicial à infecção não apresentou termos GOs (Gene Ontology) significativamente enriquecidos. Por outro lado, no tempo final da avaliação, houve o enriquecimento de termos GOs relacionados à atividade de peptidase do tipo serina, resposta a estímulo de calor e resposta a estímulo de peróxido de hidrogênio. A partir da análise funcional dos DEGs, um total de 18 genes candidatos constitutivos foram selecionados e a validação dos mesmos possibilitará o uso de marcas moleculares funcionais associadas à resistência à podridão radicular da mandioca.

Palavras-Chave: RNA-Seq; melhoramento; *Manihot esculenta*; doenças de solo.

COMPARATIVE ANALYSIS OF INFECTED CASSAVA ROOT TRANSCRIPTOMES REVEALS CANDIDATE GENES FOR ROOT-ROT RESISTANCE

Author: Camila Santiago Hohenfeld

Advisors: Dra. Adriana Rodrigues Passos

Dr. Eder Jorge de Oliveira

Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

Abstract - Root rot, incited by soil-dwelling pathogens, is a serious problem for mandiocultura because it directly affects the commercial product, where the use of resistant cultivars is the most effective and environmentally sustainable management method for its control. Thus, the objective of this work was to analyze the transcriptome, through the RNASeq technique, of two contrasting manioc genotypes in response to root rot infection, to understand the transcriptomic response of the resistant genotype and to identify candidate genes for disease resistance. Seedlings of two manioc genotypes, with contrasting behavior (resistant and susceptible) to root rot, were planted in infested soil and in sterilized soil. The post-infectious temporal responses were grouped in two moments after planting in infested soil: (i) 'Initial Time': formed by a "mix" of samples obtained at 5, 10, 15 and 20 days after planting (DAP); and (ii) 'Final Time': formed by a "mix" of samples collected at 30, 45 and 60 DAP. As a witness of the experiments (control), plant samples were used before planting in infested soil (absolute control) and plants grown in sterilized soil (relative control), these were collected in the same conditions and times described for the inoculated treatments. The presence of typical pathogen structures was observed at all times of collection in the resistant genotype, however, the infection did not prevent the expansion of its root system. On the other hand, in the susceptible genotype, the presence of pathogen structures was verified from 15 days after planting and a reduction of its root system from this moment on. Based on the analysis of the differential expression of genes (DEGs), 23,912 genes were differentially expressed in the resistant genotype. Among these, 10,307 were differentially expressed (SD) in the "Control" treatment (5,165 negatively regulated and 5,142 positively regulated). For the moment "Initial Time" there were only 15 genes ED, being five negatively regulated and ten positively regulated. For the "Final Time" moment there were 366 SD genes, of which 235 were negatively regulated and 131 were positively regulated. The initial response to infection did not present significantly enriched GOs (Gene Ontology) terms. On the other hand, in the final time of evaluation, there was enrichment of GOs terms related to serine-type peptidase activity, response to heat stimulus and response to hydrogen peroxide stimulus. From the functional analysis of DEGs, a total of 18 constitutive candidate genes were selected and their validation will enable the use of functional molecular markers associated with resistance to cassava root rot.

Key words: RNA-seq; breeding; *Manihot esculenta*; soil-borne diseases.

1. INTRODUÇÃO

Eleita pela Organização das Nações Unidas (ONU) como o alimento do século XXI, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das mais importantes culturas na África, Ásia e América Latina. A sua importância econômica e social está atrelada às suas características agrônomicas favoráveis, como tolerância a estresses abióticos. Além disso, a cultura da mandioca é de fácil adaptação a ambientes adversos, utilizada como estratégia na mitigação da pobreza e diminuição do êxodo rural, e mais recentemente tem despertado o interesse dos negócios agrícolas devido os múltiplos usos do amido para fins industriais (FAO, 2018).

A ocorrência de doenças de etiologia fúngica, bacteriana e viral está entre os fatores bióticos que mais limitam a produtividade da mandioca. Em reconhecimento à importância da cultura como fonte de carboidratos e o seu valor como matéria-prima para uso industrial, as perdas resultantes das doenças não são apenas uma questão agrícola, mas representam uma grave ameaça para a segurança alimentar e desenvolvimento econômico dos países produtores (MCCALLUM et al., 2017).

As podridões radiculares, relatada principalmente no Brasil e nos países do continente Africano, é uma doença que afeta diretamente o produto comercial da mandioca (AWOYEMI et al., 2016; VILAS-BOAS et al., 2017; AKROFI et al., 2018; BOARI et al., 2018, BRITO et al., 2019, BRITO et al., 2020). Causadas por patógenos habitantes do solo, reduz drasticamente a qualidade e a quantidade das raízes produzidas, além de inutilizar as áreas para plantio ao longo dos ciclos da cultura (NOTARO, 2013; AKROFI et al., 2018). Estão relacionadas a diferentes espécies de fitopatógenos e a sintomatologia difere a depender da espécie como: (i) podridão-mole: causada por oomicetos dos gêneros *Phytophthora*, *Pythium* e *Phytopythium*; (ii) a podridão-seca: causada por fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* e além da espécie *Macrophomina pseudophaseolina*; (iii) e podridão-negra: associada a espécies da família Botryosphaeraeae. (MACHADO et al., 2014; VILAS-BOAS et al., 2017; BOARI et al., 2018, BRITO et al., 2019, BRITO et al., 2020). Estes fitopatógenos constituem um problema de difícil controle, uma vez que podem produzir estruturas de resistência que permitem a sobrevivência no solo por vários anos na ausência de hospedeiros (MIHAJLOVIĆ et al., 2017).

As doenças incitadas por patógenos habitantes de solo são um problema grave para a agricultura, por comporem um ambiente com interações complexas de difícil manejo (GAO et al., 2014; DAGUERRE et al., 2014; FACELLI et al., 2018). Estudos diversos relataram o uso de diferentes métodos de controle para estas doenças, incluindo: rotação de culturas, desinfestação do solo com vapor, solarização do solo, controle alternativo por extratos e óleos

vegetais, uso de agentes de controle biológico e controle químico (BARROS et al., 2014; HUANG et al., 2015; SILVA et al., 2017; MIHAJLOVIĆ et al., 2017; FREITAS et al., 2019). Entretanto, o emprego da resistência genética é considerado o método mais econômico e confiável para o manejo da podridão radicular da mandioca, por ser uma estratégia de maior durabilidade, menor impacto ambiental e não onerar os custos de produção (ONYEKA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013; AWOYEMI et al., 2016; VILAS BOAS et al., 2016).

Ultimamente a identificação de fontes de resistência à podridão radicular em mandioca tem sido realizada por meio de inoculações em raízes destacadas, hastes e folhas. No entanto, os estudos demonstram que existe diferença entre os mecanismos de resistência nos diferentes tecidos da planta (VILAS-BOAS et al., 2016; BRITO et al., 2017; SANTIAGO et al., 2018). Estes resultados evidenciam que a resistência à podridão radicular pode ter um padrão quantitativo, controlada por genes de efeitos secundários, cuja herança é caracterizada pela ausência de resistência completa ou qualitativa (BRITO et al., 2017).

Nesse sentido, a chance de sucesso na obtenção de cultivares com resistência a esta doença está diretamente ligada ao conhecimento dos aspectos genéticos relativos às interações deste patossistema (SINGH et al., 2015). O largo desenvolvimento da biologia molecular e da bioinformática, associados aos avanços na fisiologia vegetal e bioquímica nos últimos anos, tem contribuído para o entendimento de como as plantas respondem a estresses bióticos e quais os mecanismos responsáveis pelas diferenças na resistência observada (LI et al., 2012).

Entre esses avanços, o sequenciamento do RNA total (RNA-Seq) foi considerado uma ferramenta revolucionária para transcriptômica, por ser o primeiro método baseado em sequenciamento que permite que todo o transcriptoma seja pesquisado de maneira quantitativa e de alto rendimento com quantificação dos níveis de expressão variáveis de cada transcrição sob diferentes condições de estresse (MOROZOVA et al., 2009; WANG et al., 2009).

A disponibilização de um genoma de referência da mandioca (PROCHNIK et al., 2012) possibilitou novas oportunidades para se realizar a caracterização da resposta do transcriptoma, com base em dados de sequenciamento de RNA total, para algumas doenças da cultura, como antracnose, bacteriose e vírus do castanho listrado da mandioca – *Cassava brown streak disease* (UTSUMI et al., 2016; ANJANAPPA et al., 2017). Entretanto, em nível transcricional não existem estudos disponíveis sobre a resposta dos genótipos de mandioca à infecção por patógenos causadores da podridão radicular.

O uso de ferramentas biotecnológicas para estudo desse patossistema tem sido pouco explorado na cultura da mandioca. Os poucos estudos desenvolvidos até o momento focaram na seleção genômica ampla - GWAS (BRITO et al., 2017) e análises semi-quantitativas por

RT-PCR (LIMA et al., 2018), os quais identificaram possíveis genes envolvidos nos mecanismos de defesa à podridão radicular, utilizando a metodologia *in vitro* de inoculação em raiz destacada. Entretanto, para o entendimento dos mecanismos de defesa da mandioca à podridão radicular, é necessário uma avaliação mais próxima da dinâmica em campo, que permita compreender os aspectos genéticos da resistência à doença e corrobore com os estudos epidemiológicos. A técnica de RNAseq possibilita o entendimento da variação em nível de expressão dos transcritos dos genótipos considerados resistentes em relação aos genótipos suscetíveis nos diferentes ambientes, o que permite uma análise mais refinada quanto a identificação e escolha de genes candidatos à resistência a doenças.

Diante dessa realidade, o objetivo deste trabalho foi analisar o transcriptoma de dois genótipos de mandioca em resposta à infecção por fungos de solo causadores de podridão radicular, compreender a resposta transcriptômica do genótipo resistente em dois momentos de interação e desse modo identificar genes candidatos que desempenham importantes papéis na resistência contra a doença.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido nos Laboratórios de Fitopatologia e no Núcleo de Biologia Avançada (NBA) da Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas – BA. Todos os genótipos utilizados nos ensaios são provenientes do Banco de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

2.1. Material vegetal

Para os testes moleculares foram avaliados os genótipos ‘BRS Kiriris’ e BGM 1345, considerados como resistente e suscetível, respectivamente, às doenças causadas por patógenos de solo. As mudas de mandioca de ambos os acessos foram obtidas a partir do enraizamento do segmento do caule (manivas de 5 cm) em tubetes de 75 mL, contendo vermiculita de granulometria média e substrato comercial (Vivatto). As plantas foram mantidas por 45 dias em câmara térmica com temperatura máxima de 55 °C, promovida pela radiação solar, e umidade relativa de 60%.

2.2. Preparo do inóculo, inoculação e coleta de amostras

Os isolados foram obtidos da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa

Mandioca e Fruticultura. Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA (200 g L⁻¹ de Batata; 20 g L⁻¹ de Dextrose e 20 g L⁻¹ de Ágar) e incubados em B.O.D com temperatura de 25 ± 2°C com 12 horas de luz, durante 7 dias.

Para o cultivo do patógeno foi utilizada a metodologia com grãos de arroz infestados, previamente umedecidos com água (100 mL de água/ 50 g de arroz) por dez minutos, posteriormente a água residual foi removida e os sacos plásticos transparentes com 500g de arroz foram esterilizados em autoclave por vinte minutos a 120 °C. Após o resfriamento, foram adicionados 30 mL de suspensão do mix de patógenos, incubados em BOD por um período de sete dias, a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas e umidade 70 % ± 10, para a multiplicação dos fungos. Os sacos plásticos foram agitados diariamente para se obter uma colonização homogênea do substrato pelos fungos.

Para a inoculação, sacos plásticos para mudas (2kg) foram preenchidos com solo infestado (coletado de área com incidência da doença) misturados com 100g de grãos de arroz infestado pelos agentes causais da podridão radicular (6 x 10⁵ conídios mL⁻¹). Para o tratamento controle, os sacos plásticos para mudas foram preenchidos com solo arenoso, retirado de uma área não cultivada. Este solo foi esterilizado em autoclave duas vezes a uma temperatura de 120°C, por uma hora, com um intervalo de 24 horas entre os procedimentos de autoclavagem.

Após 45 dias do plantio, as mudas (todas enraizadas) foram transplantadas para os sacos contendo solo infestado (Tratamento 1) e solo não infestado esterilizado (Tratamento 2). O ensaio foi mantido em casa de vegetação e as mudas irrigadas com água destilada a cada dois dias.

As amostras foram coletadas em oito tempos diferentes: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 dias após a inoculação, escolhidos com base na dinâmica da doença em campo (Capítulo 2). Para cada tempo de coleta foram utilizadas nove plantas inoculadas/nove controles para análise molecular. As raízes das plantas foram destacadas da haste, lavadas em água destilada autoclavada, e em seguida, embaladas em papel alumínio autoclavado, identificadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C).

2.3.Extração de RNA total

A extração de RNA seguiu o protocolo CTAB (CTAB a 2%; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 50 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M), autoclavado por 20 minutos a 120 °C. No momento de uso, foi adicionado PVP-40 a 2% e sulfito de sódio a 1%.

O RNA total foi extraído de raízes das plantas de mandioca inoculadas e não inoculadas,

no qual 75 mg de tecido foi macerado em nitrogênio líquido e adicionado 1,5 mL de tampão de CTAB em um microtubo de 2,0 mL, e em seguida, incubada em temperatura ambiente (26 ± 2 °C) por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 Rpm por 5 min e 800 µL do extrato foram coletados e transferidos para microtubos de 2,0 mL, onde em seguida foram adicionados 800 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1 v: v), agitados em vórtex e a mistura centrifugada por 13.000 Rpm por 10 min. O sobrenadante (600 µL) foi transferido para um novo microtubo (1,5 mL) e 360 µL de isopropanol foram adicionados, e os microtubos mantidos a -20 °C por 20 min. As amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min e o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado com etanol a 70% (700 µL), mantidos a -20 °C por 10 min e centrifugado a 13.000 Rpm por 10 min. O etanol foi descartado e o pellet foi deixado secar à temperatura ambiente.

Para conferir a integridade e a concentração do RNA total, as amostras foram observadas por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão 1X SB (10 mM NaOH pH 8,5; ajustado com ácido bórico) a 3 V cm^{-1} , aplicando-se uma alíquota de 2 µl do RNA total de cada amostra.

Para a digestão do DNA contaminante, 700 ng de RNA total de cada amostra foi tratado com a enzima DNase I (Fermentas). Foi utilizado 1 U μL^{-1} de DNase acrescida do tampão apropriado, 1 U de *RNAseout* (Invitrogen) e água ultrapura (Mili-Q) estéril tratada com 0,01% DEPC para um volume final de 20 µl. A reação foi incubada no termociclador *Applied Biosystems* (Modelo Veriti) a 37 °C por 40 min. Em seguida foi adicionado 2 µl de 25 mM EDTA, incubado a 65°C por 10 min, seguido de resfriamento a 4°C. Uma metade do volume do RNA total tratado foi utilizada para a síntese de cDNA e a outra metade armazenada em ultrafreezer (-80 °C).

2.4.Construção das bibliotecas e sequenciamento do RNA

As análises do perfil transcricional por RNAseq dos tratamentos derivaram de um *pool* equimolar, sendo considerado controle absoluto (tempo 0), tempos iniciais (5, 10, 15 e 20 dias após a inoculação) e tempos finais (30, 45 e 60 d.a.i).

Foram construídas bibliotecas de cDNA com os dois genótipos ('BRS Kiriris' e BGM1345) sob inoculação com o patógeno (solo infestado) e sem inoculação (solo esterilizado), nos tempos iniciais e finais, além do controle absoluto. Cada tratamento teve duas réplicas biológicas, totalizando 20 bibliotecas.

As etapas seguintes foram realizadas por meio de uma prestação de serviço da empresa *Cofactor Genomics* (San Luis, Missouri, EUA):

- **Sequenciamento das 20 bibliotecas** - Os perfis de expressão gênica foram obtidos com base na técnica de RNA-Seq, que permitiu a quantificação e identificação dos genes diferencialmente expressos potencialmente relacionados à resistência à podridão radicular.
- **Controle de qualidade e pré-processamento das leituras brutas** - Nesta etapa, foi gerado um diagnóstico da qualidade das sequências. Em seguida, foram removidos diversos tipos de artefatos técnicos\ruídos provenientes do sequenciamento ou da preparação das amostras sequenciadas, as bases de baixa qualidade nas extremidades e as sequências remanescentes de adaptadores.
- **Alinhamento das leituras ao partir do genoma de referência** – Para a análise *reference-guided*, os resultados do sequenciamento (*reads*), foram alinhados contra o genoma da mandioca (BREDESON et al., 2016) , e a contagem de leituras mapeadas em cada gene foi usada para medir a sua expressão.
- **Obtenção de matriz de contagem** – Por fim, foi montada uma matriz com as contagens dos fragmentos mapeados de cada gene, em cada amostra. Em seguida, esta tabela foi utilizada para a análise da expressão diferencial de genes.

2.5. Análise da expressão gênica diferencial entre os tratamentos

Após a obtenção da matriz de contagens, a análise da expressão gênica diferencial foi realizada com o auxílio do pacote “*edgeR*”, obtido do repositório *Bioconductor* disponível no *software* livre R (<https://www.r-project.org/>).

Inicialmente, para cada genótipo, as amostras foram classificadas em cinco tratamentos: Controle, Sadio Inicial, Infestado Inicial, Sadio Final e Infestado Final. Em seguida, foi realizada a análise de escalonamento multidimensional (*multidimensional scaling*, ou MDS), na qual foi possível inferir sobre a variabilidade das amostras, separando as variâncias técnicas e biológicas. Essa variância é baseada na diferença de expressão dos 500 genes mais diferencialmente expressos entre os genótipos analisados. Isto é representado a partir de distâncias calculadas com base nos níveis de expressão gênica.

A partir da classificação das amostras, os níveis de expressão foram ajustados com o uso de um modelo linear generalizado - *glmLRT* (*generalized linear model - Likelihood Ratio Test*), baseado na distribuição binomial negativa, a qual modela a dispersão dos dados ao incluir parâmetros distintos para média e variância. Na sequência, foram realizadas as comparações entre os tratamentos contrastantes:

1. **Controle Absoluto:** ('BRS Kiriris' Controle – BGM1345 Controle);
2. **Tempo Inicial:** [(‘BRS Kiriris’ Infestado Inicial – ‘BRS Kiriris’ Sadio Inicial) – (BGM1345 Infestado Inicial - BGM1345 Sadio Inicial)];
3. **Tempo Final:** {[('BRS Kiriris' Infestado Final – ‘BRS Kiriris’ Infestado Inicial) – ('BRS Kiriris' Sadio Final – ‘BRS Kiriris’ Sadio Inicial)] – [(BGM1345 Infestado Final – BGM1345 Infestado Inicial) – (BGM1345 Sadio Final - BGM1345 Sadio Inicial)]}.

Para cada contraste o teste de expressão diferencial baseou-se no teste de razão de verossimilhanças (LUN et al. 2016). Por fim, para controlar a ocorrência de falsos positivos e aprimorar a escolha dos genes significativos, empregou-se a correção de múltiplos testes por meio do *False Discovery Rate – FDR* ($p\text{-value} \leq 0.05$) (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

Desse modo, foi obtida a quantidade de genes diferencialmente expressos, ativados ou reprimidos, entre os tratamentos comparados. Com esses dados, foi possível gerar os gráficos do tipo *mean-difference*, que relaciona o *log fold-change* (log FC), que representa as diferenças relativas entre grupos, com o nível médio de expressão dos genes, mensurado pelo logaritmo médio das contagens por milhão (log CPM).

Para cada um dos três tratamentos foi gerada uma lista de genes diferencialmente expressos entre a variedade resistente em relação à variedade suscetível. Os três grupos de genes foram então comparados e ilustrados em um diagrama de Venn com o uso do pacote “*VennDiagram*”, implementado no software R 3.5.2 (R Development Core Team, 2018) que permitiu visualizar a quantidade de genes exclusivos por tratamento, comuns entre pares de tratamentos, ou compartilhados entre os três tratamentos.

2.6. Avaliação funcional dos genes diferencialmente expressos

Após a identificação dos genes com expressão aumentada (*up-regulated*) ou diminuída (*down-regulated*), foram mapeados os processos biológicos e moleculares que estão sendo modulados em resposta às mudanças na qual os genótipos se encontravam (condições de solo e tempo de interação\patossistema).

Foram realizadas análises baseadas em ontologia gênica (Gene Ontology - GO) com os

softwares Blast2Go (CONESA et al., 2005; <http://www.blast2go.com/b2ghome/>), e ontologia hierárquica com o software MapMan (THIMM et al., 2014; www.mapman.gabipd.org/). Para estas etapas foi utilizado como base o arquivo de anotação funcional do genoma de referência da mandioca v6.1 (BREDESON et al., 2016) e as ontologias apropriadas do MERCATOR v.3.6 (LOHSE et al. 2014), que são baseadas em informações contidas em bancos de dados de anotação funcional, em escala de genoma, de dados de sequência de plantas. A comparação dos valores de *log fold-change* dos genes diferencialmente expressos em cada condição (Controle, Tempo Inicial e Tempo Final) e a função molecular de cada gene DE foram apresentados na forma de *heatmap*, construído com o auxílio do pacote “*pheatmap*”, também implementado no R 3.5.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018).

2.7. Genes candidatos

Para seleção e indicação de genes a serem validados, foram utilizados três critérios: (i) - genes co-expressos no tratamento “Controle”, ou seja, a planta na sua condição natural e no tratamento de plantas inoculadas (Tempo inicial e final da interação); (ii) - o diferencial de expressão *Log2 Fold-Change*, selecionando apenas os genes superexpressos (*up-regulated*) e por fim, (iii) – a seleção de genes com potencial relevante para vias de sinalização ou respostas de defesa direta de plantas a patógenos, com base na busca mais aprofundada sobre as funções por meio da plataforma UniProt (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2014).

3. RESULTADOS

3.1. Incidência da doença

O método de inoculação de mudas em solo infestado resultou em sintomas característicos da doença, como murcha e amarelecimento das folhas, em um período médio de 20 dias (Figura 1: A e B) após a inoculação (d.a.i), nos dois genótipos avaliados, culminando com a morte de plantas, do BGM 1345, aos 30 d.a.i, enquanto as testemunhas não apresentaram nenhum sintoma de podridão radicular. Em todas as avaliações foi realizado o isolamento dos patógenos causadores de podridão radicular, nos tecidos das mudas transplantadas em solo infestado e não infestado, completando os postulados de Koch.



Figura 1. Planta do genótipo de mandioca BGM-1345 aos 20 dias após o plantio em solo não infestado (A). Planta de mandioca, com sintoma externo de murcha, 20 dias após o plantio em solo infestado por podridão radicular (B).

Por meio do método de clarificação dos fragmentos radiculares e coloração das estruturas fúngicas com azul de Trypan, foi possível observar diferença entre as variedades e entre os tratamentos quanto à colonização das raízes.

Não foram detectadas estruturas fúngicas nas raízes das duas variedades, no tratamento “Controle Absoluto – Tempo 0”. Indicativo de que as plantas foram transplantadas saudáveis, sem colonização por patógenos, para o solo infestado e não infestado (Figura 2: A,B,C e D).

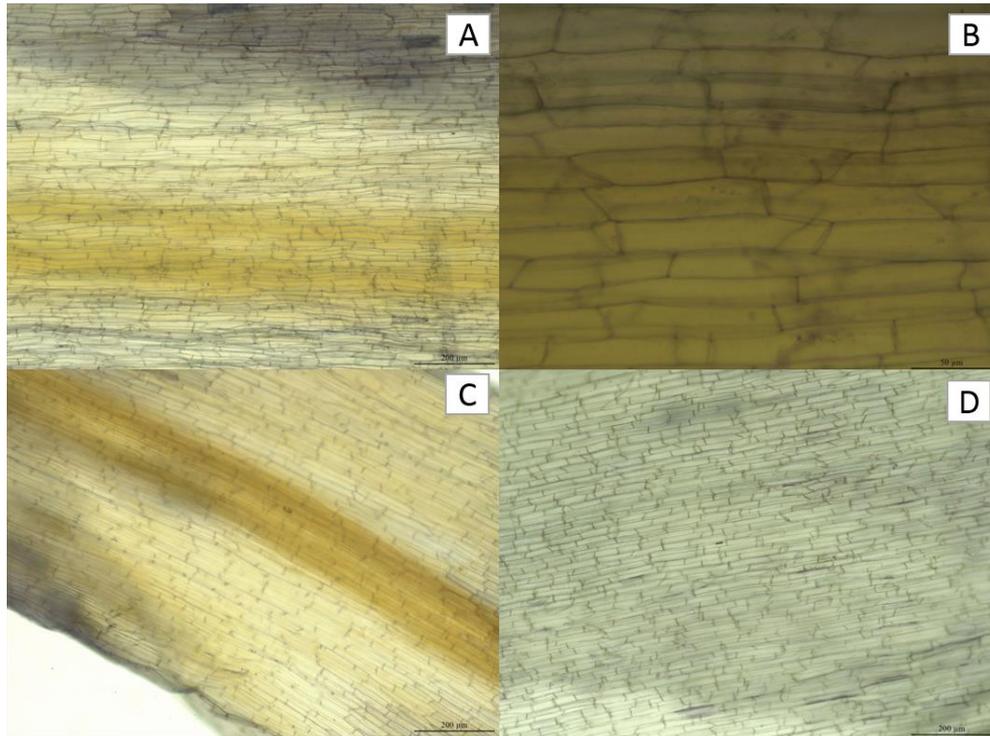


Figura 2. Clareamento e coloração de raízes dos genótipos de mandioca BGM 1345 (A e B) e ‘BRS Kiriris’ (C e D), mostrando ausência de estruturas fungicas nas raízes, no tratamento controle absoluto.

Não foram encontradas estruturas fúngicas em ambas as variedades nas raízes coletadas em solo não infestado. Entretanto, ao avaliar os fragmentos de raízes da variedade ‘BRS Kiriris’ (resistente), em solo infestado, verificou-se a colonização por patógenos de podridão radicular, evidenciada pela presença de estruturas típicas, como hifas septadas e esporos de resistência (clamidósporos), em todos os sete tempos de coleta (Figura 3). Com relação ao genótipo BGM-1345(suscetível), a coloração de raízes não demonstrou estruturas de patógenos nos três tempos iniciais de coleta (5 e 10 dias), no entanto, foi verificada a presença de estruturas do patógeno, como clamidósporos e hifas, nos tempos 15, 20, 30, 45 e 60 dias após o plantio em solo infestado (Figura 4).

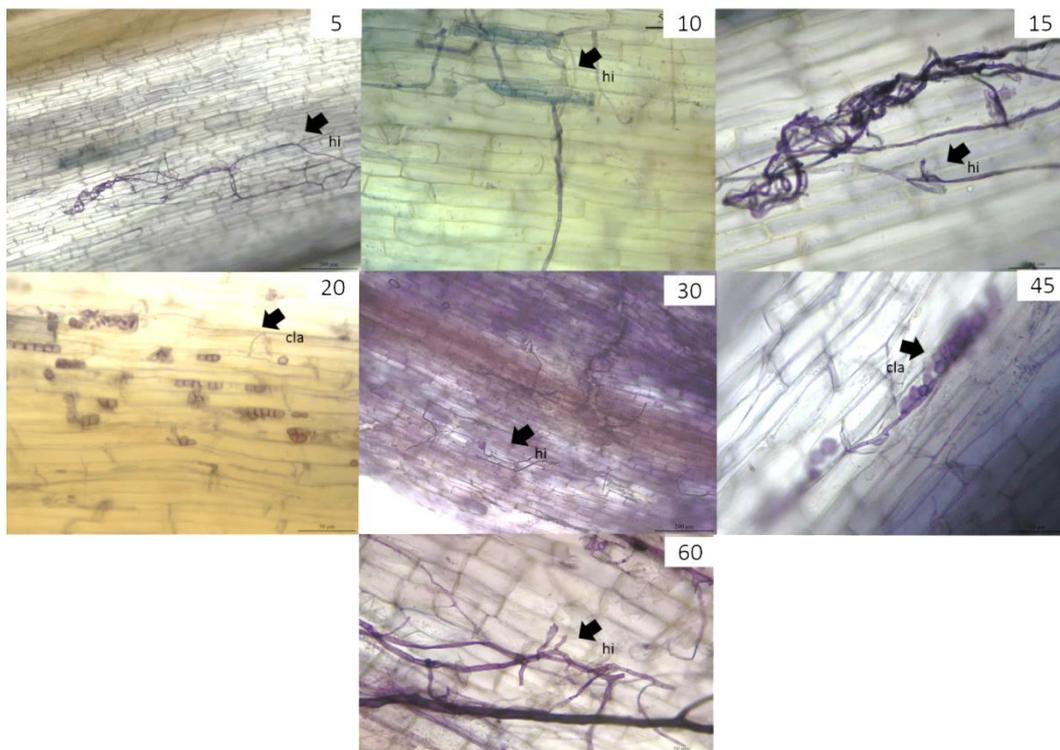


Figura 3. Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em fragmentos de raiz da variedade de mandioca ‘BRS Kiriris’, em sete tempos de coleta após o planto em solo infestado (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 d.a.i.). hi: hifa; cla: clamidósporo.

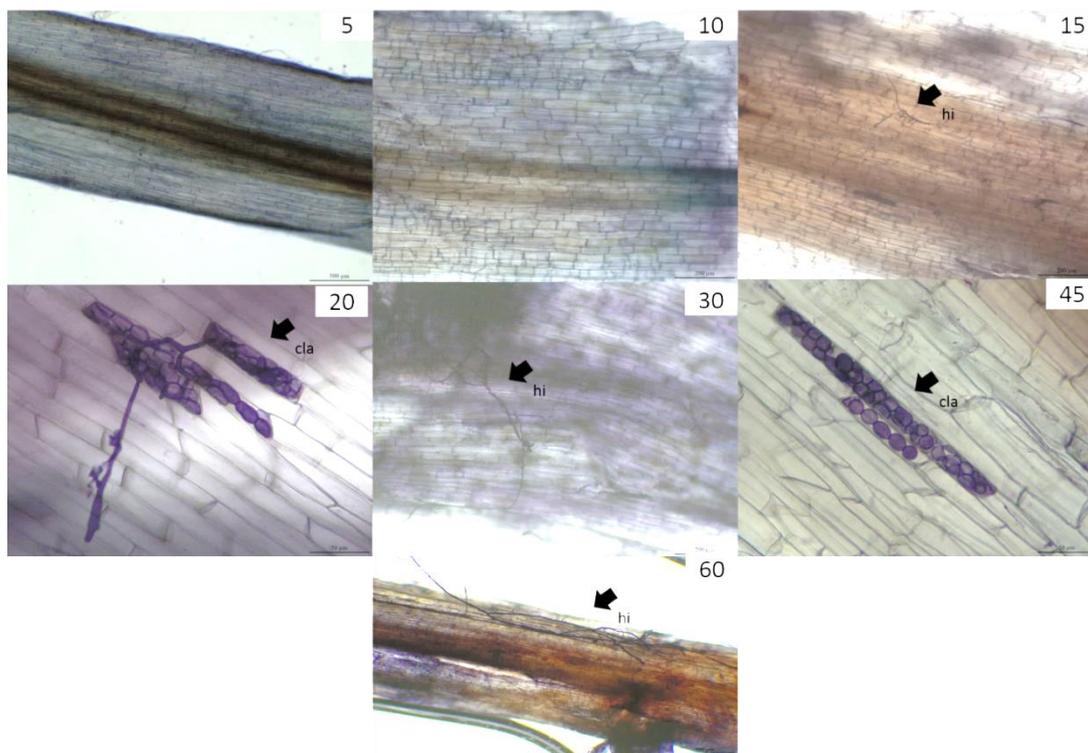


Figura 4. Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em fragmentos de raiz do genótipo de mandioca BGM1345, em sete tempos de coleta após o planto em solo infestado (5, 10, 15,

20, 30, 45, 60 d.a.i.). hi: hifa; cla: clamidósporo.

Foi possível também observar diferença entre os genótipos quando avaliados o peso fresco de raiz (g) nos diferentes tempos de coleta (Figura 5). No período inicial, até 15 dias após o plantio em solo infestado, os genótipos não diferiram quanto ao peso de raiz. A partir de 20 dias, o BGM-1345(suscetível), apresentou uma redução significativa do sistema radicular, enquanto a variedade ‘BRS Kiriris’ (resistente) se manteve com crescimento constante do sistema radicular.

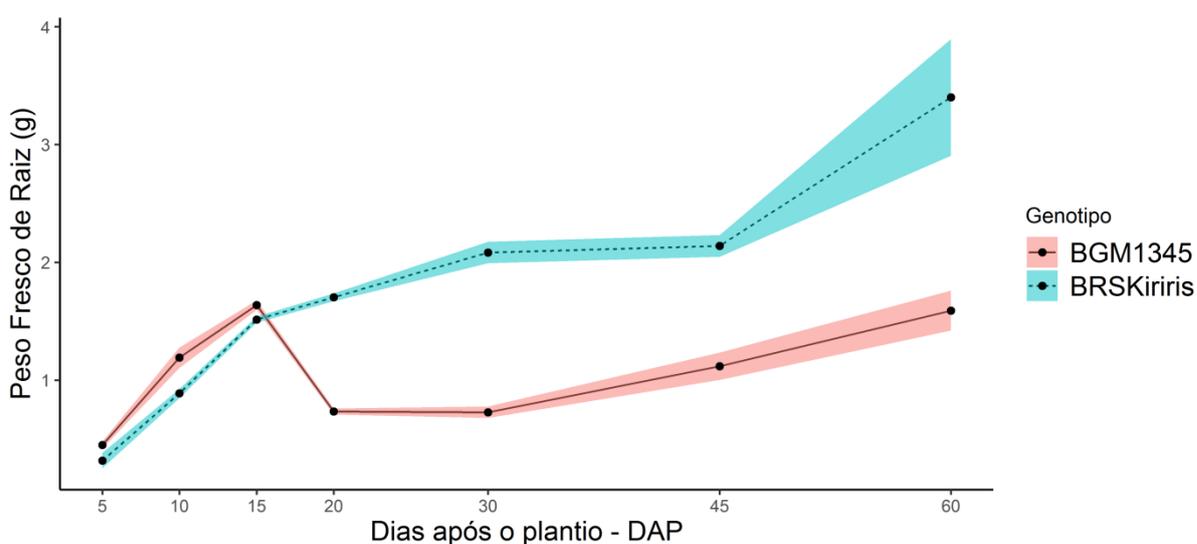


Figura 5. Acompanhamento do peso fresco (g) de raiz dos genótipos ‘BRS Kiriris’ e BGM 1345 quando plantadas em solo infestado com patógenos de podridão radicular durante 5 a 60 dias do plantio.

Devido ao decréscimo em comparação aos tempos iniciais, é provável que o processo de infecção, a partir dos 15 dias, tenha provocado a mortalidade das raízes do genótipo suscetível (BGM-1345). As plantas não conseguiram emitir novas raízes em solo infestado com a doença, culminando na redução de suas raízes, o que não foi observado na variedade resistente (‘BRS Kiriris’).

3.2. Análise do perfil transcriptômico via RNAseq

Foi analisada a expressão diferencial dos genótipos ‘BRS Kiriris’ e BGM-1345, sob infecção por podridão radicular, em diferentes condições experimentais (condição do solo e tempo de interação). As transcrições correspondentes às sequências de fungos foram

descartadas e as variações na composição do RNA entre as amostras dos dois genótipos foram comparadas.

O sequenciamento *paired-end* das 20 bibliotecas gerou um total de 1.012.940.297 sequências (*reads*) (Tabela 1), que foram filtradas em relação à qualidade e, que resultaram em 510.218.500 *reads* empregados nas análises subsequentes. Esses *reads* filtrados foram alinhados com os *gene models* e os transcritos de referência da mandioca (BREDESON et al., 2016).

No geral, a distribuição gênica mostrou que a maioria das leituras (média de 69,37 %) foi mapeada para a região de codificação do éxon, além de 11,87 % de transcritos intergênicos.

Houve diferença quanto à quantidade de genes alinhados entre os genótipos contrastantes. Para o genótipo suscetível (BGM-1345) foram alinhados, em média, 29.479.831 genes em condição normal de plantio (controle absoluto), 20.728.585 genes no tempo inicial da interação, após o plantio em solo infestado, e 20.154.412 genes no tempo final da interação. Enquanto o resistente apresentou 34.594.850 genes condição normal de plantio, 25.194.515 genes no tempo inicial e 26.459.295 genes no tempo final. Em média, 50,16% das leituras foram mapeadas com os transcritos de referência da mandioca. Posteriormente esses genes foram utilizados para a análise da expressão gênica diferencial.

Tabela 1. Descrição do número total de fragmentos sequenciados, filtrados e alinhamento para cada biblioteca.

Biblioteca	Sequências (READS)						Alinhados	
	Réplica	Total	Exônicos	Intrônicos	Intergênicos			
BGM1345 - SOLO SADIO (Tempo: Inicial)	1	47.460.062	71.10%	18.50%	10.40%	23.451.517	49.41%	
	2	49.479.248	71.60%	18.70%	9.70%	26.813.088	54.19%	
BGM1345 - SOLO INFESTADO (Tempo: Inicial)	1	48.386.335	72.20%	17.70%	10%	20.677.745	42.74%	
	2	48.711.663	71.50%	18.20%	10.20%	20.779.424	42.66%	
BRSKIRIRIS - SOLO SADIO (Tempo: Inicial)	1	50.647.475	68.30%	18.70%	12.90%	29.052.993	57.37%	
	2	51.507.977	68.40%	19.10%	12.50%	28.211.967	54.77%	
BRSKIRIRIS - SOLO INFESTADO (Tempo: Inicial)	1	46.289.890	69.80%	17.60%	12.60%	24.274.005	52.44%	
	2	48.647.987	70.80%	17.10%	12%	26.115.025	53.68%	
BGM1345 - SOLO SADIO (Tempo: Final)	1	47.166.150	63.80%	22.70%	13.40%	13.534.249	28.70%	
	2	51.223.120	69.60%	18.70%	11.60%	22.760.961	44.44%	
BGM1345 - SOLO INFESTADO (Tempo: Final)	1	53.351.758	67.90%	20%	12%	21.325.645	39.97%	
	2	50.152.538	67.50%	19.50%	12.90%	18.983.179	37.85%	
BRSKIRIRIS - SOLO SADIO (Tempo: Final)	1	49.855.411	71.20%	15.90%	12.90%	25.622.057	51.39%	
	2	50.250.629	73.10%	15.40%	11.40%	27.548.695	54.82%	
BRSKIRIRIS - SOLO INFESTADO (Tempo: Final)	1	50.874.740	67.50%	18.60%	13.90%	26.206.987	51.51%	
	2	51.877.379	66.80%	19%	14.20%	26.711.602	51.49%	
BGM1345 - Controle Absoluto (Tempo 0)	1	53.575.090	73.90%	17.20%	9%	30.826.552	57.55%	
	2	52.640.163	64.70%	23.40%	11.90%	28.133.110	53.45%	
BRSKIRIRIS - Controle Absoluto (Tempo 0)	1	56.040.228	69.60%	18.80%	11.60%	35.479.598	63.32%	
	2	54.802.454	68%	19.70%	12.30%	33.710.101	61.52%	
Total		1.012.940.297				510.218.500		

3.3. Expressão gênica diferencial

Para a análise da expressão gênica diferencial, foi necessário eliminar os genes que não ocorreram com frequência suficiente, a fim de evitar erros de sequenciamento ou informações de baixa confiabilidade. Para tanto, foram selecionados os genes com pelo menos duas contagens por milhão (CPM), totalizando de 23.912 genes mantidos para as próximas etapas.

Após a normalização das contagens das leituras, a confiabilidade dos resultados foi verificada por meio de um escalonamento multidimensional, representando as distâncias dos coeficientes de variabilidade biológica entre todas as amostras. Foi possível avaliar o padrão geral dos transcritos em cada réplica, bem como a relação entre os tratamentos e entre os genótipos (Figura 6).

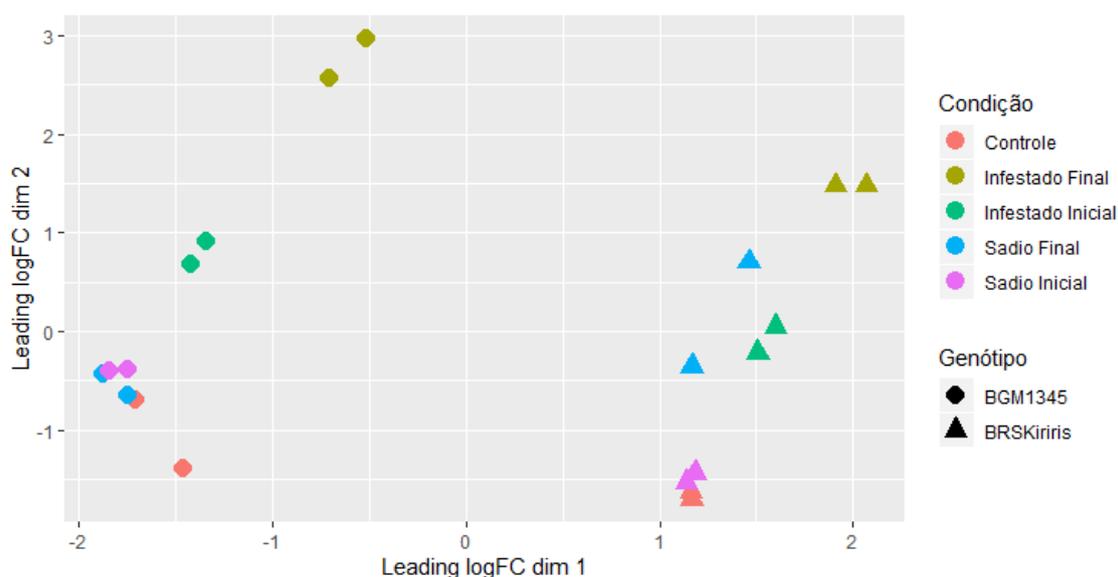


Figura 6. *Multidimensional scaling plot* (MDSPlot) com base nos valores de logFC (*Fold Change*) gerado a partir das contagens das leituras de genótipos BRS Kiriris e BGM-1345, inoculados com podridão radicular.

A partir da análise da primeira dimensão do gráfico foi possível observar uma distância relativa entre as amostras dos genótipos avaliados, independente da condição, indicando uma grande variação biológica entre os seus transcritos. Visto que a ‘BRS Kiriris’ é considerada como resistente e o BGM1345, extremamente suscetível, é provável que a resposta dos dois genótipos à penetração e colonização de patógenos causadores de podridão radicular esteja relacionada a essa diferença basal no perfil transcricional de cada um.

Quanto às condições que foi submetido o experimento, de modo geral, as duas réplicas de cada tratamento permaneceram próximas, indicando que não houve variância biológica entre as amostras sequenciadas de uma mesma condição. Da mesma maneira, levando em consideração o sentido biológico das amostras, como tempo (Inicial e Final) e condição de plantio (Solo Infestado e Solo Sadio), foi possível constatar o efeito inoculação por meio da distância das amostras.

Para o BGM 1345 os tratamentos sem inoculação: “Controle”, “Sadio Inicial”, “Sadio Final” mostraram sobreposição, um indicativo de menor variância entre estes grupos. Desse modo, observa-se que para o genótipo suscetível o tempo não interferiu no seu perfil transcricional. Para a ‘BRS Kiriris’, o “Controle” e “Sadio Inicial” também se sobrepuseram, no entanto o distanciamento do “Sadio Final” indica um efeito do tempo na expressão gênica da variedade.

Entretanto, para os dois genótipos, as amostras pertencentes ao grupo “Infestado Final” apresentaram uma maior distância dos demais, evidenciando o efeito da inoculação. Esta separação, visível na segunda dimensão do gráfico, indica que houve maior diferença na expressão gênica entre este tratamento e os demais, fornecendo evidências de que essas amostras são biologicamente mais distintas.

3.4. Genes diferencialmente expressos

Com base na Figura 7 e na Tabela 2, foi possível observar que dentre os 23.912 genes, 10.307 foram diferencialmente expressos (DE) no tratamento “Controle”, sendo que destes, 5.165 encontram-se reprimidos e 5.142 ativados no genótipo resistente, a ‘BRS Kiriris’. Para o tratamento “Tempo Inicial”, houve apenas 15 genes DE (Anexo), sendo cinco reprimidos e dez ativados, e no tratamento “Tempo Final”, foram detectados 366 genes DE (Anexo), sendo 235 reprimidos e 131 ativados.

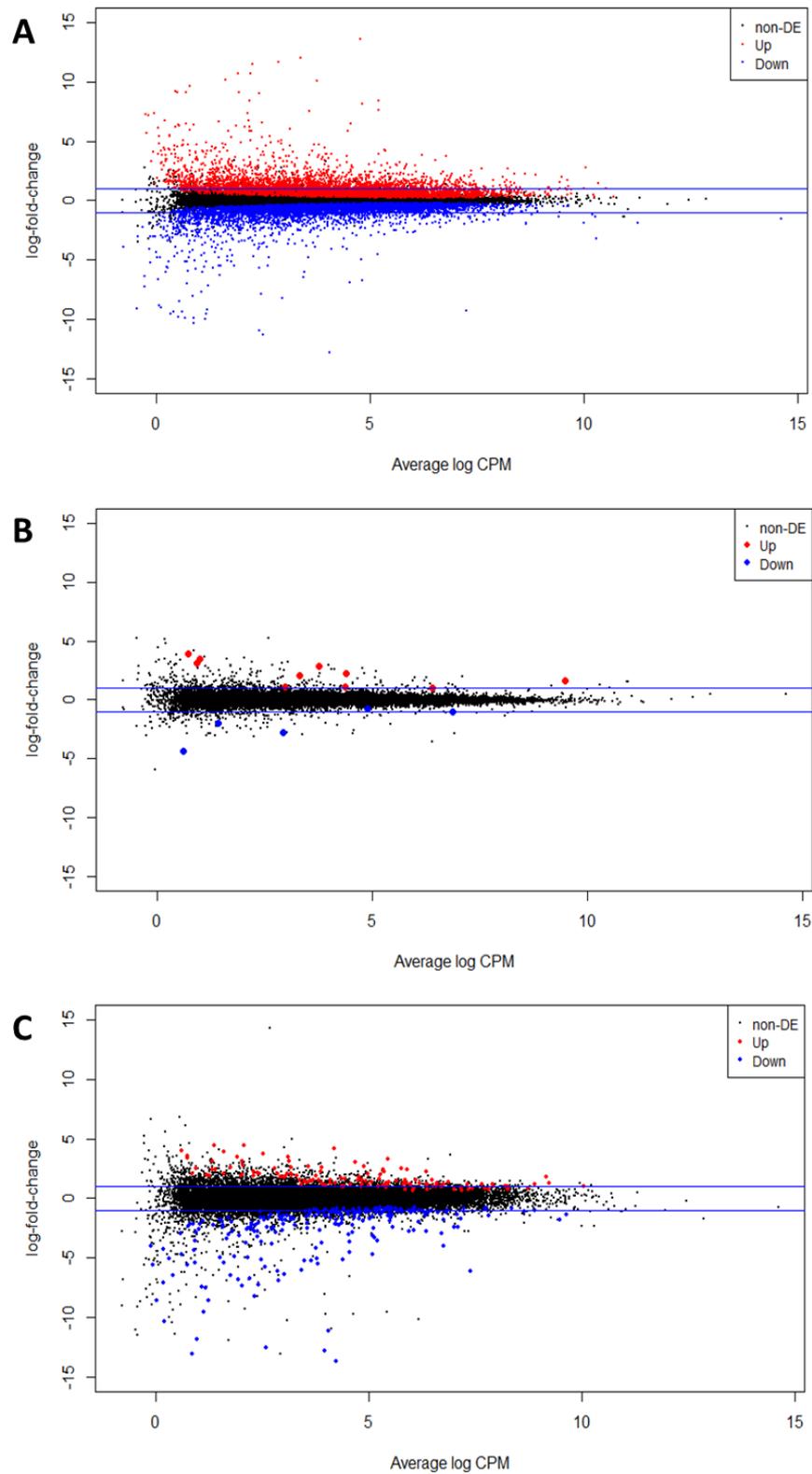


Figura 7. Mean-difference plot (MD-Plot) gerado com auxílio dos testes de expressão diferencial para o contraste entre “BRS Kiriris” contra “BGM1345”. *Up* indica os genes de expressão aumentada e *Down* indica os genes reprimidos em ‘BRS Kiriris’, *Non-DE* os não diferencialmente expressos. A – Controle Absoluto; B- Tempo Inicial; C – Tempo Final.

Tabela 2. Resultados dos testes de expressão diferencial para o contraste entre ‘BRS Kiriris’ e BGM1345, em todos os tratamentos. *Up* indica os genes de expressão aumentada e *Down* indica os genes reprimidos em ‘BRS Kiriris’ (genótipo resistente), *Non-DE* os não diferencialmente expressos.

Categoria	N° genes		
	Controle	Inicial	Final
Up	5142	10	131
Down	5165	5	235
Non-DE	13605	23897	23546
Total DE	10307	15	366
Genes Totais	23912		

A distribuição desses genes diferencialmente expressos (DE) está comparada e ilustrada pelo diagrama de Venn (Figura 8). Dos 23.912 genes DE, cinco são comuns para as três condições; dois são compartilhados entre ‘Controle’ e ‘Inicial’; quatro genes são compartilhados entre ‘Inicial e ‘Final’ e 203 genes são compartilhados entre ‘Controle’ e ‘Final’; além de 10.097 serem exclusivos do tratamento ‘Controle’ ; 4 do ‘Inicial’; e 154 do tratamento ‘Final’.

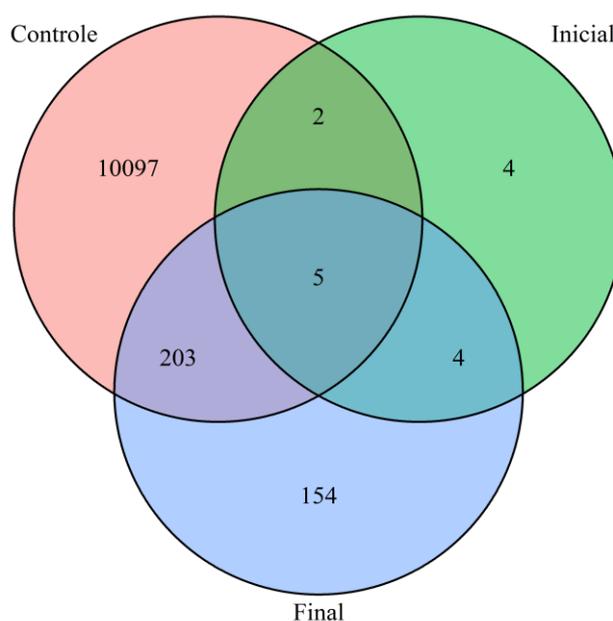


Figura 8. Diagrama de Venn com os transcritos da interação mandioca *versus* podridão radicular que foram diferencialmente expressos ($p\text{-value} < 0,05$) para cada um dos tratamentos

(Controle, Inicial e Final). Números absolutos representam transcritos diferencialmente expressos que são exclusivos ou comuns entre pares ou entre todos os tratamentos.

3.5. Avaliação funcional dos genes diferencialmente expressos

Para uma melhor compreensão de alterações no metabolismo em cada condição foi realizada diferentes anotações funcionais sobre os genes diferencialmente expressos. A anotação funcional com auxílio do software *MapMan* possibilitou ter uma visão geral sobre o metabolismo do genótipo de mandioca considerado como resistente à podridão radicular em condição normal de plantio (Controle Absoluto) e as alterações ocasionadas pela inoculação (plantio em solo infestado) nos dois diferentes tempos de interação (Inicial e Final).

Na condição “Controle Absoluto” (Figura 9) pode-se visualizar 1.007 pontos de um total de 10.307 DEGs mapeados (9,77%), três pontos visualizados de um total de 15 mapeados (20%) na condição “Tempo Inicial” (Figura 10: A) e 36 pontos visualizados de 366 mapeados (9,83 %) na condição “Tempo Final” (Figura 10: B).

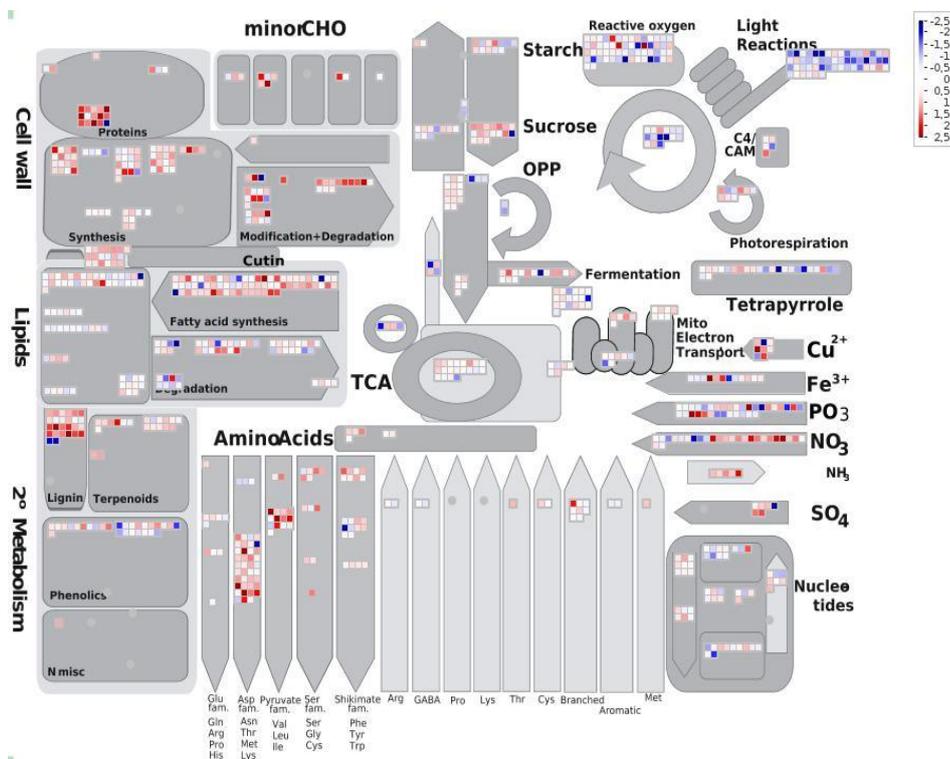


Figura 9. Visão geral do metabolismo da mandioca, pelo software *MapMan* a partir do logFC (*FoldChange*), na condição “Controle”. Cada quadrado representa um gene diferente mapeado para o mesmo processo. Azul representa os genes regulados negativamente, em branco os genes expressos de forma não diferencial e vermelho representa os genes e regulados positivamente.

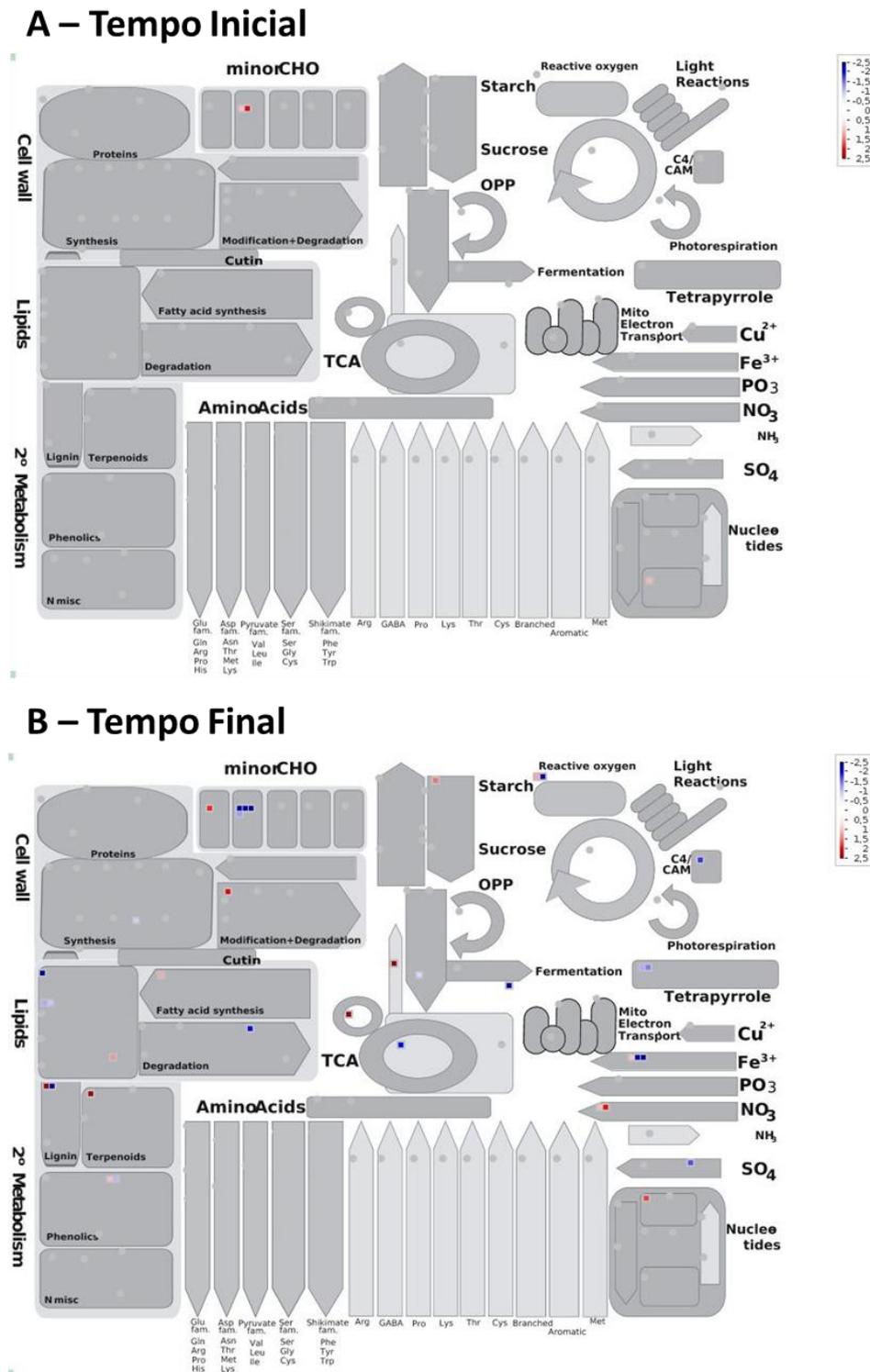


Figura 10. Visão geral do metabolismo da mandioca, pelo software *MapMan*, a partir do logFC (*FoldChange*), na condição A - Tempo Inicial e B – Tempo Final. Cada quadrado representa um gene diferente mapeado para o mesmo processo. Azul representa os genes regulados negativamente, em branco os genes expressos de forma não diferencial e vermelho representa os genes regulados positivamente.

A infecção por podridão radicular promoveu alterações no metabolismo geral da mandioca, silenciando uma grande parte dos genes quando comparados com a planta antes da inoculação. No tempo inicial da interação, apenas duas vias metabólicas apresentaram genes diferencialmente expressos, o metabolismo de moléculas menores de carboidratos (*minorCHO*), relacionados com a parede celular, e nucleotídeos. Todos foram regulados positivamente.

Por outro lado, no tempo final da interação, os processos que apresentaram genes DE, regulados positivamente, foram aqueles relacionados com a parede celular (metabolismo de moléculas menores de carboidratos, modificação e degradação), síntese de ácidos graxos, lipídios, metabolismo secundário (lignina e terpenos), nucleotídeos, Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA), açúcares (amido), metabolismo de espécies reativas de oxigênio (ROS), teores de nitrato e ferro. Além de processos com genes DE regulados negativamente, como metabolismo secundário (lignina), lipídeos, ferro, nucleotídeos, Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA), metabolismo de moléculas tetrapirrólicas, fermentação, metabolismo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e metabolismo C4/ CAM.

Outra estratégia para comparar os genes DE nas três diferentes condições de interação com a podridão radicular, foi usar a ferramenta de anotação de enriquecimento *BLAST2GO* para identificar processos biológicos e eventos moleculares relevantes associados aos três diferentes momentos biológicos de progressão da doença. Os termos de GO, mais representados nos testes de enriquecimento entre os 10.307 genes DE para a condição "Controle" (Figura 11), estão relacionadas a processos celulares metabólicos como *atividade oxidorreductase* (GO: 0016491), *ligação NTP de purina* (GO: 0035639), *ligação de adenosina 5'-difosfato* (GO: 0043531), *ligação de coenzima* (GO: 0050662) e *ligação a drogas* (GO:0008144), substância de ocorrência natural ou sintética, diferente de um nutriente. Não houve termos de GO enriquecidos para a condição "Tempo Inicial". Entretanto, para a condição "Tempo Final" (Figura 12: A e B), entre os 366 genes DE, os termos GO mais enriquecidos foram àqueles relacionados à *atividade de peptidase do tipo serina* (GO: 0008236), *resposta a estímulo de calor* (GO: 0009408) e *resposta a estímulo de peróxido de hidrogênio* (GO: 0042542).

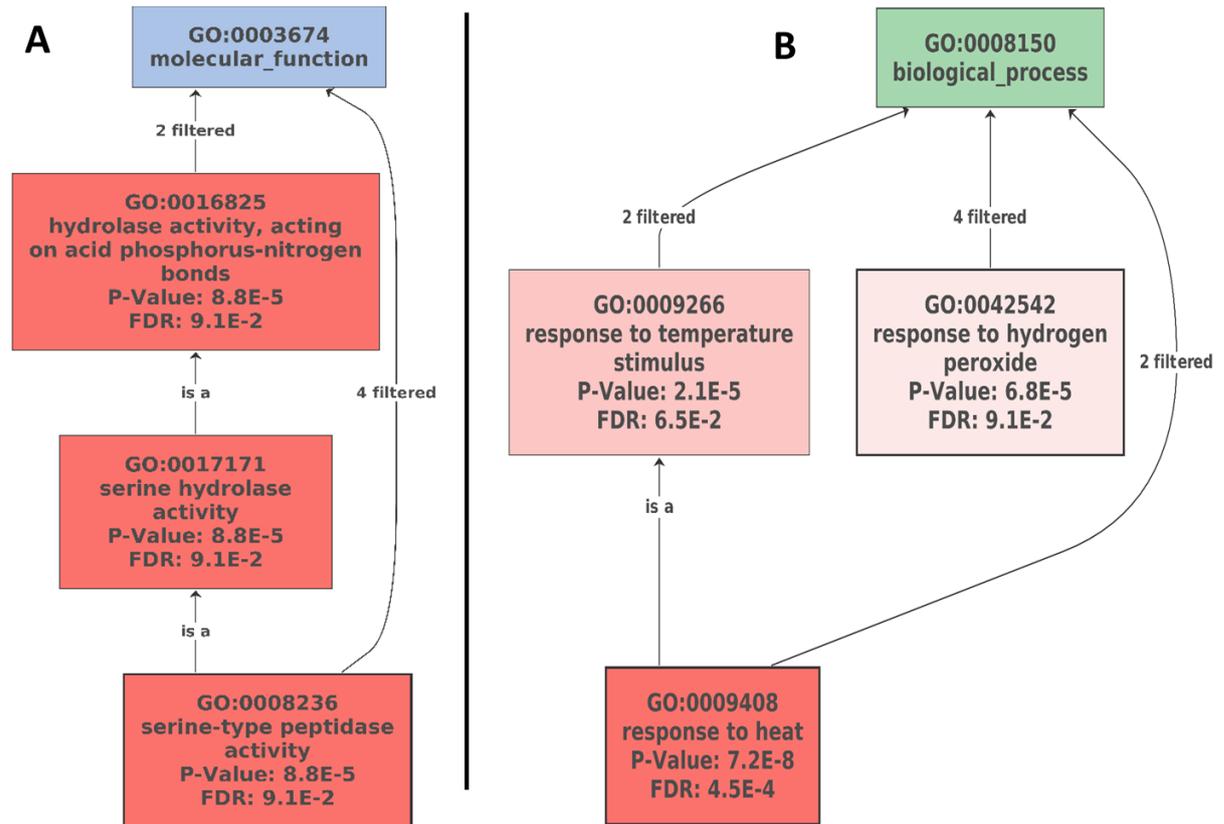


Figura 12 – Análise de enriquecimento de termos para os genes exclusivos diferencialmente expressos para a condição ‘Tempo Final’. Quanto maior a intensidade da cor dos quadros, mais significativo são os GOs identificados.

Os padrões diferenciais de expressão gênica (mostrados por \log_2FC) dos 15 genes DE na condição “Tempo Inicial” foram comparados entre os demais tempos de interação (Figura 13). Foi possível observar a superexpressão exclusiva e regulada positivamente de genes relacionados à defesa de plantas, como duas proteínas relacionadas à patogênese (PR) e uma de choque térmico, no momento inicial da interação, 5-20 d.a.p., em solo infestado. Também foram encontrados genes expressos nos mesmos níveis basais, como o “*AtBAG6* (*BAG family molecular chaperone regulator 6*)” e o “*probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 6 isoform X2*”, relacionados à morte celular programada e metabolismo de carboidratos, respectivamente.

Dentre esses 15 DEGs do ‘Tempo Inicial’, 11 genes foram mapeados na via de estresse biótico (Figura 14). Entre os genes de resposta inicial à infecção, incluem-se as proteínas PR (*Pathogen Related*), a proteína de choque térmico e um gene relacionados à proteólise.

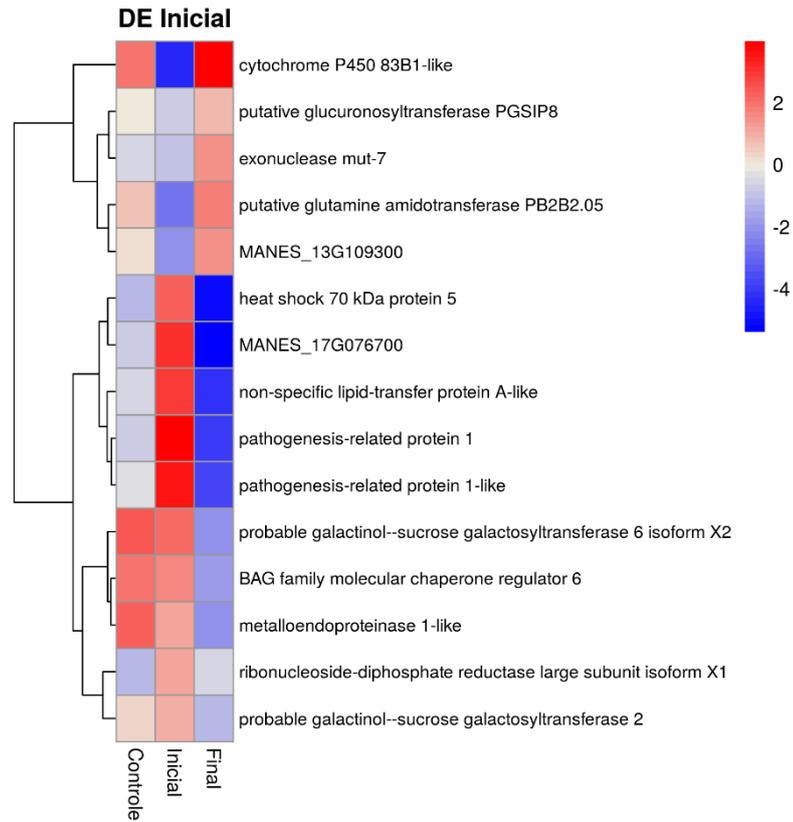


Figura 13. Mapa de calor (*Heatmap*) de genes DE no “Tempo Inicial” da interação em função dos valores de LogFC (*FoldChange*), em comparação com o seu perfil de expressão nas amostras “Controle” e “Tempo Final”. Em azul os genes DE regulados negativamente, em vermelho os genes DE regulados positivamente.

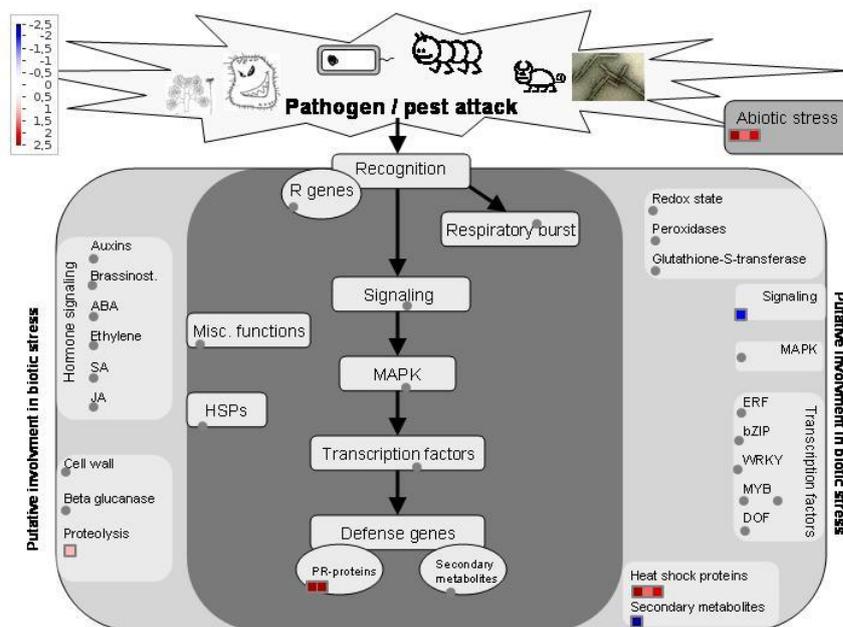


Figura 14. Perfis de expressão de genes mapeados para processos da via de estresse biótico, pelo software MAPMAN, a partir do \log_2FC (*FoldChange*). Cada quadrado representa um gene diferente mapeado para o mesmo processo. Pontos azuis representam os genes DE regulados negativamente, pontos vermelhos representam os genes DE regulados positivamente e cinza os genes que possuem alguma indicação experimental de envolvimento na via.

Por outro lado, os padrões diferenciais de expressão gênica (mostrados por \log_2FC) dos 366 genes DE na condição “Tempo Final”, 131 foram regulados positivamente (Figura 15). Dentre eles, 169 genes foram mapeados na via de estresse biótico (Figura 16). Entretanto, apenas 42 DEGs estavam ativados e envolvidos nas vias de estresse oxidativo e peroxidase, nas vias dos hormônios auxinas, ácido jasmônico (JA) e brassinosteroides (BR), genes de defesa relacionados a metabólitos secundários e proteínas PR; reforços da parede celular, atividades de beta- glucanase e proteólises, sinalização e fatores de transcrição (proteínas MYB).

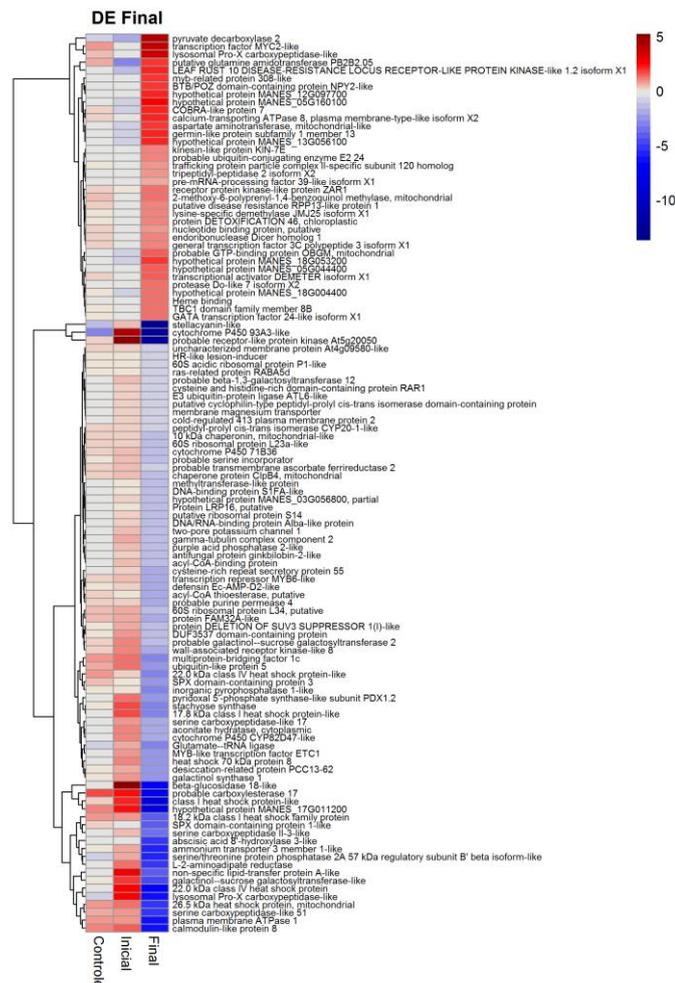


Figura 15. Mapa de calor – *heatmap*- de genes DE no “Tempo Final” da interação em função dos valores de \log_2FC (*FoldChange*), em comparação com o seu perfil de expressão nas

amostras “Controle” e “Tempo Inicial”. Em azul os genes DE regulados negativamente, em vermelho os genes DE regulados positivamente.

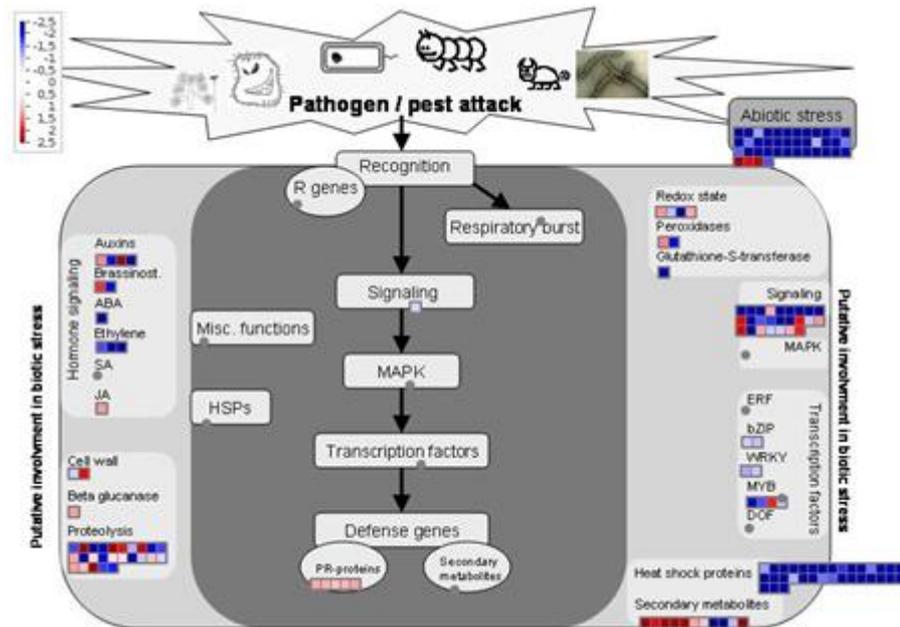


Figura 16. Perfis de expressão de genes mapeados para processos da via de estresse biótico, pelo software MAPMAN, a partir do logFC (*FoldChange*). Cada quadrado representa um gene diferente mapeado para o mesmo processo. Pontos azuis representam os genes DE regulados negativamente e pontos vermelhos representam os genes DE regulados positivamente. Em cinza os genes que possuem alguma indicação experimental de envolvimento na via.

3.6. Genes candidatos

A análise quantitativa dos transcritos ao longo do tempo, durante o período de infecção, forneceu evidências a respeito de mudanças nos genes expressos nos genótipos contrastantes, bem como possíveis genes candidatos induzidos no genótipo resistente. Foi contabilizado um total de 210 DEGs (Figura 17), co-expressos no tratamento “Controle” e “plantas inoculadas (Tempo inicial e final da interação)”. Destes, 85 DEGs (Anexo) encontram-se ativados (*up-regulated*), entretanto, 22 foram considerados “*no hits*” por não possuírem funções proteicas identificadas.

Contudo, no grupo dos genes de resposta à infecção (Figura 18), incluíram-se proteínas relacionadas à patogênese (PR), genes envolvidos em estresse oxidativo, nas vias dos hormônios ácido jasmônico, auxina e brassinosteroides (BR), proteólises e glucanases, além de

genes relacionados à transdução de sinais e metabolismo secundário.

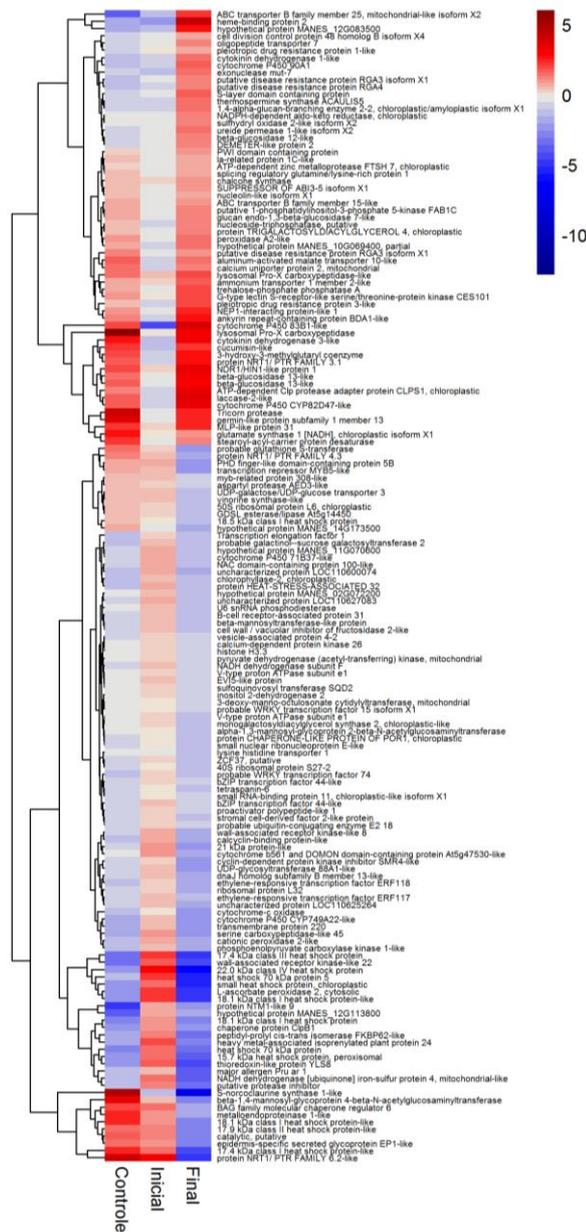


Figura 17. Mapa de calor (*Heatmap*) de genes DE co-expressos no co-expressos no controle absoluto e nos tempos iniciais e finais da interação em função dos valores de LogFC (*FoldChange*). Em azul os genes DE regulados negativamente, em vermelho os genes DE regulados positivamente.

A segunda etapa da seleção foi baseada nos eventos relacionados às respostas de estresse

biótico que foram regulados positivamente nos níveis basais, mantiveram superexpressos nos tempos iniciais e finais, além daqueles cuja a expressão foi restaurada aos níveis basais somente nos tempos finais da avaliação.

Desse modo, foi realizado um *screening* dentro de 63 genes DE *up-regulated* com as funções proteicas identificadas, sendo selecionados àqueles com funções relacionadas à: alongamento de raiz, defesa e/ou resistência a patógenos, morte celular, imunidade de plantas e respostas a lesões/ferimentos. Com base nesses critérios, 18 genes candidatos foram selecionados (Tabela 3) para posterior validação com a técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR).

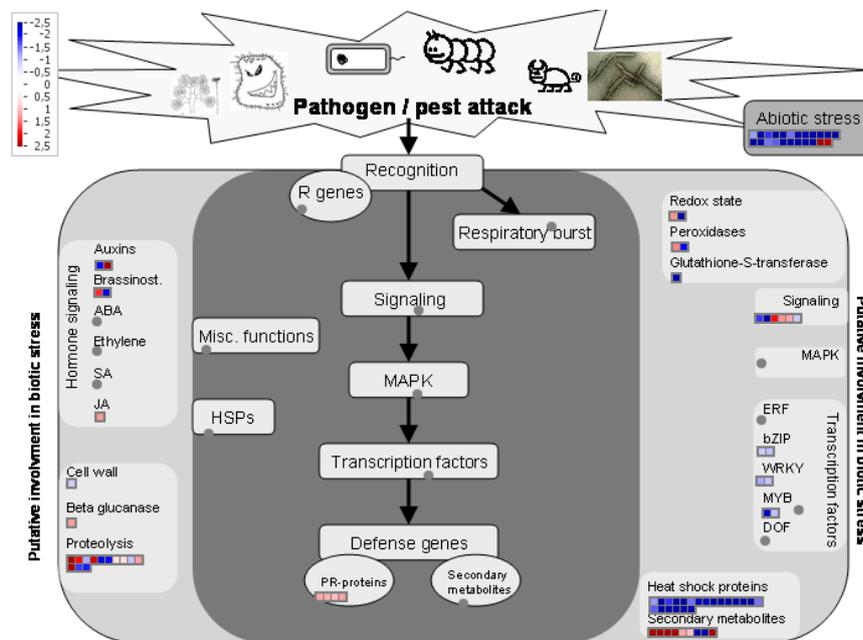


Figura 18. – Perfis de expressão dos genes co-expressos no controle absoluto e nos tempos iniciais e finais da interação, mapeados para processos da via de estresse biótico, pelo software MAPMAN, a partir do logFC (*FoldChange*). Cada quadrado representa um gene diferente mapeado para o mesmo processo. Pontos azuis representam os genes DE regulados negativamente, pontos vermelhos representam os genes DE regulados positivamente. Em cinza os genes que possuem alguma indicação experimental de envolvimento na via.

Tabela 3. Genes candidatos utilizados para avaliação da expressão gênica na interação mandioca vs podridão radicular.

Gene	Ontologia Genética (GO - Gene Ontology)	Função Geral
MANES_01G17060 0	Laccase-2-like	Alongamento das raízes em condições de desidratação.
MANES_01G25080 0	BAG family molecular chaperone regulator 6 (AtBAG6)	Resistência basal da planta, com respostas programadas à morte celular e ao estresse.
MANES_02G10910 0	La-related protein 1C-like (LARP1c)	Genes associados à senescência (SAGs) e genes relacionados à defesa.
MANES_03G12930 0	ATL27 (NEP1-interacting protein-like 1)	Envolvido nas etapas iniciais da via de sinalização de defesa da planta.
MANES_07G00870 0	Putative disease resistance protein RGA3 isoform X1	Proteína de resistência a doenças.
MANES_08G04370 0	Peroxidase A2-like	Resposta a ataque de patógenos, ferimentos e estresse oxidativo.
MANES_08G13090 0	Germin-like protein (GLP) subfamily 1 member 13	Desempenha papel na defesa das plantas.
MANES_09G06460 0	Ankyrin repeat-containing protein BDA1-like	Regulação das respostas de defesa da planta.
MANES_09G14640 0	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase CES101	Resposta a fungos.
MANES_10G10650 0	Protein NRT1/ PTR FAMILY 4.3	Resposta a nematoides.
MANES_11G00580 0	Aspartyl protease AED3-like	Resposta mediada pelo ácido salicílico a um patógeno.
MANES_11G12120 0	S-norcochlorogenic acid synthase 1-like	Resultado de um estímulo por moléculas de origem fúngica.
MANES_11G16540 0	NDR1/HIN1-like protein 1	Desempenha papel na imunidade das plantas.
MANES_12G14400 0	Cytochrome P450 83B1-like	Ativação do glucosinolato em resposta a patógenos.

MANES_13G13590 0	Calcium uniporter protein 2, mitochondrial	Ativação das vias de morte celular.
MANES_14G13190 0	Protein NRT1/ PTR FAMILY 6.2-like	Resposta a ferimento.
MANES_15G00410 0	Pleiotropic drug resistance protein 3-like	Proteína de defesa geral.
MANES_15G13060 0	MLP-like protein 31	Resposta à presença de um corpo estranho ou à ocorrência de uma lesão.

4. DISCUSSÃO

4.1. Análise temporal do perfil transcriptômico

As doenças radiculares incitadas por fungos estão entre as principais causas de redução na produtividade da mandioca, no entanto, a extensão dessa perda dependerá da suscetibilidade dos genótipos plantados em áreas infestadas (ONYEKA et al., 2005; AWOYEMI et al., 2016). O entendimento dos mecanismos genéticos responsáveis pelos diferentes níveis de resistência apresentados pelos genótipos de mandioca à podridão radicular é de extrema importância para auxiliar na caracterização da doença, na busca de estratégias de controle e seleção de acessos promissores para o programa de melhoramento genético da cultura.

Como as raízes são o principal órgão de percepção de sinais no solo de plantas, o comportamento radicular pode desempenhar um papel importante no controle de doenças transmitidas pelo solo (GAO et al., 2014). Desse modo, considera-se os dados fenotípicos de sobrevivência e de desenvolvimento do sistema radicular no plantio em campo infestado, o principal indicativo de resistência de um genótipo à podridão radicular.

Ainda que as avaliações em campo possuam alguns gargalos, como a distribuição desuniforme de inóculo, os dados aqui coletados são indicadores de que o processo de infecção, nas mesmas condições, é realmente diferente entre os genótipos de mandioca fenotipicamente resistentes e suscetíveis à podridão radicular.

Embora a variedade ‘BRS Kiriris’ tenha sido selecionada no Nordeste brasileiro, como fontes de resistência à podridão de raízes (FUKUDA et al., 2002), o aparecimento dos sintomas na parte aérea da planta, correlacionado com a presença de estruturas fúngicas na raiz, nos tempos iniciais da interação, é indicativo de que a variedade não é imune à doença. Entretanto, a inoculação não impediu o desenvolvimento e a expansão de novas raízes pela haste e, conseqüentemente, a recuperação da planta inoculada, mesmo que tenha havido a morte das raízes adventícias presentes no momento da inoculação.

Em contrapartida, a redução do sistema radicular do BGM-1345, aos 15 dias após o plantio em solo infestado, coincidiu com a detecção de presenças fúngicas nas suas raízes. O genótipo considerado suscetível não conseguiu emitir novas raízes após a infecção, culminando na redução do sistema radicular e até mesmo à morte da planta, caracterizando a suscetibilidade.

A resistência fenotipicamente incompleta do genótipo considerado resistente, BRS Kiriris, caracterizada pela redução da intensidade da doença, mas não à sua ausência, reforça a característica quantitativa da resistência à podridão radicular da mandioca (BRITO et al., 2017). A análise comparativa do transcriptoma entre os dois genótipos contrastantes ao longo do tempo da interação forneceu evidências a respeito de mudanças nos genes expressos entre o genótipo

resistente e o genótipo suscetível, às suas funções metabólicas inferidas, bem como possíveis genes candidatos constitutivos relacionados com a resistência à podridão radicular.

A análise resultou em um total de 23.912 genes diferencialmente expressos (DEGs). O maior número de DEGs foi observado na condição ‘controle absoluto’ (Tempo 0): 10.307 DEGs. Com base nas análises de enriquecimento funcional, esses genes foram significativamente associados a processos celulares metabólicos, como *atividade oxidorreductase (GO:0016491)* envolvida nas vias de sinalização de defesa (GÓMEZ-CANO et al., 2019); *ligação NTP de purina (GO:0035639)*, precursores da biossíntese de metabólitos, essenciais na síntese de RNA e de reações de acoplamento energético (WITTE; HERDE, 2020); *ligação de adenosina 5'-difosfato -ADP (GO:0043531)*, componentes da estrutura de receptores de repetição ricos em leucina (NLRs), envolvidos em respostas imunes da planta (WANG et al., 2019); *ligação de coenzima (GO:0050662)*, presente na resposta de outros transcriptomas à estresses bióticos e abióticos (FENG et al., 2019; ZOU et al., 2020) e *ligação a drogas (GO:0008144)*, também associado a respostas a estresses bióticos e abióticos (SOLTANI et al., 2019; KAMINAKA et al., 2020). Portanto, de forma constitutiva, o genótipo resistente já apresenta termos GOs enriquecidos relacionados às vias de sinalização e de respostas a estresses bióticos e abióticos. Isso pode permitir uma percepção precoce dos patógenos pela planta, consequentemente conferir resistência e possibilitar o seu desenvolvimento ainda que cultivada em áreas infestadas por podridão radicular.

Em contrapartida, as respostas pós-infeccionais temporais evidenciaram que o número de DEGs na fase inicial de interação (15 DEGs) foi muito menor do que na fase final (366 DEGs). A estratégia de análise temporal do transcriptoma de mandioca tem sido utilizada para o entendimento da interação com outras doenças da cultura, como vírus do castanho listrado, com o intuito de estudar não apenas genes de resposta precoce, mas aqueles envolvidos em respostas de defesa em estado estacionário (MARUTHI et al., 2014; AMUGE et al., 2017).

Na interação da mandioca com a podridão radicular, a resposta inicial à infecção não apresentou termos GOs significativamente enriquecidos, embora as transcrições relacionadas às proteínas de choque térmico (HSPs) e proteínas relacionadas à patogênese (PR), tenham sido reguladas positivamente. As *heat shock proteins* (HSPs), também descritas na resposta de genótipos de mandioca à infecção por vírus e bactérias (MUÑOZ-BODNAR et al., 2014; AMUGE et al., 2017), são biomoléculas responsivas a vários estresses bióticos e abióticos, atuando na modificação de processos fisiológicos e bioquímicos, o que leva ao desenvolvimento de tolerância ao estresse (HAQ et al., 2019). Assim como as proteínas PR, principais componentes do sistema imunológico inato da planta, especialmente da resistência

sistêmica adquirida (SAR), protegem as plantas de futuras infecções, não apenas acumulando localmente nos tecidos infectados e circundantes, mas também em tecidos remotos não infectados (JAIN; KHURANA, 2018).

Além do mapeamento dos DEGs na via de estresse biótico, a análise do metabolismo geral da planta indicou a superexpressão de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e na síntese de nucleotídeos. Essa superexpressão associada à falta de DEGs envolvidos nos demais processos metabólicos pode ser uma estratégia da planta para manter o mínimo de energia necessária para o seu desenvolvimento e garantir que, na fase inicial da interação (cinco a 20 dias após o plantio em solo infestado), as necessidades nutricionais do patógeno não sejam atendidas (CORRER et al., 2020).

Por outro lado, no tempo final da avaliação (30 a 60 dias após o plantio em solo infestado), houve o enriquecimento de termos GOs relacionados à *atividade de peptidase do tipo serina* (GO:0008236), envolvida em diversos processos fisiológicos de plantas, como resposta de hipersensibilidade (HR), transdução e diferenciação de sinal, senescência, degradação e processamento de proteínas (ANTÃO; MALCATA, 2005; NISHIMURA et al., 2017; SILVA-BRANDÃO et al., 2017); GOs também relacionados à *resposta a estímulo de calor* (GO: 0009408), referente ao aumento de expressão de proteínas de choque térmico, envolvidos na resposta a estresses bióticos e abióticos (HAQ et al., 2019); e o aumento de genes relacionados à resposta a *estímulo de peróxido de hidrogênio* (GO : 0042542), o qual está envolvido nas defesas de parede celular, na hipersensibilidade (HR), na sinalização da resistência sistêmica adquirida e na expressão de genes de defesa (ZHANG et al., 2013), também foram identificados.

Ao analisar o metabolismo da planta, a superexpressão de genes relacionados à biossíntese de amido, ao metabolismo de moléculas menores de carboidratos e ao ciclo de TCA, indicou o aumento de fornecimento de energia no tempo final da interação (SELINSKI et al., 2018). A análise do metabolismo também identificou processos envolvidos na biossíntese de lignina e modificação da parede celular, que podem corresponder ao desenvolvimento e envelhecimento da planta ao longo do tempo, mas atuam como barreira física na defesa contra patógenos (HU et al., 2018; ARCURI et al., 2020).

Quanto à via de estresse biótico, houve o aumento da expressão de genes associados à ROS e peroxidase; à sinalização hormonal por meio da síntese de auxinas, ácido jasmônico (JA) e brassinosteroides (BR); genes de defesa relacionados a metabólitos secundários e proteínas PR; reforços da parede celular, atividades de beta-glucanase e proteólises, sinalização e fatores de transcrição (proteínas MYB).

Um indicativo de que à medida que a interação com a doença progrediu, foi que houve uma indução da resposta de hipersensibilidade (HR). desencadeada pelo reconhecimento de elicitores bióticos, a reação de hipersensibilidade ocasiona a morte localizada de células no local de penetração do microrganismo, além da morte de algumas células adjacentes, limitando assim a colonização e avanço pelo patógeno e constituindo-se uma das principais e mais bem caracterizadas respostas induzidas de resistência (UMA et al., 2011; BAXTER et al., 2014; MACHO; ZIPFEL 2015; STAEL et al., 2015; TRDÁ et al., 2015).

No mecanismo de resistência mediado pela resposta hipersensitiva, é frequentemente observado o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, vias de sinalização, biossíntese de hormônios (especialmente ácido salicílico, ácido jasmônico ou etileno), reprogramação da expressão gênica, em especial a indução de genes relacionados à defesa, como a produção das proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas), genes referentes às rotas de biossíntese de compostos contendo nitrogênio, bem como dos terpenoides, fenóis e flavonoides que poderão resultar no engrossamento e lignificação da parede celular (ZHANG et al., 2011; AN; MOU 2012; CHENG et al., 2012). Esses mecanismos são também observados nas vias de estresse biótico do genótipo resistente a partir de 30 dias após o plantio em solo infestado por podridão radicular.

Portanto, com base na análise temporal do transcriptoma da variedade ‘BRS Kiriris’, a defesa à podridão radicular é composta basicamente de resposta constitutiva, a qual já está presente na variedade e que, possivelmente possibilita o enraizamento da haste mesmo plantada em áreas infestadas. Essa defesa também parece estar associada à resposta induzida, observada principalmente a partir dos 30 dias após o plantio em solo infestado.

4.2. Seleção de genes candidatos

A resposta do transcriptoma à infecção por podridão radicular reforçou a hipótese da característica quantitativa da resistência à doença (BRITO et al., 2017). Genotipicamente, a resistência quantitativa é baseada na junção do efeito combinado de vários genes, cada um contribuindo quantitativamente para o nível de resistência da planta, podendo ser influenciados pelo ambiente e entre si (NIKS et al., 2015).

De modo geral, a percepção do patógeno pelo genótipo resistente (‘BRS Kiriris’) envolveu a expressão de genes de resistência, seguida pela indução da resposta de hipersensibilidade, produção de espécies reativas de oxigênio, cascata de ubiquitinação, reforço da parede celular e sinalização hormonal, que exercem papéis fundamentais durante a imunidade de plantas (ZHANG et al., 2011; AN; MOU 2012; CHENG et al., 2012).

Os genes candidatos selecionados foram aqueles DEGs constitutivos do genótipo resistente, co-expressos de forma positiva nos momentos iniciais e/ou finais da interação, com funções relacionadas a alongamento de raiz, defesa e/ou resistência a patógenos, morte celular, imunidade de plantas e respostas a lesões/ferimentos.

Dentre os genes selecionados, está o MANES_01G170600 (*Laccase-2-like*), um gene envolvido em diferentes processos biológicos, além de desempenhar um papel importante na biossíntese de lignina (WANG et al. 2015a). As lacases são enzimas codificadas por uma família multigênica distribuídas amplamente em genomas vegetais, expressas em maior número nas raízes em comparação a outros órgãos/tecidos das plantas. Estão implicadas em resposta ao desenvolvimento da planta e a estresses bióticos e abióticos, principalmente por reforçar a parede celular devido à deposição de lignina, e consequentemente, restringir a colonização do tecido por patógenos (LIU et al. 2017; WANG et al. 2017; HU et al., 2018; ABOU-ELWAFI et al., 2019; ARCURI et al., 2020).

Nessa mesma linha, o MANES_01G250800 codifica a *AtBAG6* (*BAG family molecular chaperone regulator 6*), uma proteína de ligação à calmodulina (CaM), que é ativada proteoliticamente para desencadear imunidade basal e induzir a morte celular programada (ECHEVARRÍA-ZOMEÑO et al., 2016; YOU et al., 2016). No processo de infecção, a regulação positiva da *AtBAG6* desencadeia a morte celular autofágica e, consequentemente, a resistência do hospedeiro (GHAG et al., 2014; LI et al., 2016; KABBAGE et al., 2017).

O gene MANES_02G109100 (*la-related protein 1C-like - LARP1c*), está envolvido na regulação da senescência foliar prematura, na regulação positiva de genes PR associados à defesa (LIM et al., 2007; ZHANG et al., 2012) e na biossíntese de ácido salicílico, promovendo a morte celular durante a defesa de plantas (NA et al., 2015).

O MANES_03G129300 (*ATL27*), descrito como membro da subfamília E3 ubiquitina-ligase (SERRANO et al., 2006), está envolvido nas etapas iniciais da via de sinalização de defesa da planta (SADANANDOM et al., 2012; DUPLAN; RIVAS, 2014). A regulação positiva de ATLS (*Arabidopsis Tóxicos en Levadura*), particularmente durante as interações planta-patógeno, está relacionada à sinalização hormonal (KELLEY, 2018) e a também à morte celular programada (MANDAL et al., 2018).

O MANES_07G008700 (*putative disease resistance protein RGA3 isoform X1*), é um análogo do gene de resistência a doenças (RGA) com domínios conservados e características estruturais que possuem papéis específicos nas interações patógeno-hospedeiro (SEKHWAL et al., 2015). Os RGAs visam especificamente proteínas efetoras patogênicas dentro da célula hospedeira, por meio da resposta de imunidade desencadeada por efector (ETI), e assim medeiam

à imunidade desencadeada por padrão molecular associado a patógenos / micróbios (PAMP / MAMP) (PTI / MTI) (CHISHOLM et al., 2006).

O MANES_08G043700 (*Peroxidase A2-like*) faz parte das peroxidases vegetais, encontradas principalmente na parede celular e vacúolos. São classificadas como oxidorreduções e estão envolvidas em uma ampla gama de processos fisiológicos, como formação de lignina e suberina, metabolismo de auxina, alongamento celular, defesa de plantas, cicatrização de feridas, bem como a geração de espécies de oxigênio altamente reativas (ROS), como resposta de defesa da planta após o reconhecimento do patógeno (CESARINO et al., 2012; CASCIELLO et al., 2017; PANDEY et al., 2017; DRAGANA et al., 2017; GAO et al., 2018; TAKAHASHI; MORIKAWA, 2019).

O gene MANES_08G130900 (*Germin-like protein subfamily 1 member 13*) está envolvido na resposta a várias condições de estresses bióticos e abióticos (CEVHER-KESKIN, 2019). As proteínas GLP estão presentes em todos os órgãos e estágios de desenvolvimento das plantas (EL-SHARKAWY et al., 2010), e o seu papel na sinalização da resistência está associado, principalmente, à produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), um mensageiro secundário envolvido na explosão oxidativa (ZHANG et al., 2013).

O MANES_09G064600 (*Ankyrin repeat-containing protein BDAI-like*) é um regulador da imunidade de plantas, descrito por, constitutivamente, ativar a morte celular e as respostas de defesa (YANG et al., 2012; VO et al., 2015). As proteínas contendo domínio de repetição de anquirina (ANK) estão associadas à resistência quantitativa a diferentes patógenos, incluindo os de solo (LI et al., 2013; BASTIEN et al., 2014; LIU et al., 2019).

O MANES_09G146400 (*G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase*) desempenha um papel crucial na mediação da resposta celular a vários estímulos ambientais, sinais hormonais e percepção de estresse (SUN et al., 2013). As quinases semelhantes ao receptor de lectina contêm um domínio de lectina extracelular que se localiza nas membranas das células vegetais e desempenham papéis importantes nos movimentos transmembrana, nas ligações da membrana plasmática da parede celular e nas respostas a patógenos (VAID et al. 2013; ZHAO et al., 2018).

Os genes MANES_10G106500 (*Protein NRT1/ PTR FAMILY 4.3*) e MANES_14G131900 (*Protein NRT1/ PTR FAMILY 6.2-like*) codificam as proteínas “NRT1 / PTR FAMILY”, que originalmente foram identificadas como transportadores de nitrato ou di / tri-peptídeo (TSAY et al., 1993). Entretanto, estudos recentes revelaram que esta família de transportadores também transporta os hormônios vegetais auxina, ácido abscísico (ABA) e giberelina (GA), ácido jasmônico (JA), bem como metabólitos secundários (glucosinolatos),

envolvidos em uma ampla gama de processos fisiológicos incluindo a defesa de plantas contra patógenos (CHIBA et al., 2015; CORRATGÉ-FAILLIE; LACOMBE, 2017).

O MANES_11G005800 (*Aspartyl protease AED3-like*) está associado à sinalização da resistência sistêmica adquirida (SAR), por meio de respostas mediadas pelo ácido salicílico (SA) (BREITENBACH et al., 2014). O envolvimento da aspartil protease AED3 na resistência sistêmica adquirida contra a invasão fúngica e de herbívoros tem sido amplamente estudado (LÓPEZ-GALIANO et al., 2017; NIU et al., 2020).

O MANES_11G121200 (*S-norcochlorine synthase 1-like*) codifica a norcochlorina sintase (NCS), uma enzima chave na biossíntese de alcalóide benzilisoquinolina (BIA), um dos metabólitos secundários mais importantes das plantas (VIMOLMANGKANG et al., 2016). A NCS, abundante na raiz e no caule das plantas, é um membro da família de proteínas relacionadas à patogênese (PR-10) (LEE; FACCHINI, 2010; JAIN; KUMAR, 2015), amplamente descritas como componente do sistema imunitário inato em plantas, expressas principalmente em condições de estresses patogênicos ou ambientais (FERNANDES et al., 2013; FINKINA et al., 2017).

O gene MANES_11G165400 (*NHL1 - NDR1/HIN1-like protein 1*), desempenha papéis cruciais nas respostas de plantas ao estresse biótico (CHEN et al., 2018; LIU et al., 2020). A superexpressão de genes membros da família NHL está relacionada à resistência do hospedeiro por ativar as vias de sinalização hormonal, como do ácido abscísico, ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno (MALDONADO et al., 2014; PENG et al., 2019; LIU et al., 2020).

O MANES_12G144000 (*Cytochrome P450 83B1-like*) é um gene necessário para a ativação do glucosinolato em resposta da planta à patógenos (ZHANG et al., 2019; HUNZIKER et al., 2020). Esse composto, quando quebrado pela enzima mirosinase, é convertido em isotiocianatos tóxicos (ITCs), que atuam diretamente na proteção das plantas contra patógenos e herbívoros (PANGESTI et al., 2016; CHEN et al., 2020).

O gene MANES_13G135900 (*Calcium uniporter protein 2, mitochondrial*) está associado à homeostase do cálcio mitocondrial, que desempenha um papel fundamental na fisiologia celular, incluindo a regulação da bioenergética celular, os sinais citoplasmáticos do cálcio e a ativação das vias de morte celular (TEARDO et al., 2017), desencadeada por uma variedade de estímulos, incluindo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a produção espécies reativas de oxigênio (ROS) (AKEN; BREUSEGEM, 2015; PENNA et al., 2018).

O MANES_15G004100 (*Pleiotropic drug resistance protein 3-like*) é um transportador pleiotrópico de resistência a drogas (PDR), encontrado apenas em fungos e plantas (CROUZET et al., 2006). Os transportadores PDR estão envolvidos nas defesas constitutivas e induzidas

de plantas, provavelmente pelo transporte de metabólitos secundários antimicrobianos para a superfície celular (SASSE et al., 2016; PIERMAN et al., 2017).

Por fim, o MANES_15G130600 (*MLP-like protein 31*), codifica proteínas do látex / proteínas relacionadas ao amadurecimento (MLP / RRP) conhecidas por estarem envolvidas em uma ampla gama de processos biológicos de desenvolvimento de plantas e várias respostas ao estresse (WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2018). Embora estejam presentes de forma ubíqua em plantas, o maior acúmulo de MLP está na raiz (YANG et al. 2015). A superexpressão dessas proteínas amplificam a sinalização de defesa, incluindo as vias de etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico (YANG et al. 2015; HE et al. 2020; HOLMQUIST et al., 2020).

Portanto, com base nas suas funções, os 18 genes aqui selecionados estão potencialmente envolvidos na resistência da mandioca à podridão radicular. Este é o primeiro modelo de resistência proposto a esse patossistema. A compreensão desses mecanismos de resistência, incluindo as vias bioquímicas e, principalmente, a identificação e validação desses genes candidatos contribuirão substancialmente para que os programas de melhoramento genético implementem estratégias de seleção assistida por marcadores moleculares, para o desenvolvimento e seleção de genótipos de mandioca resistentes à podridão radicular.

Contudo, a seleção dos genes aqui descritos não só permitirá o uso de marcas moleculares funcionais associadas à resistência, como também possibilitará que, na prática, o *screening* de germoplasma e de populações segregantes de forma que não dependam de inoculação nem de um momento mais apropriado para a superexpressão de genes associados à resistência. Isso implicará na redução de custos e de tempo nas etapas de identificação dos clones mais promissores quanto à resistência à podridão radicular.

5. CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que as plantas de ‘BRS Kiriris’, considerada fenotipicamente resistente à podridão radicular, restringiram a progressão da doença, limitaram os sintomas às folhas, enquanto permitiam a expansão (aumento de volume) normal da raiz ainda que houvesse colonização fúngica.

A variedade ‘BRS Kiriris’ apresenta indução da expressão de genes de defesa e resistência na ausência do patógeno, que atuam de forma orquestrada durante o ataque fúngico e a progressão da doença.

As respostas pós-infeccionais temporais evidenciaram que o número de DEGs na fase

inicial de interação (15 DEGs) foi muito menor do que na fase final (366 DEGs).

A resposta inicial à infecção (cinco a 20 dias após o plantio em solo infestado) não apresentou termos GOs significativamente enriquecidos. Por outro lado, no tempo final da avaliação (30 a 60 dias após o plantio em solo infestado), houve o enriquecimento de termos GOs relacionados à atividade de peptidase do tipo serina (GO: 0008236), resposta a estímulo de calor (GO: 0009408) e resposta a estímulo de peróxido de hidrogênio (GO: 0042542).

Os resultados permitiram propor um modelo da resposta de defesa/resistência à podridão radicular em mandioca, baseando-se no nível de indução de genes que codificam a resposta hipersensitiva (HR), resistência sistêmica adquirida (SAR), indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas), reforços da parede celular e compostos sinalizadores, como por exemplo, auxinas, ácido jasmônico (JA), brassinosteroides (BR) e peróxido de hidrogênio.

O estudo do transcriptoma por meio do RNAseq, permitiu o entendimento de alguns mecanismos de defesa e resistência à podridão radicular além de fornecer novas perspectivas para estudos de análise funcional, identificação e anotação de novos genes. Um total de 18 genes candidatos foram selecionados, e a validação dos mesmos possibilitará o uso de marcas moleculares funcionais associadas à resistência para posterior *screening* de germoplasma e populações segregantes para identificação dos clones mais promissores quanto a resistência à podridão radicular.

6. REFERÊNCIAS

AGUILAR-HERNÁNDEZ, V., AGUILAR-HENONIN, L., & GUZMÁN, P. Diversity in the architecture of ATLS, a family of plant ubiquitin-ligases, leads to recognition and targeting of substrates in different cellular environments. **PloS one**, v.6, e23934, 2011.

AKROFI, S.; AKUOKO, K. O.; BOUR, K.B.; NYARKO, J. A. Farmers' knowledge and perception of the dry cassava root rot disease in Brong Ahafo region of Ghana. **Ghana Journal of Agricultural Science**, v.52, p. 33-42, 2018.

AMUGE, T., BERGER, D. K., KATARI, M. S., MYBURG, A. A., GOLDMAN, S. L., & FERGUSON, M. E. A time series transcriptome analysis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties challenged with Ugandan cassava brown streak virus. **Scientific reports**, v.7, p.1-21, 2017.

AN, C.; MOU, Z. Non-host defense response in a novel *Arabidopsis*-*Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathosystem. **PLoS One**, v.7, p. e31130, 2012.

ANJANAPPA, R.B.; MEHTA, D.; OKONIEWSKI, M.J.; SZABELSKA, A.; GRUISSEM,

- W.; VANDERSCHUREN, H. Early transcriptome analysis of the brown streak virus-cassava pathosystem provides molecular insights into virus susceptibility and resistance. **BioRxiv**, v 2017.
- ANTÃO, C. M., & MALCATA, F. X. (2005). Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(7), 637-650.
- AWOYEMI, S.O.; AFOLABI, C.G.; POPOOLAA, A.K.; ODEDINAB, J.N.; ADIGBO, S.O. Performances of improved cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars against root rot disease and yield in cassava-maize intercropping systems under natural infection. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.9, p.386–401, 2016.
- BARROS, J.A.; MEDEIROS, E.V.; NOTARO, K.A.; MORAES, W.S.; SILVA, T.C.E.S.; MOREIRA, K.A. Different cover promote sandy soil suppressiveness to root rot disease of cassava caused by *Fusarium solani*. **African Journal of Microbiology Research**, v.8, p. 967–973, 2014.
- BASTIEN, M., SONAH, H. AND BELZILE, F. (2014) Genome wide association mapping of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in soybean with a genotyping by sequencing approach. *Plant Genome*, 7, 1–13.
- BAXTER, A.; MITTLER, R.; SUZUKI, N. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 1229-1240, 2014.
- BENJAMINI, Y; HOCHBERG, Y: Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of Royal Statistical Society*, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.
- BOARI, A.J.; CUNHA, E.M.; QUADROS, A.F.F.; BARRETO, R.W.; FERNANDES, A.F. First report of *Phytophthium* sp. causing storage root rot and foliage blight of cassava in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, p.1042, 2018.
- BREDESON, J. V.; LYONS, J. B.; PROCHNIK, S. E.; WU, G. A.; HA, C. M.; EDSINGER-GONZALES, E.; GRIMWOOD, J.; SCHMUTZ, J.; RABBI, I.Y.; EGESI, C.; NAULUVULA, P.; LEBOT, V.; NDUNGURU, J.; MKAMILO, G.; BART, R. S.; SETTER, T. L.; GLEADOW, R. M.; KULAKOW, P.; FERGUSON, M. E.; ROUNSLEY, S.; ROKHSAR, D. S. Sequencing wild and cultivated cassava and related species reveals extensive interspecific hybridization and genetic diversity. **Nature biotechnology**, v. 34, p. 562–570, 2016.
- BREITENBACH, HH, WENIG, M., WITTEK, F., JORDÁ, L., MALDONADO-ALCONADA, AM, SARIOGLU, H., COLBY, T., KNAPPE, C., BICHLMEIER, M., PABST, E., MACKAY, D., PARKER, JE, & VLOT, AC Contrasting roles of apoplastic aspartyl protease AED1 and legume lectin-like protein LLP1 in Arabidopsis systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, p.114, 2014.
- BRITO, A.C.; OLIVEIRA, S.A.S.; OLIVEIRA, E.J. Genome-wide association study for resistance to cassava root rot. **The Journal of Agricultural Science**, v.155, p.1424-1441. 2017.
- BRITO, A.C.Q.; DE MELLO, J.F.; CÂMARA, M.P.S.; VIEIRA, J. C. B.; MICHEREFF, S. J.; SOUZA-MOTTA, C.M.; MACHADO, A.R. Diversity and pathogenicity of

Botryosphaeriaceae species associated with black root rot and stem cutting dry rot in *Manihot esculenta* in Brazil. **The European Journal of Plant Pathology**, v. 157, p.583–598, 2020.

BRITO, A.C.Q.; DE MELLO, J.F.; MICHEREFF, S.J.; DE SOUZA-MOTTA, C.M.; MACHADO, A.R. First report of *Macrophomina pseudophaseolina* causing stem dry rot in cassava in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, p.1245-1245, 2019.

CASCIELLO, C., TONIN, F., BERINI, F., FASOLI, E., MARINELLI, F., POLLEGIONI, L., & ROSINI, E. A valuable peroxidase activity from the novel species *Nonomuraea gerenzanensis* growing on alkali lignin. **Biotechnology Reports**, v.13, p.49-57, 2017.

CESARINO, I., ARAÚJO, P., MAYER, J. L. S., LEME, A. F. P., & MAZZAFERA, P. Enzymatic activity and proteomic profile of class III peroxidases during sugarcane stem development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.55, p.66-76, 2012.

CHEN, J., ULLAH, C., REICHEL, M., BERAN, F., YANG, Z.-L., GERSHENZON, J., ... VASSÃO, D. G. (2020). The phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* detoxifies plant glucosinolate hydrolysis products via an isothiocyanate hydrolase. **Nature Communications**, v.11, 2020.

CHEN, Q., TIAN, Z., JIANG, R., ZHENG, X., XIE, C., & LIU, J. StPOTHR1, a NDR1/HIN1-like gene in *Solanum tuberosum*, enhances resistance against *Phytophthora infestans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.496, p.1155–1161, 2018.

CHENG, Y. et al. Characterization of non-host resistance in broad bean to the wheat stripe rust pathogen. **BMC Plant Biology**, v. 12, p.96-107, 2012.

CHIBA, Y., SHIMIZU, T., MIYAKAWA, S., KANNO, Y., KOSHIBA, T., KAMIYA, Y., & SEO, M. (2015). Identification of *Arabidopsis thaliana* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins capable of transporting plant hormones. **Journal of plant research**, v.128, p.679-686, 2015.

CHISHOLM, S.T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B.J. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v.124, p.803–814, 2006.

CONESA A, GOTZ S, GARCIA-GOMEZ JM, TEROL J, TALON M, ROBLES M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v.21, p.3674–3676, 2005.

CORRATGÉ-FAILLIE, C., & LACOMBE, B. Substrate (un) specificity of *Arabidopsis* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins. **Journal of Experimental Botany**, v.68, p.3107-3113, 2017.

CORRER, F.H., HOSAKA, G.K., GÓMEZ, S.G.P. ET AL. Time-series expression profiling of sugarcane leaves infected with *Puccinia kuehnii* reveals an ineffective defense system leading to susceptibility. **Plant Cell Rep**, v.39, p.873–889, 2020.

CROUZET J., TROMBIK T., FRAYSSE AS, BOUTRY M. (2006) Organization and function of the plant pleiotropic drug resistência ABC transporter family. **FEBS Lett**, v.580, p.1123–1130, 2006.

- DAGUERRE, Y.; SIEGEL, K.; EDEL-HERMANN, V.; STEINBERG, C. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. **Fungal Biology Reviews**, v.28, p. 97-125, 2014.
- DORNELES, K. R., PAZDIORA, P. C., HOFFMANN, J. F., CHAVES, F. C., MONTE, L. G., RODRIGUES, F. A., & DALLAGNOL, L. J. Wheat leaf resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* induced by silicon activation of phenylpropanoid metabolism. **Plant Pathology**, v.67, p.1713-1724, 2018.
- DRAGANA, R., NIKOLA, G., ŽELJKO, D., GORDANA, A., & OLGICA, N. (2017). Separation of peroxidases from *Miscanthus x giganteus*, their partial characterisation and application for degradation of dyes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.120, p.179-185, 2017.
- DUPLAN, V. & RIVAS, S. E3 ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of plant innate immunity. **Frontiers in Plant Science**, v.5, p.42, 2014.
- ECHEVARRÍA-ZOMEÑO S, FERNÁNDEZ-CALVINO L, CASTRO-SANZ AB, LÓPEZ JA, VÁZQUEZ J, CASTELLANO MM. Dissecting the proteome dynamics of the early heat stress response leading to plant survival or death in *Arabidopsis*. **Plant, Cell and Environment**, v.39, p.1264–1278, 2016.
- EL-SHARKAWY, I., MILA, I., BOUZAYEN, M., & JAYASANKAR, S. (2010). Regulation of two germin-like protein genes during plum fruit development. **Journal of experimental botany**, v.61, p.1761-1770, 2010.
- FACELLI, E.; MCKAY, S.F.; FACELLI, J.M.; SCOTT, E.S. A soil-borne generalist pathogen regulates complex plant interactions. **Plant Soil**, v.433, p.101–109, 2018.
- FENG, H., LI, H., ZHANG, M., SONG, Y., YUAN, G., HAN, Q., & HUANG, L. Responses of Fuji (*Malus domestica*) and Shandingzi (*Malus baccata*) apples to *Marssonina coronaria* infection revealed by comparative transcriptome analysis. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.106, p.87-95, 2019.
- FERNANDES, H., MICHALSKA, K., SIKORSKI, M., & JASKOLSKI, M. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. **FEBS Journal**, v.280, 1169–1199, 2013.
- FINKINA, E. I., MELNIKOVA, D. N., BOGDANOV, I. V., & OVCHINNIKOVA, T. V. Plant Pathogenesis-Related Proteins PR-10 and PR-14 as Components of Innate Immunity System and Ubiquitous Allergens. **Current Medicinal Chemistry**, v.24, 2017.
- FOUNDATION AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). **Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets – November 2018**.
- FREITAS, M.A; MEDEIROS, F.H.V; MELO, I.S; PEREIRA, P.F.; PEÑAFLO, M.F.G.V.; BENTO, J.M.S.; PARÉ, P.W. Stem inoculation with bacterial strains *Bacillus amyloliquefaciens* (GB03) and *Microbacterium imperiale* (MAIIF2a) mitigates *Fusarium* root rot in cassava. **Phytoparasitica**, v.47, p.135–142, 2019.
- FUKUDA, W.M.G.; SILVA, S. de O.; IGLESIAS, C. Cassava breeding. **Crop Breeding and**

Applied Biotechnology, v.2, p.617-638, 2002.

GAO, X.; WU, M.; XU, R.; WANG, X.; PAN, R.; KIM, H.J; LIAO, H. Root interactions in a maize/soybean intercropping system control soybean soil-borne disease, Red crown Rot. **PLoS ONE**, v.9, 2014.

GHAG, S. B., SHEKHAWAT, U. K. S., & GANAPATHI, T. R. Native cell-death genes as candidates for developing wilt resistance in transgenic banana plants. **AoB Plants**, 6, 2014.

GÓMEZ-CANO, F., SOTO, J., RESTREPO, S., BERNAL, A., LÓPEZ-KLEINE, L., & LÓPEZ, C. E. Gene co-expression network for *Xanthomonas*-challenged cassava reveals key regulatory elements of immunity processes. **European Journal of Plant Pathology**, v.153, p.1083-1104, 2019.

HE, S.; YUAN, G.; BIAN, S.; HAN, X.; LIU, K.; CONG, P.; ZHANG, C. Major Latex Protein MdMLP423 Negatively Regulates Defense against Fungal Infections in Apple. **International journal of molecular sciences**, v.21, p.1879, 2020.

HOLMQUIST, L.; DÖLFORS, F.; FOGELQVIST, J.; COHN, J.; KRAFT, T.; DIXELIUS, C. Major latex protein-like encoding genes contribute to *Rhizoctonia solani* defense responses in sugar beet. **Molecular Genetics and Genomics**, p.1-10, 2020.

HUANG, X.; WEN T.; ZHANG, J.; MENG, L.; ZHU, T.; CAI, Z. Toxic organic acids produced in biological soil disinfestation mainly caused the suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **BioControl**, v.60, p.113– 124, 2015.

HUNZIKER, P., GHAREEB, H., WAGENKNECHT, L., CROCOLL, C., AND HALKIER, B. A. De novo indol-3-ylmethyl glucosinolate biosynthesis, and not long-distance transport, contributes to defence of Arabidopsis against powdery mildew. **Plant Cell Environ**, v.43, p.1571–1583, 2020.

JAIN, D., & KHURANA, J. P. Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. . In: Singh A., Singh I. (eds) *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*, Springer, p.265–281, 2018.

JAIN, S., & KUMAR, A. The pathogenesis related class 10 proteins in plant defense against biotic and abiotic stresses. **Adv Plants Agric Res**, v.3, 2015.

KABBAGE, M., KESSENS, R., BARTHOLOMAY, L. C., & WILLIAMS, B. The life and death of a plant cell. **Annual Review of Plant Biology**, 68, 375-404, 2017.

KAMINAKA, H., MIURA, C., ISOWA, Y., TOMINAGA, T., GONNAMI, M., EGUSA, M., & IFUKU, S. (2020). Nanofibrillation is an Effective Method to Produce Chitin Derivatives for Induction of Plant Responses in Soybean. **Plants**, v.9, p.810, 2020.

KANG, C. H., JUNG, W. Y., KANG, Y. H., KIM, J. Y., KIM, D. G., JEONG, J. C., ... & CHUNG, W. S. AtBAG6, a novel calmodulin-binding protein, induces programmed cell death in yeast and plants. **Cell Death & Differentiation**, v.13, p.84-95, 2006.

KESKİN, B. C. Quantitative mRNA Expression Profiles of Germin-Like and Extensin-Like

Proteins under Drought Stress in *Triticum aestivum*. **International Journal of Life Sciences and Biotechnology**, v.2, p.95-107, 2019.

KELLEY, D.R. E3 ubiquitin ligases: key regulators of hormone signaling in plants. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.17, p. 1047–1054, 2018.

KHAN, A.; ALI, M.; KHATTAK, A.M.; GAI, W.X.; ZHANG, H.X.; WEI, A.M.; GONG, Z.H. GONG Heat Shock Proteins: Dynamic Biomolecules to Counter Plant Biotic and Abiotic Stresses. **Int. J. Mol. Sci.** v.20, p. 5321, 2019.

LI, C.; DENG, G.; YANG, J.; VILJOEN, A.; JIN, Y.; KUANG, R.; ZUO, C.; LV, Z.; YANG, Q.; SHENG, O.; WEI, Y.; HU, C.; DONG, T.; YI, G. Transcriptome profiling of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium*. **BMC Genomics**, v. 13, p.374, 2012.

LI, D., WANG, F., LIU, B., ZHANG, Y., HUANG, L., ZHANG, H., & SONG, F. Ectopic Expression of Rice Os BIANK 1, Encoding an Ankyrin Repeat-Containing Protein, in *Arabidopsis* Confers Enhanced Disease Resistance to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae*. **Journal of Phytopathology**, v.161, p.27-34, 2013.

LI, Y., KABBAGE, M., LIU, W., & DICKMAN, M. B. Aspartyl protease-mediated cleavage of BAG6 is necessary for autophagy and fungal resistance in plants. **The Plant Cell**, v.28, p.233-247, 2016.

LIM PO, KIM HJ, NAM HG. 2007. Leaf senescence. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, 115–136, 2007.

LIMA, A.M; MOURAD, E.F; ISHIDAD, A.K.N; PEREIRA, A.C.C; REIS, S.P; SOUZA, C.R.B. Expression profiles of defense genes in cassava storage roots upon exposure to *Phytophthora* sp. causal agent of soft root rot disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.104, p.23–30, 2018.

LIU, C., PENG, H., LI, X., LIU, C., LV, X., WEI, X., ... SUN, X. Genome-wide analysis of NDR1/HIN1-like genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) and functional characterization of CaNHL4 under biotic and abiotic stresses. **Horticulture Research**, v.7, 2020.

LIU, Q., LUO, L., WANG, X., SHEN, Z., & ZHENG, L. Comprehensive analysis of rice laccase gene (OsLAC) family and ectopic expression of OsLAC10 enhances tolerance to copper stress in *Arabidopsis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, p.209, 2017.

LIU, S., GE, F., HUANG, W., LIGHTFOOT, D. A., & PENG, D. Effective identification of soybean candidate genes involved in resistance to soybean cyst nematode via direct whole genome re-sequencing of two segregating mutants. **Theoretical and Applied Genetics**, v.132, p.2677-2687, 2019.

LOHSE M, NAGEL A, HERTER T, MAY P, SCHRODA M, ZRENNER R, TOHGE T, FERNIE AR, STITT M, USADEL B. Mercator: A fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. **Plant Cell Environ**, v.37, p. 1250–1258, 2014.

LÓPEZ-GALIANO, M. J., RUIZ-ARROYO, V. M., FERNÁNDEZ-CRESPO, E., RAUSELL,

C., REAL, M. D., GARCÍA-AGUSTÍN, P., ... & GARCÍA-ROBLES, I. Oxylin mediated stress response of a miraculin-like protease inhibitor in Hexanoic acid primed eggplant plants infested by Colorado potato beetle. **Journal of plant physiology**, v.215, p.59-64, 2017.

LUN AT, CHEN Y, SMYTH GK It's DE-licious: a recipe for differential expression analyses of RNA-seq experiments using quasi-likelihood methods in edgeR. **Methods Mol Biol** v.1418, 391–416, 2016.

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; OLIVEIRA, S. A. S.; PEREIRA, O. L. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.39, p.464-470, 2014.

MACHO, A.P., AND ZIPFEL, C. Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. **Current Opinion Microbiology**, v. 23, p. 14-22, 2015.

MALDONADO, A., YOUSSEF, R., MCDONALD, M., BREWER, E., BEARD, H., & MATTHEWS, B. Overexpression of four Arabidopsis thaliana NHL genes in soybean (*Glycine max*) roots and their effect on resistance to the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 86, 1–10, 2014.

MANDAL, A., SHARMA, N., MUTHAMILARASAN, M., & PRASAD, M. Ubiquitination: a tool for plant adaptation to changing environments. **The Nucleus**, v.61, p.253-260, 2018.

MARUTHI, M. N., BOUVAINE, S., TUFAN, H. A., MOHAMMED, I. U., & HILLOCKS, R. J. Transcriptional response of virus-infected cassava and identification of putative sources of resistance for cassava brown streak disease. **PloS one**, v.9, e96642, 2014.

MCCALLUM, E.J.; ANJANAPPA, R.B.; GRUISSEM, W. Tackling agriculturally relevant diseases in the staple crop cassava (*Manihot esculenta*). **Current Opinion in Plant Biology**, v.38, p.50–58, 2017.

MENG, Y., LI, J., DING, M., KHURSHID, M., LI, Q., LU, X., & ZHOU, M. Jasmonate-regulated ERF109-MYB51-MYC3 ternary complexes control indolic glucosinolates biosynthesis. **bioRxiv**, 643494, 2019.

MIHAJLOVIC, M.; REKANOVIC, E.; HRUSTIC, J.; GRAHOVAC, M.; TANOVIC, B. Methods for management of soilborne plant pathogens. **Pestic Phytomed**, v.32, p. 9-24, 2017.

MOROZOVA, O., HIRST, M., & MARRA, M. A. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. **Annual review of genomics and human genetics**, v.10, p.135-151, 2009.

MUÑOZ-BODNAR, A., PEREZ-QUINTERO, A. L., GOMEZ-CANO, F., GIL, J., MICHELMORE, R., BERNAL, A., ... & LOPEZ, C. RNAseq analysis of cassava reveals similar plant responses upon infection with pathogenic and non-pathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Plant cell reports**, v.33, p.1901-1912, 2014.

NA, J. K., KIM, J. K., KIM, D. Y., & ASSMANN, S. M. Expression of potato RNA-binding proteins StUBA2a/b and StUBA2c induces hypersensitive-like cell death and early leaf

senescence in Arabidopsis. **Journal of experimental botany**, v.66, p.4023-4033, 2015.

NIKS, R.; LI, X.; MARCEL, T. C. Quantitative resistance to biotrophic filamentous plant pathogens: concepts, misconceptions, and mechanisms. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p.445-470, 2015.

NISHIMURA, K., KATO, Y., & SAKAMOTO, W. Essentials of proteolytic machineries in chloroplasts. **Molecular plant**, v.10, p.4-19, 2017.

NIU, L., LIU, L., & WANG, W. Digging for Stress-Responsive Cell Wall Proteins for Developing Stress-Resistant Maize. **Frontiers in plant science**, 11, 576385, 2020.

NOTARO, K.A.; MEDEIROS, E.V.; SILVA, C. A.D.; BARROS, J. A. Prospecção de fitopatógenos associados à podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. **Bioscience Journal**, v.5, p.1832-1839, 2013.

OLIVEIRA. S.A.S.; HOHENFELD. C.S.; SANTOS. V.S.; HADDAD. F.; OLIVEIRA. E.J. Resistance to *Fusarium* dry root rot disease in cassava accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1414-1417, 2013.

ONYEKA, T. J.; DIXON, A. G. O.; EKPO, E. J. A. Identification of levels of resistance to cassava root rot disease (*Botryodiplodia theobromae*) in African landraces and improved germplasm using in vitro inoculation method. **Euphytica**, v.145, p.281-288, 2005.

PANDEY, V. P., AWASTHI, M., SINGH, S., TIWARI, S., & DWIVEDI, U. N. (2017). A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. **Biochem. Anal. Biochem**, v.6, p.2161-1009, 2017.

PANGESTI, N., REICHEL, M., VAN DE MORTEL, J. E., KAPSOMENOU, E., GERSHENZON, J., VAN LOON, J. J. A., ... PINEDA, A. (2016). Jasmonic Acid and Ethylene Signaling Pathways Regulate Glucosinolate Levels in Plants During Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance Against a Leaf-Chewing Herbivore. **Journal of Chemical Ecology**, v.42, p.1212–1225, 2016.

PENG, H., PU, Y., YANG, X., WU, G., QING, L., MA, L., & SUN, X. (2019). Overexpression of a pathogenesis-related gene NbHIN1 confers resistance to Tobacco Mosaic Virus in *Nicotiana benthamiana* by potentially activating the jasmonic acid signaling pathway. **Plant Science**, v.283, p.147–156, 2019.

PENNA, E., ESPINO, J., DE STEFANI, D., & RIZZUTO, R. (2018). The MCU complex in cell death. **Cell Calcium**, v.69, p.73–80, 2018

PIERMAN, B., TOUSSAINT, F., BERTIN, A., LÉVY, D., SMARGIASSO, N., DE PAUW, E., & BOUTRY, M. (2017). Activity of the purified plant ABC transporter NtPDR1 is stimulated by diterpenes and sesquiterpenes involved in constitutive and induced defenses. **Journal of Biological Chemistry**, v.292, p.19491-19502, 2017.

PROCHNIK, S., MARRI, P. R., DESANY, B., RABINOWICZ, P. D., KODIRA, C., MOHIUDDIN, M., et al. The cassava genome: current progress, future directions. **Tropical Plant Biology**. v. 5, p. 88–94, 2012.

- RAMIREZ, E., DEREEPER, A., BERNAL, A., SZUREK, B., & LÓPEZ, C. (2020). 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, 101535, 2020.
- SADANANDOM, A., BAILEY, M., EWAN, R., LEE, J. & NELIS, S. The ubiquitin-proteasome system: central modifier of plant signaling. *New Phytologist* 196, 13-28, 2012.
- SANTIAGO, C.H.; SANTANA, M.P.; JUNIOR, L.R.C.; OLIVEIRA, S.A.S.; OLIVEIRA, E.J. Methodologies for selecting cassava with resistance to dry and black root rot under controlled conditions. **Bragantia**, v.77, p.440-451, 2018.
- SASSE, J., SCHLEGEL, M., BORGHI, L., ULLRICH, F., LEE, M., LIU, G. W., ... & KRETZSCHMAR, T. (2016). *Petunia hybrida* PDR2 is involved in herbivore defense by controlling steroidal contents in trichomes. *Plant, cell & environment*, 39(12), 2725-2739, 2016.
- SEKHWAL, M.K.; LI, P.; LAM, I.; WANG, X.; CLOUTIER, S.; YOU, F.M. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. **International journal of molecular sciences**, v.16(8), p.19248-19290, 2015.
- SELINSKI, J.; HARTMANN, A.; DECKERS-HEBESTREIT, G.; DAY, D. A.; WHELAN, J.; SCHEIBE, R. Alternative oxidase isoforms are differentially activated by tricarboxylic acid cycle intermediates. **Plant physiology**, v.176, p.1423-1432, 2018.
- SILVA, J.M.; MEDEIROS, E.V.; DUDA, G.P.; BARROS, J.A.; SANTOS, U.J. FAMES and microbial activities involved in the suppression of cassava root rot by organic matter. **Revista Caatinga**, v. 30. p. 708-717, 2017.
- SILVA-BRANDÃO, K. L., HORIKOSHI, R. J., BERNARDI, D., OMOTO, C., FIGUEIRA, A., & BRANDÃO, M. M. (2017). Transcript expression plasticity as a response to alternative larval host plants in the speciation process of corn and rice strains of *Spodoptera frugiperda*. *BMC genomics*, 18(1), 792, 2017.
- SINGH, A. K. et al. Molecular screening of blast resistance genes in rice using SSR markers. **Plant Pathology Journal**, v. 31, p. 12-24, 2015.
- SINGH, A. K., SINGH, P. K., ARYA, M., SINGH, N. K., & SINGH, U. S. (2015). Molecular screening of blast resistance genes in rice using SSR markers. *The Plant Pathology Journal*, 31(1), 12, 2015.
- SOLTANI, A., WERADUWAGE, S. M., SHARKEY, T. D., & LOWRY, D. B. (2019). Elevated temperatures cause loss of seed set in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) potentially through the disruption of source-sink relationships. *BMC genomics*, 20(1), 312, 2019.
- STAEL, S. et al. Plant innate immunity - sunny side up? *Trends in Plant Science*, v. 20, p. 3-11, 2015.
- Suh, J. Y., Kim, S. J., Oh, T. R., Cho, S. K., Yang, S. W., & Kim, W. T. (2016). Arabidopsis Tóxicos en Levadura 78 (AtATL78) mediates ABA-dependent ROS signaling in response to

drought stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 469(1), 8-14, 2016.

SUN, X. L., YU, Q. Y., TANG, L. L.; JI, W.; BAI, X.; CAI, H.; ... ZHU, Y. M. GsSRK, a G-type lectin S-receptor-like serine/threonine protein kinase, is a positive regulator of plant tolerance to salt stress. **Journal of plant physiology**, v.170, p.505-515, 2013.

TEARDO, E., CARRARETTO, L., WAGNER, S., FORMENTIN, E., BEHERA, S., DE BORTOLI, S., ... & RIZZUTO, R. (2017). Physiological characterization of a plant mitochondrial calcium uniporter in vitro and in vivo. *Plant Physiology*, 173(2), 1355-1370, 2017.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 43, n. 1, p.D204-D212, 27 out. 2014. Oxford University Press (OUP).

THIMM O, BLÄSING O, GIBON Y, NAGEL A, MEYER S, KRÜGER P, SELBIG J, MÜLLER LA, RHEE SY, STITT M (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* 37(6):914–939.

TRDÁ, L., et al. Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 219, 2015.

TSAY, Y. F., SCHROEDER, J. I., FELDMANN, K. A., & CRAWFORD, N. M. (1993). The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*, 72(5), 705-713, 1993.

UMA, B.; RANI, T.S.; PODILE, A. R. Warriors at the gate that never sleep: non-host resistance in plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 168, p. 2141- 2152, 2011.

UTSUMI, Y.; TANAKA, M.; KUROTANI, A.; YOSHIDA, T.; MOCHIDA, K.; MATSUI, A.; ISHITANI, M.; SRAPHET, S.; WHANKAEW, S.; ASVARAK, T. et al. Cassava (*Manihot esculenta*) transcriptome analysis in response to infection by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* using an oligonucleotide-DNA microarray. **Journal of Plant Research**, v.129, p. 711-726, 2016.

VAID, N.; MACOVEI, A.; TUTEJA, N. Knights in action: lectin receptor-like kinases in plant development and stress responses. **Molecular plant**, v.6, p.1405-1418, 2013.

VAN AKEN, O., & VAN BREUSEGEM, F. (2015). Licensed to kill: mitochondria, chloroplasts, and cell death. *Trends in plant science*, 20(11), 754-766, 2015.

VILAS BOAS, S.A.; HOHENFELD, C.S.; OLIVEIRA, S.A.S.; SANTOS, V.S.; OLIVEIRA, E.J. Sources of resistance to cassava root rot caused by *Fusarium* spp.: a genotypic approach. **Euphytica**, v.9, p.237–251, 2016.

VILAS BOAS, S.A.; OLIVEIRA, S.A.S.; BRAGANÇA, C.A.D.; RAMOS, J.B.; OLIVEIRA, E.J. Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. **Scientia Agricola**, v.74, p.60–67, 2017.

- VIMOLMANGKANG, S., DENG, X., OWITI, A., MEELAPH, T., OGUTU, C., & HAN, Y. (2016). Evolutionary origin of the NCSI gene subfamily encoding norcochlorine synthase is associated with the biosynthesis of benzylisoquinoline alkaloids in plants. **Scientific reports**, 6(1), 1-10.
- VO, K. T. X., KIM, C. Y., CHANDRAN, A. K. N., JUNG, K. H., AN, G., & JEON, J. S. (2015). Molecular insights into the function of ankyrin proteins in plants. **Journal of plant biology**, 58(5), 271-284.
- WANG, J., WANG, J., HU, M., WU, S., QI, J., WANG, G., ... & ZHOU, J. M. (2019). Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science*, 364(6435).
- WANG, Z., GERSTEIN, M., & SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**, 10(1), 57-63, 2009.
- WITTE, C. P., & HERDE, M. (2020). Nucleotide metabolism in plants. **Plant Physiology**, 182(1), 63, 2020
- XU, D., DENG, Y., XI, P., YU, G., WANG, Q., ZENG, Q., ... & GAO, L. (2019). Fulvic acid-induced disease resistance to *Botrytis cinerea* in table grapes may be mediated by regulating phenylpropanoid metabolism. *Food chemistry*, 286, 226-233, 2019.
- YANG, C. L., LIANG, S., WANG, H. Y., HAN, L. B., WANG, F. X., CHENG, H. Q.; WU, X.M.; QU, Z.L.; WU, J.H.; XIA, G.X. Cotton major latex protein 28 functions as a positive regulator of the ethylene responsive factor 6 in defense against *Verticillium dahliae*. **Molecular plant**, v. 8, p.399-411, 2015.
- YANG, Y., ZHANG, Y., DING, P., JOHNSON, K., LI, X., & ZHANG, Y. (2012). The ankyrin-repeat transmembrane protein BDA1 functions downstream of the receptor-like protein SNC2 to regulate plant immunity. **Plant physiology**, 159(4), 1857-1865, 2012.
- YOU, Q., ZHAI, K., YANG, D., YANG, W., WU, J., LIU, J., ... & LIU, J. (2016). An E3 ubiquitin ligase-BAG protein module controls plant innate immunity and broad-spectrum disease resistance. **Cell host & microbe**, 20(6), 758-769, 2016.
- ZHANG B, JIA J, YANG M, YAN C, HAN Y. Overexpression of a LAM domain containing RNA-binding protein LARP1c induces precocious leaf senescence in *Arabidopsis*. **Molecules and Cells** 34, 367–374, 2012.
- ZHANG, H. et al. Histological and molecular studies of the non-host interaction between wheat and *Uromyces fabae*. **Planta**, v. 234, p.979-991, 2011.
- ZHANG, X. Y., NIE, Z. H., WANG, W. J., LEUNG, D. W., CHEN, B. L., CHEN, Z., ... & LIU, E. E. (2013). Relationship between disease resistance and rice oxalate oxidases in transgenic rice. **Plos One**, 8(10), e78348, 2013.
- ZHAO, T., WANG, J., ZHANG, B. ET AL. Genome-Wide Analysis of Lectin Receptor-Like Kinases in Tomato (*Solanum lycopersicum*) and Its Association with the Infection of Tomato Yellow Leaf Curl Virus. **Plant Mol Biol Rep** v.36, p.429–438, 2018.
- ZOU, C., LIU, D., WU, P., WANG, Y., GAI, Z., LIU, L., ... & GUO, G. (2020). Transcriptome

analysis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) in response to alkaline stress. **Plant Molecular Biology**, 102(6), 645-657, 2020.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos sobre os principais aspectos da interação *M. esculenta* vs patógenos causadores de podridões radiculares, incluindo os relativos aspectos que condicionam a patogenicidade e agressividade das diferentes espécies, bem como os mecanismos genéticos da resistência às podridões e sua exploração para o desenvolvimento de variedades resistentes são relativamente recentes na cultura da mandioca. Os resultados deste projeto contribuem para o avanço do conhecimento sobre os patógenos causadores de podridão radicular em mandioca, além de contribuir de forma prática no que diz respeito à identificação de fontes de resistência, bem como na geração e recomendação de genótipos com produtividade e/ou características agrônomicas diferenciadas, capazes de se desenvolver e produzir em locais onde estas doenças são limitantes para o cultivo.

No primeiro artigo, confirmamos a ocorrência simultânea de mais de uma espécie de patógenos causadores de podridões radiculares em uma área naturalmente infestada. Foi observada que os isolados associados às podridões diferem quanto à sua agressividade, crescimento micelial e a produção de enzimas extracelulares. E que a diferença na produção enzimática pode interferir nos mecanismos de penetração e colonização utilizados por estes patógenos, resultando em sintomas distintos associados a cada tipo de podridão radicular.

No segundo artigo, os resultados indicaram a existência de ampla variabilidade para resistência à podridão radicular em *M. esculenta*, associada a uma importante variação agrônômica passível de seleção. Dentre 148 genótipos avaliados, dez foram selecionados e serão utilizados como parentais na formação de populações segregantes nas próximas etapas do programa de melhoramento de mandioca, com foco em resistência à podridão radicular. Com base nas seleções realizadas foi possível o mapeamento de cinco SNPs (*single nucleotide polymorphism*) possivelmente associados à manutenção da maior produtividade de raízes tuberosas de plantas cultivadas em área com alta infestação e potencial de inóculo de patógenos causadores de podridões radiculares.

Por fim, no terceiro artigo, foi possível avaliar a expressão diferencial de genes em genótipos contrastantes quanto a resistência, bem como a dinâmica temporal desta expressão. Com base nesses resultados, um total de 18 genes candidatos foram selecionados, e a validação dos mesmos possibilitará o uso de marcas moleculares funcionais associadas à resistência para posterior *screening* de germoplasma em populações segregantes, visando a identificação dos clones mais promissores quanto a resistência às podridões radiculares.