

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

**PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA: METODOLOGIAS DE  
INOCULAÇÃO E SELEÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA**

**CAMILA SANTIAGO HOHENFELD**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
ABRIL- 2016**

**PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA: METODOLOGIAS DE  
INOCULAÇÃO E SELEÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA**

**CAMILA SANTIAGO HOHENFELD**

Licenciada em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), 2013

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

**Orientador: Prof. Dr. EDER JORGE DE OLIVEIRA**  
**Coorientador: Prof. Dr. SAULO ALVES SANTOS DE OLIVEIRA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CRUZ DAS ALMAS - BA – 2016

## FICHA CATALOGRÁFICA

H718 Hohenfeld, Camila Santiago.

Podridão radicular da mandioca: metodologias de inoculação e seleção de fontes de resistência / Camila Santiago Hohenfeld. – Cruz das Almas, BA., 2016.

86 f. il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira.

Coorientador: Prof. Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

Dissertação (em Recursos Genéticos Vegetais)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016.

1. Mandioca. 2. Doença de planta. 3. Melhoramento vegetal. 4. Podridão radicular. I. Oliveira, Eder Jorge de II. Oliveira, Saulo Alves Santos de . III. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia IV. Título.

CDD: 633.682 (21.ed.)

Ficha catalográfica elaborada por Lucidalva R. G. Pinheiro- Bibliotecária CRB51161 – Embrapa Mandioca e Fruticultura

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE  
CAMILA SANTIAGO HOHENFELD



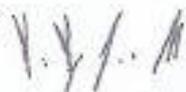
---

Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira  
Embrapa Mandioca e Fruticultura / UFRB  
(Orientador)



---

Dr. Vanderlei da Silva Santos  
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF



---

Dr. Francisco Ferraz Laranjeira Barbosa  
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos  
Genéticos Vegetais em .....  
Conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais  
em.....

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu pai Guilherme, por toda luz;

À minha mãe Evanilda, meu maior incentivo;

À minha irmã Larissa, meu porto seguro.

Amo vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por todo amor, luz e presença em minha vida;

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), 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 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela bolsa concedida;

Ao meu orientador, pesquisador Dr. Eder Jorge de Oliveira, pela oportunidade dada, pela disponibilidade, pela confiança em mim depositada, pelos conhecimentos compartilhados e pelo exemplo de profissional dedicado e comprometido;

Ao meu coorientador, pesquisador Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira, pela paciência, pela presença constante, por todo apoio em experimentos, por todos ensinamentos e inúmeras correções;

À turma do setor de campo por todo apoio, disponibilidade, ajuda e dedicação;

Aos companheiros de jornada, Alírio, Ariana, Letícia e Zanon, torço pela realização profissional de cada um;

À toda turma do Laboratório de Fitopatologia pela amizade e ajuda, em especial à equipe mandioca (Mariana, Daniela, Luiz, Rony, Bernardo, Juliana e Leandro) obrigada por todo apoio e todo esforço, vocês são especiais;

Aos meus amigos fora do mundo acadêmico, obrigada por todo incentivo, por serem minha rota de fuga e entenderem a minha ausência;

Obrigada a todos que me apoiaram e torceram por essa etapa!

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO .....	1
<b>CAPÍTULO 1</b>	
CRESCIMENTO MICELIAL E ESPORULAÇÃO DE <i>Fusarium</i> spp. E <i>Neoscytalidium hyalinum</i> E SUAS IMPLICAÇÕES NA SEVERIDADE DA PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA .....	16
<b>CAPÍTULO 2</b>	
METODOLOGIAS DE SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA PARA RESISTÊNCIA A PODRIDÃO RADICULAR EM AMBIENTE CONTROLADO .....	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	77

## **PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA: METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO E SELEÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA**

Autora: Camila Santiago Hohenfeld

Orientador: Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

**Resumo:** Para o sucesso na avaliação de genótipos de mandioca com resistência à podridão radicular é imprescindível o conhecimento das condições favoráveis para o crescimento e reprodução dos patógenos envolvidos para o estabelecimento de metodologias eficientes de seleção. Assim, o objetivo desse estudo foi desenvolver procedimentos metodológicos para avaliação precoce do nível de resistência em diferentes genótipos de mandioca. Foi determinada a faixa ótima de crescimento e agressividade de isolados causadores de podridão negra e seca; bem como o crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura; e a influência da temperatura na severidade da doença. O meio BDA (batata – dextrose – ágar) possibilitou maior crescimento micelial e esporulação dos patógenos. Para podridão seca (PS) e podridão negra (PN), a faixa ótima de crescimento dos isolados foi  $26 \pm 2$  °C e  $32 \pm 2$  °C, respectivamente, enquanto que para esporulação e severidade dos sintomas a faixa foi de  $26 \pm 2$  e  $32 \pm 2$  °C, respectivamente. Foram utilizadas inoculações baseadas em imersão de tecidos em suspensão de esporos, e infestação de solo, como também metodologias de inoculação em tecido destacado. A infestação do solo possibilitou maior redução do peso e volume de raízes, porém não diferiu da imersão da maniva para os parâmetros redução da parte aérea e índice de doença. Observou-se forte correlação positiva entre PN na haste e PS na haste ( $r = 0,94$ ,  $P = 0,001$ ); PS na casca e na polpa da raiz ( $r = 0,73$ ,  $P = 0,01$ ), e correlação moderada entre PN na haste e PN na casca da raiz ( $r = 0,56$ ,  $P = 0,05$ ). Observou-se que a resistência em cada tecido é aparentemente independente e que deve ser comparada com a severidade da podridão radicular em condições de campo.

**Palavras-chave:** *Manihot esculenta* Crantz, melhoramento genético, *Fusarium solani*, *Neoscytalidium hyalinum*.

## **CASSAVA ROOT ROT DISEASE: INOCULATION METHODOLOGIES AND SELECTION OF SOURCES OF RESISTANCE**

Author: Camila Santiago Hohenfeld

Advisor: Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira

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

**Abstract:** To succeed in the evaluation of cassava genotypes with resistance to root rot disease, the knowledge of most favorable conditions for growth and spore production of causal agent is essential to establish efficient selection methods. The objective of this study was to develop methodological procedures for early assessment of the resistance level in different cassava genotypes. The optimal range of growth and aggressiveness of isolates that were responsible for black root rot and dry root rot were determined as well as the mycelial growth and sporulation in culture media; and also the influence of temperature on the severity of the disease. The PDA medium (potato - dextrose - agar) allowed greater mycelial growth and sporulation of the pathogens. For dry root rot (PS) and black root rot (PN), the optimal temperature for growth of the isolates was  $26 \pm 2$  °C and  $32 \pm 2$  °C, respectively, while for sporulation and severity of symptoms the range was from  $26 \pm 2$  and  $32 \pm 2$  °C, respectively. Inoculations were used based immersion of the tissue on spore suspension and soil infestation, as well as inoculation methodologies in detached tissue. The soil infestation allowed greater reduction in weight and volume of the roots, but did not differ from cuttings immersion for the reductions of the aerial part and disease index. A strong positive correlation was observed between PN and PS on the stem ( $r = 0,94$ ,  $P = 0,001$ ); PS peel and root pulp ( $r = 0,73$ ,  $P = 0,01$ ) and moderate correlation between PN and PN in the root peel ( $r = 0,56$ ,  $P = 0,05$ ). It was observed that the resistance of each tissue is apparently independent and should be compared with the severity of root rot in field conditions.

**Keywords:** *Manihot esculenta* Crantz, breeding, *Fusarium solani*, *Neoscytalidium hyalinum*.

## INTRODUÇÃO

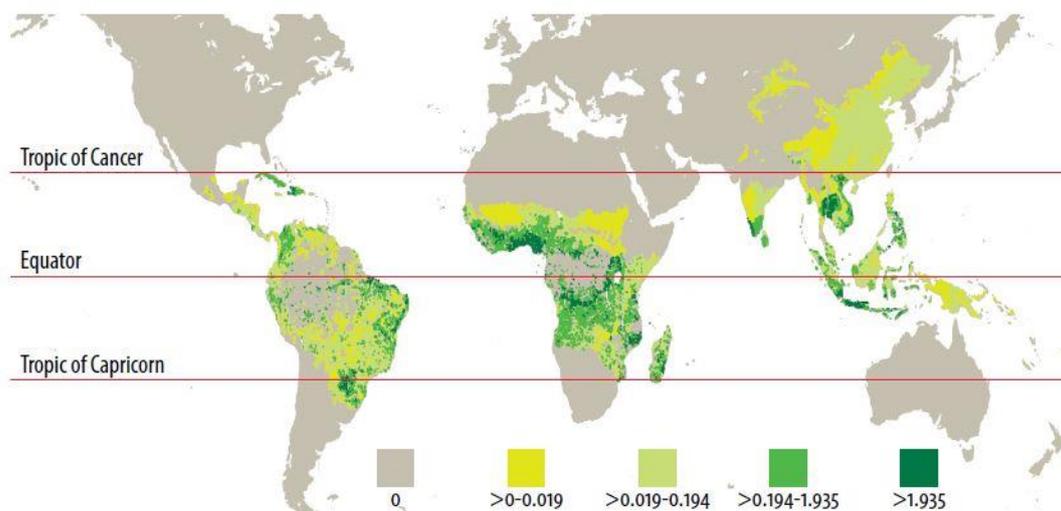
A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), pertence à classe Magnoliopsida, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae e ao gênero *Manihot*, para o qual foram identificadas 98 espécies (ORLANDIN; LIMA, 2014). No Brasil, foram encontradas cerca de 76 espécies (66 endêmicas) (CORDEIRO et al., 2014), o que representa 80% da diversidade conhecida (ALLEM, 2002); seguido do México, com 17 espécies. A maioria das espécies do gênero ocorre na América do Sul, onde colonizaram ambientes sazonalmente secos (DUPUTIÉ et al., 2011) enquanto que um centro secundário de diversidade do gênero ocorre na América Central e no México (OLSEN, 2004). A espécie *M. esculenta* é a única cultivada comercialmente, por apresentar raízes tuberosas ricas em amido, tendo portanto, ampla utilização na alimentação humana e animal (FIALHO; VIEIRA, 2011).

Embora os estudos com marcadores moleculares sobre a origem da espécie cultivada e a filogenia do gênero ainda não sejam conclusivos (CHACÓN et al., 2008), acredita-se que a domesticação da *M. esculenta* tenha ocorrido na América Latina, sendo em seguida levada para o continente africano e subsequentemente para o asiático (ALLEM, 2002).

As plantas de mandioca são diploides ( $2n = 36$  cromossomos) e apresentam um metabolismo intermediário entre C3 e C4 (EI SHARKAWY et al., 1989; RAFFAILAC; SECOND, 2001; CARVALHO; GUERRA, 2002). Normalmente são propagadas vegetativamente, embora tenham uma reprodução sexuada ativa, com a presença de inflorescências masculinas e femininas separadas numa mesma planta (monóica), além de uma protoginia bastante acentuada, o que favorece a polinização cruzada (alógama) (GRANER, 1942), mantendo e aplicando a variabilidade genética que pode ser explorada por programas de melhoramento genético da espécie (SILVA, 2001). Porém, fatores como variedade, clima, solo e idade das plantas podem alterar substancialmente a quantidade de sementes produzidas (MONTEIRO et al., 1984).

A mandioca é uma cultura alimentar tropical amplamente cultivada na África, Ásia e América Latina (Figura 1), totalizando em média, 450 milhões de toneladas por ano (FAO, 2013). No Mundo é a quarta maior fonte de energia alimentar, por ser uma importante fonte de carboidratos, tendo com isso grande importância socioeconômica (NASSAR; ORTIZ, 2007). A mandioca possui uma

ampla adaptação a diversas condições de clima e um rendimento satisfatório em solos de baixa fertilidade, nos quais normalmente é cultivada, sendo relevante para a segurança alimentar, principalmente para agricultura de subsistência (ANDRÉ; SANTOS, 2012). As suas folhas possuem um elevado teor de proteína, superior até ao das forrageiras tropicais, assim, não só a raiz, mas a parte aérea também pode ser utilizada como fonte de alimento (ANDRÉ; SANTOS, 2012).

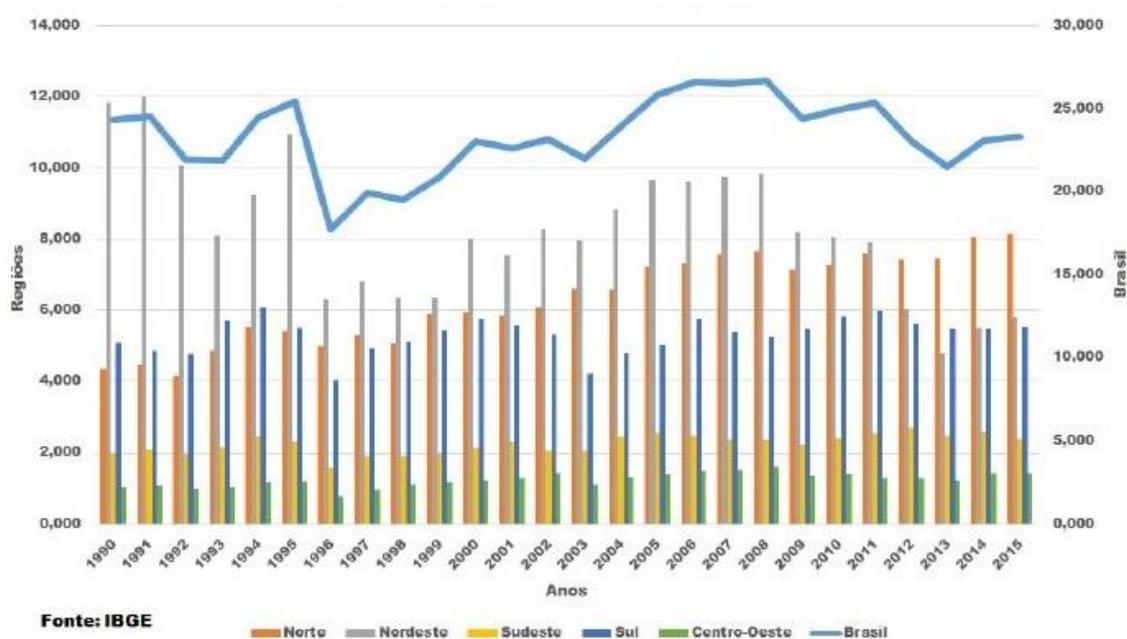


**Figura 1.** Área colhida de mandioca mundialmente (ha/km<sup>2</sup>). Fonte: FAO, 2013.

A mandioca é cultivada em todos os estados brasileiros, devido à sua fácil adaptação. Em termos de área cultivada, apresenta-se entre os dez primeiros produtos agrícolas do país, ocupando a quinta posição, em volume de produção. A demanda pela mandioca vem aumentando, principalmente pelas indústrias, e estima-se que, apenas na produção de farinha e fécula, sejam gerados no Brasil mais de um milhão de empregos diretos (EMBRAPA, 2003).

Nos últimos 25 anos, o menor valor bruto de produção de mandioca no Brasil foi registrado em 1996, com aproximadamente 17 milhões de toneladas, sendo o maior registro de produção feito entre 2005 – 2008, onde foram colhidos mais que 25 milhões de toneladas por ano (Figura 2). A partir do ano de 2011, devido a problemas climáticos, principalmente no Nordeste, as Regiões Norte e Sul começaram a despontar maiores produtores (CONAB, 2015). Contudo, a produção nacional de raiz de mandioca está se recuperando; no ano de 2015, o Brasil produziu aproximadamente 23,1 milhões de toneladas (IBGE, 2015), sendo classificado como quarto maior produtor mundial, ficando abaixo apenas da

Nigéria, Indonésia e Tailândia (FAO, 2015). O estado que se destaca como maior produtor de mandioca é o Pará (4,8 milhões de toneladas) (SEAB, 2015) cuja principal finalidade é a produção da farinha (SANTANA et al., 2010). Porém, a maior concentração de indústrias de fécula do país está localizada no estado do Paraná (FELIPE et al., 2013) onde a produção também é expressiva, sendo 3,87 milhões de toneladas produzidas em 2014, é o segundo estado maior produtor do Brasil (SEAB, 2015).



**Figura 2.** Evolução da produção de raiz de mandioca 1990-2015: Brasil e Grandes Regiões (milhões de toneladas). Fonte: IBGE (2015).

Apesar do destaque na produção mundial, a expansão da mandiocultura é dificultada pela ocorrência de estresses de origem abiótica (ex. deterioração fisiológica pós-colheita) e de origem biótica (insetos, ácaros e microrganismos) (BORGES et al., 2002), baixa produtividade de raízes em comparação com o potencial da cultura (FELIPE et al., 2013) e principalmente a baixa disponibilidade de variedades resistentes a pragas e doenças.

Várias doenças podem afetar a produtividade da mandioca em todos os países produtores, dentre elas estão doenças causadas por vírus, como o vírus do mosaico africano (*African cassava mosaic virus*), o vírus do mosaico das nervuras (*Cassava vein mosaic virus*), mosaico comum (*Cassava common mosaic*

*virus*), CBSD (*Cassava Brown Streak Disease*); causadas por bactéria, como a bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*), e fitoplasma (superbrotamento), ou mesmo com etiologia duvidosa, como é o caso do couro de sapo (*Cassava frogskin disease*), e por fungos, como a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e podridão radicular, sendo esta última causada por uma ampla diversidade de espécies de patógenos.

### **Podridão radicular**

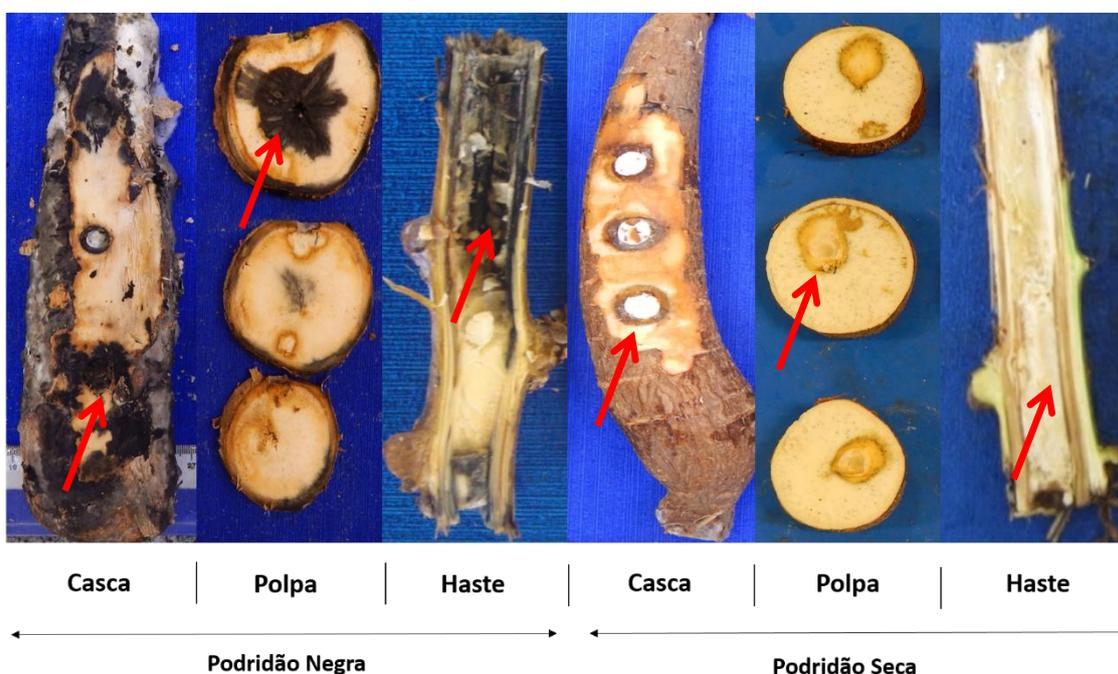
A podridão radicular vem se tornando uma doença de alto impacto econômico e social nos principais países produtores do continente africano (ONYEKA et al., 2005a) e no Brasil (SERRA et al., 2009), pois provoca queda progressiva na produtividade da mandioca, com relatos de perdas de até 100% na produtividade de raízes (MOSES et al., 2007), além de inutilizar as áreas para plantio ao longo dos ciclos da cultura (NOTARO, 2013). Por serem patógenos habitantes do solo e afetarem principalmente as raízes tuberosas, o efeito do apodrecimento pode ser camuflado até a colheita, já que a planta de mandioca tem um extenso sistema radicular, podendo permanecer de pé, apesar de uma parcela significativa de suas raízes estarem podres (MSIKITA et al., 2005; BANDYOPADHYAY et al., 2006).

As espécies de fitopatógenos já descritas como associadas à podridão radicular em mandioca são: *Neofusicoccum mangiferae* (= *Nattrassia mangiferae*); *Lasiodiplodia* (*Botryodiplodia*) *theobromae*; *Fusarium* spp. (ex. *F. solani*, *F. verticillioides* e *F. oxysporum*); *Nectria mauritiicola* (= *Spherostilbe repens*); *Macrophomina phaseolina*; espécies de *Phytophthora* e *Pythium*; *Rosellinia necatrix*; *Armillaria mellea*; *Rigidoporus microporus* (= *Rigidoporus lignosus*); *Sclerotium rolfsii*; *Scytalidium* sp.; além de *Lasiodiplodia* spp. e *Neoscytalidium hyalinum* (FUKUDA, 1991; MASOLA; BEDENDO, 2005; ONYEKA et al., 2005a; MSIKITA et al., 2005; BANDYOPADHYAY et al., 2006; AIGBE; REMISON, 2009; SENTHIL et al. 2013a; GUO et al. 2012; MACHADO et al., 2014).

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; VILAS BOAS et al.

2016), e elas podem diferir quanto à sua capacidade de colonização e por conseguinte, na agressividade (ONYEKA et al., 2005c).

A podridão da raiz pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento das plantas de mandioca, normalmente classificada como podridão seca, podridão mole ou podridão negra. Os sintomas são bastante distintos em função dos agentes causais (Figura 3) e sua ocorrência durante a estação seca ou estação chuvosa (BANDYOPADHYAY et al., 2006). Tecidos de plantas infectadas por uma espécie de *Fusarium*, por exemplo, muitas vezes apresentam lesões de coloração rósea, amarelo ou marrom claro, enquanto que o tecido infectado com *Lasiodiplodia theobromae* normalmente é marrom escuro, acinzentado ou preto (AKINYELE; IKOTUN, 1988).



**Figura 3.** Sintomas incitados pela podridão negra e podridão seca em diferentes tecidos da mandioca. Fonte: Camila Hohenfeld.

As principais espécies causadoras de podridão negra no Brasil pertencem à família Botryosphaeraceae, entre eles, *Lasiodiplodia* spp., *Neoscytalidium hyalinum* e *Neofusicoccum mangiferae* (= *Nattrassia mangiferae*) (MSIKITA et al., 2005; MACHADO et al., 2014) que afetam a raiz e o caule da mandioca, provocando uma redução na brotação das manivas (MASOLA; BEDENDO, 2005). A podridão seca, no Brasil, está associada a espécies do gênero *Fusarium* (F.

*graminearum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* e *F. solani*) (dados não publicados), provoca estrias nas raízes, queda das folhas, amarelecimento, seca, murcha parcial ou total foliar e a consequente morte das plantas (FIALHO; VIEIRA, 2011).

São indicadas como medidas de controle a rotação de culturas, manejo físico do solo, o uso de microrganismos antagônicos, plantio em áreas bem drenadas, utilização de manivas provenientes de áreas sem ocorrência da doença e destruição do material vegetal originário de áreas infestadas (CASTILHO et al., 1990; FUKUDA, 1993; FIALHO; VIEIRA, 2011). Porém, a abordagem mais econômica e confiável para manejar as podridões radiculares da mandioca se baseia no plantio de variedades resistentes (ONYEKA et al., 2005b).

### **Melhoramento genético para resistência a patógenos causadores de podridão radicular**

O principal foco da pesquisa relacionada 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). Apesar do alto custo de coleta e as dificuldades de manutenção de germoplasma, a variabilidade genética da mandioca vem sendo mantida e explorada em diversos bancos de germoplasma (CEBALLOS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2014), porém, 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, distribuído em diferentes instituições nacionais e internacionais. 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, coletados em diversas áreas geográficas.

No Brasil, destaca-se a 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, 2015).

Considerando que a podridão radicular atinge diretamente o produto comercial da mandioca (AIGBE; REMISON, 2009), é importante que se faça um *screening* dos acessos disponíveis em bancos de germoplasma, quanto à resistência à podridão radicular, para que se possam identificar genótipos superiores, de modo a garantir a produtividade em áreas infestadas por estes patógenos.

No Brasil, as variedades BRS Kiriris e BRS Aramaris (sin= Cigana Preta), foram selecionadas no Nordeste brasileiro, como fontes de resistência à podridão de raízes (FUKUDA, 2002), porém não se sabe ao certo se são variedades resistentes a todos os grupos de patógenos ou a um grupo específico. Além do mais, é possível que os mecanismos de resistência dos tecidos da mandioca sejam independentes, e assim, a seleção de resistência com base apenas em um desses tecidos pode não ser completamente eficaz em outro (VILAS-BOAS et al., 2016). Trabalhos em busca de variedades resistentes à podridão radicular já foram desenvolvidos com uso de diferentes tecidos da planta, como raiz destacada, discos de raiz, haste e folha (BARRAGAN; ALVAREZ, 1998; MSIKITA et al., 2005; ONYEKA et al., 2005a; ONYEKA et al., 2005c; SENTHIL et al. 2013b; OLIVEIRA et al., 2013; VILAS-BOAS et al., 2016) onde foram indicados níveis diferentes de resistência à podridão mole, seca e negra, separadamente. Porém, devido à presença de duas ou mais espécies em áreas infestadas, é essencial que a seleção de genótipos seja baseada na busca de fontes com resistência múltipla aos diferentes patógenos causadores de podridão radicular.

Diante dessa realidade, é necessário o desenvolvimento de metodologias de inoculação que permitam uma avaliação conjunta dos principais patógenos causadores de podridão radicular. Contudo, para o sucesso dessa seleção, é

imprescindível um estudo que distinga perfeitamente as condições ótimas para a sobrevivência e reprodução de cada espécie associada à doença, identificar se existe diferença entre a agressividade desses patógenos, e conseqüentemente, se há diferença na severidade da doença provocada pelos diferentes grupos incitadores de podridão radicular no Brasil.

## REFERÊNCIAS

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, 2009.

AKINYELE, B.; IKOTUN, T. Microorganisms associated with cassava tuber rot. IITA Root and Tuber and Plantain Improvement Program. Pages 16-18 in: Annual Report. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria, 1988.

ALLEM, A C. The origin and taxonomy of cassava. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. Cassava: biology, production and utilization. New York: Wallingford, UK, p. 1-16, 2002.

ANDRÉ, T.B.; SANTOS, A.C. Uso de produtos da cultura da mandioca (*Manihot*) na produção animal. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15, p.1622-1647, 2012.

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.

BARRAGAN, M.I.; ALVAREZ, E. Evaluation of tolerance to root rot caused by *Phytophthora* spp. in varieties of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), under greenhouse condition. **ASCOLFI-Inforna**, v.24, p.11–12, 1998.

BORGES, M.F.; FUKUDA, W.M.G.; ROSSETTI, A.G. Avaliação de variedades de mandioca para consumo humano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1559-1565, 2002.

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.

CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, v.136, p.159-168, 2002.

CASTILHO, E.; FUKUDA, C.; TUPINAMBÁ, E. A. Podridão radicular no Estado de Sergipe. I-Isolamento e patogenicidade. **Revista Brasileira de Mandioca**, v.9, p. 90-99, 1990.

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.

CEBALLOS, H.; SANCHEZ, T.; CHAVEZ, A. L.; IGLESIAS, C.; DEBOUCK, D.; MAFLA, G.; TOHME, J. Variation in crude protein content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p. 589-593, 2006.

CHACÓN, J.; MADRIÑÁN, S.; DEBOUCK, D.; RODRIGUEZ, F.; TOHME, J. Phylogenetic patterns in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae) inferred from analyses of nuclear and chloroplast DNA regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.49, p.260-267, 2008.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento. **Mandioca e derivados**. Disponível em: <

[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_09\\_18\\_09\\_18\\_33\\_mandioca\\_conjuntura\\_agosto\\_2015.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_18_09_18_33_mandioca_conjuntura_agosto_2015.pdf)> Acesso em: Dez. 2015.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; SILVA, M.J.; SODRÉ, R.C.; MARTINS, M.L.L. *Manihot* In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17591>>. Acesso em: Dez. 2014.

DUPUTIÉ, A.; SALICK, J.; McKEY, D. Evolutionary biogeography of *Manihot* (Euphorbiaceae), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments. **Journal of Biogeography**, v.1, p.1-11, 2011.

EL-SHARKAWY, M. A.; COCK, J. H.; PORTO, M. C. M. Características fotossintéticas da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.1, p.143-154, 1989.

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultivo da Mandioca para a região do Cerrado. Disponível em: <[https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca\\_cerrados/importancia.htm](https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_cerrados/importancia.htm)>. Acesso em: Jan.2016

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Portal Alelo Recursos Genéticos**. Disponível em: <<http://mwpin026.cenargen.embrapa.br:8080/portalalelo/index.php/portal/colecoes/vegetal/raizes-e-tuberculos>> Acesso em: Dez. 2015.

FELIPE, F. I.; ALVES, L.R.A.; VIEIRA, R.M. Fécula de mandioca. Produção na Tailândia versus Brasil. **Agroanalysis**, p.28, 2013.

FIALHO, J. F.; VIEIRA, E. A. Mandioca no Cerrado: orientações técnicas. Embrapa Cerrados, p. 208, 2011.

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). 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](http://www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/index_en.html)>. Acesso em: Jan.2016.

FOUNDATION AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). Participação dos continentes na produção de mandioca em 2008. FAOSTAT Database Gateway-FAO. Roma. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: Fev. 2015.

FUKUDA, C. Podridão das Raízes da Mandioca. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, Mandioca em Foco, 1991.

FUKUDA, C. Doenças da mandioca. In: Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical (Cruz das Almas, BA). Instruções práticas para o cultivo da mandioca. p.53-56, 1993.

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

GRANER, E. A. Notas sobre florescimento e frutificação da mandioca. **Bragantia**, v.2, p.1-12, 1942.

GUO H, LI CP, SHI T, FAN CJ, HUANG GX. First report of *Phytophthora palmivora* causing root rot of cassava in China. **Plant Disease**, v.96, p.1072, 2012.

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.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola**. Disponível em <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_\[mensal\]/Comentarios/lspa\\_201511comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Comentarios/lspa_201511comentarios.pdf)>. Acesso em: Dez. 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.

MASOLA JUNIOR, N.S. BEDENDO, I.P. Doenças de mandioca. In: KIMAT, H; AMORIN, L; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L.E.A (Eds.). Manual de Fitopatologia. Doenças de plantas cultivadas. **Agrônômica Ceres**, v.2, p 399-455, 2005.

MONTEIRO, D.A.; LORENZI, J.O.; VALLE, T.L.; PEREIRA, A.S.; SABINO, J.C. Produção de sementes de mandioca em plantas com um e dois ciclos vegetativos. **Bragantia**, v.43, p.667-672, 1984.

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., AND 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.

NASSAR, N. M. A. Cassava, *Manihot esculenta* Crantz genetic resources: VI. anatomy of a diversity center. **Genetic and Molecular Research**, v. 2, p. 214-222, 2003.

NASSAR, N.M.A.; ORTIZ, R. Cassava improvement: challenges and impacts. **Journal of Agricultural Science**, v.145, p.163–171, 2007.

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, E.J.; FERREIRA, C.F.; SILVA, S.V.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, G.A.F.; SILVA, M.S. Potential of SNP markers for the characterization of Brazilian cassava germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 127, p. 1423-1440, 2014.

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.

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

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.

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.

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, 2005c.

ORLANDIN, P.; LIMA, L. R. Sinopse do gênero *Manihot* Mill. (*Euphorbiaceae*) no Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, v.41, p.51-60, 2014.

RAFFAILAC, J.; SECOND, G. Cassava. In: TROPICAL plant breeding. Science, Enfield and Cirad: **Science Publishers**, p. 30-54, 2001.

SANTANA, A C.; CARVALHO, D. F.; MENDES, F. A. T.; FILGUEIRAS, G. C.; BOTELHO, M. DO N.; KITABAYASHI, R. T. **Identificação e caracterização de arranjos produtivos locais nos Estados do Pará e do Amapá, no período 2000 a 2005: orientações para políticas de desenvolvimento local**. Belém: UNAMA, p.171, 2010.

SENTHIL, M.; NATH, V.S.; MISRA, R.S; JEEVA, M.L. Incidence and identification of cassava tuber rot caused by *Phytophthora palmivora*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.46, p.741-746, 2013a.

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, 2013b.

SERRA, I.M.R.S., SILVA, G.S.; NASCIMENTO, F.S.; LIMA, L. K. F. *Scytalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 327-328, 2009.

SEAB - Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Análise da conjuntura agropecuária. Mandioca Safra 2014/2015. Disponível em: < [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandioca\\_2014\\_15.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandioca_2014_15.pdf). Acesso em: Jan.2016.

SILVA, R.M. DA; BANDEL, G.; FARALDO, M.I.F.; MARTINS, P.S. Biologia reprodutiva de etnovariedades de mandioca. **Scientia Agricola**, v.58, p.101-107, 2001.

VILAS-BOAS, S.A.; HOHENFELD, C.S.; OLIVEIRA, S.A.S.; SILVA, S.V.; OLIVEIRA, E.J. Sources of resistance to cassava root rot caused by *Fusarium* spp.: a genotypic approach. **Euphytica**, v. 209 p. 237-251, 2016.

## CAPÍTULO 1

### **CRESCIMENTO MICELIAL E ESPORULAÇÃO DE *Fusarium* spp. E *Neoscytalidium hyalinum* E SUAS IMPLICAÇÕES NA SEVERIDADE DA PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA**

---

O artigo será submetido ao comitê editorial do periódico científico Scientia Agricola

## **CRESCIMENTO MICELIAL E ESPORULAÇÃO DE *Fusarium* spp. E *Neoscytalidium hyalinum* E SUAS IMPLICAÇÕES NA SEVERIDADE DA PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA**

**Resumo:** A podridão radicular, causada por um complexo de patógenos habitantes do solo, é uma das doenças mais destrutivas da cultura da mandioca, sendo a utilização de plantas resistentes a ferramenta mais eficaz no manejo desta enfermidade. Para a obtenção de plantas com resistência a patógenos, é primordial o conhecimento das condições ótimas para o seu desenvolvimento, e como estas afetam a severidade das doenças incitadas. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da temperatura e do meio de cultura no crescimento micelial, na produção de conídios, e na severidade dos sintomas causados por *Fusarium* spp. e *Neoscytalidium hyalinum*, causadores de podridão seca e negra, respectivamente. Foi determinada a faixa ótima de crescimento e agressividade dos isolados em cinco temperaturas (10, 15, 25, 30, 35°C); o crescimento micelial e esporulação dos isolados em diferentes meios de cultura (BDA e SNA); e a influência da temperatura na severidade da doença. Os isolados de podridão negra foram mais agressivos que os isolados de podridão seca. Para os causadores de podridão seca da mandioca, a temperatura ótima de crescimento foi de 24 a 28 °C, enquanto a temperatura ótima de esporulação foi de 25 °C até 32 °C. Para os agentes causais da podridão negra, a faixa ótima de crescimento e esporulação variou de 30 a 34 °C. O meio BDA possibilitou o maior crescimento micelial e esporulação para ambos os grupos de doenças. A temperatura que possibilitou a maior severidade da podridão negra foi 32 °C, enquanto para podridão seca, as temperaturas de 25 e 32 °C não diferiram entre si. Esse é o primeiro trabalho para definição das condições ótimas de desenvolvimento dos agentes causais da podridão radicular da mandioca e as suas implicações no progresso da doença.

**PALAVRAS CHAVE:** *Manihot esculenta* Crantz; temperatura, meio de cultura, agressividade, patógenos habitantes de solo.

## MYCELIAL GROWTH AND SPORULATION OF *Fusarium* spp. AND *Neoscytalidium hyalinum* AND ITS IMPLICATIONS IN THE SEVERITY OF CASSAVA ROOT ROT

**Abstract:** Root rot, caused by a complex of soil-borne pathogens, is one of the most destructive diseases of cassava, being genetic resistance the major strategy in the disease management. To obtain plants resistant to pathogens is essential the knowledge of optimum conditions for the development of pathogens and how these affect the severity of the incited diseases. The aim of this study was to evaluate the effect of the temperature and culture media in mycelial growth, conidial production, and severity of symptoms caused by *Fusarium* spp. and *Neoscytalidium hyalinum* causing dry and black cassava root rot, respectively. The optimum range of growth and aggressiveness of isolates into five temperatures (10, 15, 25, 30, 35 ° C); the mycelial growth and sporulation of the isolates in different culture media (potato dextrose agar - PDA and Synthetic Nutrient Agar SNA); and the influence of temperature on the severity of the disease were evaluated. Isolates from black root rot were more aggressive than dry root rot isolates. For dry cassava root rot, the optimum growth temperature was 24 to 28 ° C, while the optimum sporulation temperature was 25 ° C to 32 ° C. For black cassava root rot, the optimum range of growth and sporulation was 30 to 34 ° C. The PDA media allowed the high mycelial growth and sporulation for dry and black root rot. High severity of black root rot was observed at 32 ° C while 25 and 32 ° C did not differ for dry root rot. This is the first report defining the optimal growth conditions of the causal agents of cassava root rot and its implications on the progress of the disease.

**Key words:** *Manihot esculenta* Crantz; temperature, culture media, virulence, soil-borne disease.

## INTRODUÇÃO

A podridão radicular da mandioca tem sido relatada no Brasil desde 1945 (CAMPOS; PICKEL, 1945), porém, nos últimos anos, a sua ocorrência e severidade vêm aumentando em diferentes regiões brasileiras produtoras (SERRA et al., 2009) reduzindo o desempenho produtivo da cultura, uma vez que os prejuízos podem chegar a 80% da produção (BANDYOPADHYAY et al., 2006). Essa enfermidade é causada por diferentes espécies de patógenos habitantes de solo, e a depender da espécie associada à doença, os sintomas expressos nas raízes tuberosas podem ser úteis na distinção dos patógenos envolvidos (BANDYOPADHYAY et al., 2006).

A podridão negra resulta em lesões com coloração preta ou acinzentada e tem sido associada às espécies de *Lasiodiplodia* (= *Botryodiplodia*) *theobromae* e *Scytalidium lignicola* (ONYEKA et al., 2005a; MSIKITA et al., 2005), porém, recentemente, Machado et al. (2014) verificaram que a indicação de *Scytalidium lignicola* como o agente causal da podridão negra, no Brasil, deve ser revista com base na análise molecular, pois várias espécies anteriormente identificadas como *Scytalidium* foram classificadas no gênero *Neoscytalidium*. Por outro lado, a podridão seca, caracterizada por lesões amareladas ou amarronzadas, tem sido atribuída a espécies do gênero *Fusarium* (Ex: *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. graminearum*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum*) (dados não publicados).

Diferentes medidas de manejo podem ser utilizadas a fim de evitar as perdas causadas pelas doenças radiculares. Diversos trabalhos recomendam o uso do controle biológico (UBALUA; OTI, 2007; LOUZADA et al., 2009), indução da supressividade do solo com incorporação de matéria orgânica (SILVA et al., 2013), rotação de cultura (REIS et al., 2011), e controle químico e físico (FISCHER et al., 2005) como medidas gerais de manejo de patógenos causadores de podridões de raízes em diferentes culturas.

A utilização de cultivares resistentes a diferentes patógenos tem sido a prática de manejo mais eficaz, por garantir maior sustentabilidade ao sistema de produção (ONYEKA et al., 2005b) e por ser considerado o principal insumo tecnológico utilizado pelos agricultores na cultura da mandioca. Por outro lado, apesar dos esforços dos programas de melhoramento genético, poucas são as

variedades de mandioca com resistência à podridão radicular disponíveis no Brasil.

Um dos maiores gargalos na seleção de genótipos resistentes à podridão radicular, em condição de campo, é o longo tempo demandado para avaliação dos genótipos (aproximadamente 12 meses), o alto custo dessas avaliações, a dificuldade de identificação dos principais patógenos presentes no solo, a distribuição desuniforme de inóculo, e a grande influência das condições edafoclimáticas na severidade da doença, o que pode resultar em baixa acurácia seletiva (ONYEKA et al., 2005b).

Considerando as dificuldades de seleção de genótipos resistentes a campo, a inoculação em ambiente controlado pode ser uma alternativa viável para auxiliar o desenvolvimento de estudos de resistência genética da planta ao hospedeiro (NTUI et al., 2010; SENTHIL et al., 2013). Porém, para que as inoculações sejam eficazes, ainda é preciso definir condições ideais para o crescimento micelial e a formação dos esporos dos isolados fitopatogênicos, uma vez que estes fatores determinam o desenvolvimento das doenças.

Estudos com *Fusarium* (SHARMA; PANDEY, 2010; THOMPSON et al., 2013) e outras espécies causadoras de podridão negra em diversos patossistemas (SAHA et al., 2008; ALVES et al., 2008; ABDOLLAHZADEH et al., 2010; MARQUES et al., 2013; NETTO et al., 2014), constataram que, *in vitro*, o crescimento micelial e a esporulação dos isolados são afetados diretamente pela temperatura, além de serem favorecidos por meios de cultura que apresentem carboidratos complexos. Contudo, são incipientes as informações relativas às condições ótimas de desenvolvimento dos agentes causais da podridão radicular da mandioca e as suas implicações no progresso da doença.

A caracterização dos patógenos causadores da podridão radicular 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 fundamentais para o estabelecimento de metodologias eficazes para seleção de genótipos resistentes. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da temperatura e do meio de cultura no crescimento micelial, na produção de conídios, e na severidade dos sintomas causados por *Fusarium* spp. e

*Neoscytalidium hyalinum*, como principais espécies causadoras de podridão radicular da mandioca no Brasil.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Determinação da faixa ótima de crescimento e agressividade dos isolados

Foram utilizados oito isolados de patógenos causadores de podridão seca (quatro de *Fusarium oxysporum*, três de *F. solani*, um de *F. lateritium*), e seis isolados causadores de podridão negra (*Neoscytalidium hyalinum*), todos da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, onde os experimentos foram realizados. Culturas monospóricas dos 14 isolados foram crescidas em meio batata dextrose ágar (BDA), a  $26\pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 h, por sete dias. Discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro, contendo estruturas dos patógenos, foram retirados dos bordos do crescimento e depositados no centro de placas de Petri contendo meio BDA, e incubados por sete dias em estufa B.O.D. em cinco temperaturas (10, 15, 25, 35, 40 °C) com alternância de luz/escuro de 12 h.

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:  $A = \pi \frac{D_1 \times D_2}{4}$ . As mensurações foram concluídas quando o crescimento da colônia atingiu os bordos da placa em pelo menos um dos tratamentos.

Para os experimentos envolvendo a comparação da agressividade dos isolados, raízes da variedade comercial Fécula Branca, suscetível à podridão radicular em condições de campo, foram lavadas em água corrente e desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (0,5%) por 3 min. Utilizou-se a metodologia de discos de raízes, conforme Onyeka et al. (2005c). Estes tiveram sua região central 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 repetições.

A inoculação das raízes foi conduzida em câmaras de crescimento com temperatura controlada em  $26\pm 2$  °C, no escuro e umidade relativa >85%. As

raízes foram mantidas em bandejas plásticas cobertas com sacos de polietileno transparentes para manter a umidade do ambiente. O delineamento utilizado foi fatorial inteiramente casualizado com 14 isolados x 5 temperaturas de incubação, e 12 repetições. As avaliações foram realizadas cinco 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 isolados mais agressivos e as temperaturas que proporcionaram um maior crescimento foram utilizados para o experimento que visou determinar a influência do meio de cultura no crescimento micelial, e esporulação dos isolados e sua associação com a severidade da doença.

### **Crescimento micelial e esporulação dos isolados**

Quatro dos isolados mais agressivos (definidos com base na etapa anterior), foram crescidos em dois meios de cultura: BDA e SNA (*Synthetic Nutrient Agar*). As placas foram incubadas em câmara tipo B.O.D. sob as três temperaturas estabelecidas como faixa ótima de crescimento e fotoperíodo de 12h de luz.

O crescimento micelial foi estimado com base na mensuração do diâmetro da colônia em dois sentidos opostos a cada 24 horas, e calculadas conforme fórmula anteriormente descrita. As mensurações foram concluídas quando o crescimento da colônia atingiu os bordos da placa em pelo menos um dos tratamentos.

A esporulação dos isolados foi quantificada para todos os tratamentos anteriores (crescimento micelial). Para tanto, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri, e os conídios liberados com auxílio de escova de dentes com cerdas macias. A suspensão obtida foi filtrada em dupla camada de gaze e a concentração dos esporos determinada por meio da contagem em microscópico ótico com auxílio de hemocitômetro (câmara de Neubauer).

O experimento foi instalado em esquema fatorial inteiramente casualizado, e em esquema fatorial 4x3x2, sendo 4 isolados (2 de podridão negra e 2 de

podridão seca), 3 temperaturas (18 °C, 25 °C e 32 °C) x 2 meios de cultura (BDA e SNA). Foram utilizadas 6 repetições para cada tratamento.

### **Temperatura *versus* severidade da doença**

Para avaliação da influência da temperatura na severidade da doença foram utilizadas três variedades de mandioca: BRS Kiriris, como padrão de resistência à podridão radicular, além de Salangó Preta e BRS Poti Branca, a serem avaliadas. Todas as variedades foram coletadas do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, dentro de uma mesma área experimental, com o mesmo período de plantio. Discos de raízes de todas as variedades foram inoculados conforme metodologia descrita anteriormente. Como controle, utilizaram-se discos de meio BDA (sem crescimento fúngico). As raízes foram mantidas em caixas transparentes do tipo *gerbox* e incubadas em estufa B.O.D sob as três temperaturas estabelecidas como faixa ótima de crescimento e alternância luminosa (12h).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4 isolados x 3 temperaturas x 3 variedades), com dez repetições para cada tratamento. As avaliações foram realizadas cinco dias após a inoculação, mensurando-se a área lesionada. A análise digital das imagens das áreas lesionadas foi realizada com auxílio do Programa ImageTool (University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA).

### **Análises estatísticas**

Os dados obtidos para a determinação da faixa ótima de crescimento, agressividade dos isolados, crescimento micelial e severidade da doença não sofreram transformação, enquanto que os dados de esporulação foram transformados para  $\log(x + 1)$ . Os dados foram submetidos a análise de variância fatorial, e as médias agrupadas pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o programa estatístico R (R Core Team, 2015), pacote *easyanova*. O modelo matemático utilizado para os valores do crescimento micelial em cinco temperaturas foi de regressão linear ( $y = a + bx + cx + \ln x + dx\sqrt{x} + e\sqrt{x}\ln x$ ) e para o crescimento micelial em diferentes meios utilizou-se o modelo  $y = a + \frac{b}{\ln x} + \frac{c}{\sqrt{x}}$ . Foi utilizado o software *Table Curve 2D* (Jandel, 1991) para a seleção

dos modelos matemáticos para os valores do crescimento micelial em cinco temperaturas e em diferentes meios. Os critérios utilizados para a seleção dos modelos foram: ranqueamento das equações, ajuste da linha de tendência e coeficiente de determinação  $R^2$ .

## RESULTADOS

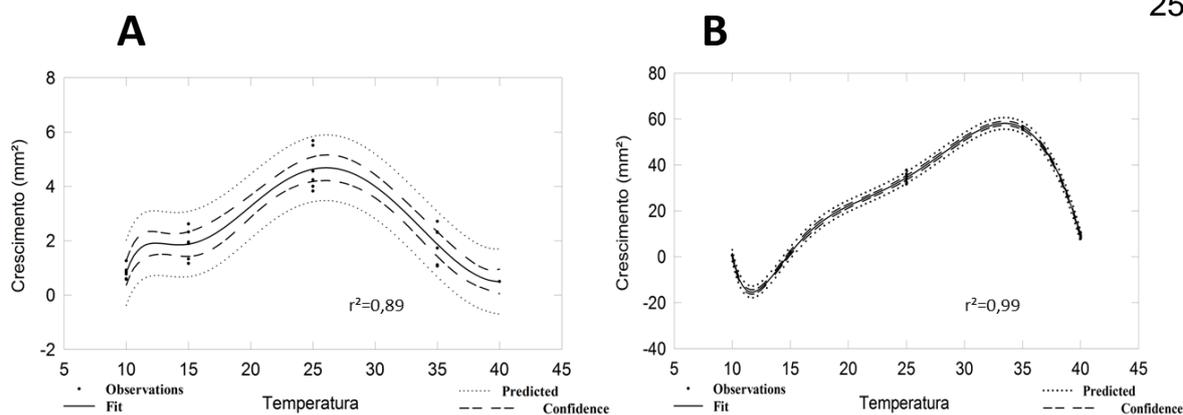
A temperatura influenciou o crescimento dos isolados dos dois grupos de doença: patógenos causadores de podridão seca- 'PCPS' (Figura 1-A) e patógenos causadores de podridão negra- 'PCPN' (Figura 1-B). A faixa ótima de crescimento para podridão seca foi entre 24 a 28 °C, enquanto para o grupo de podridão negra entre 30 a 34 °C. Os isolados de PCPN apresentaram maior crescimento comparado aos isolados de PCPS e atingiram a borda da placa de Petri após 48h de incubação, momento na qual foi encerrada a avaliação do experimento.

Para os isolados PCPS (Tabela 1), a temperatura que favoreceu o seu maior crescimento micelial foi 25 °C, enquanto que em torno de 40 °C de incubação não foi observado crescimento micelial. As temperaturas marginais (10 e 40 °C) não apresentaram diferença em termos de crescimento micelial, mostrando elevada sensibilidade do patógeno causador da podridão seca a extremos de temperaturas. Para os isolados de PCPN (Tabela 1), a temperatura de 35 °C possibilitou um maior crescimento micelial, enquanto que na menor temperatura (10 °C) não foi observado crescimento expressivo dos patógenos.

**Tabela 1.** Valores médios do crescimento micelial ( $\text{mm}^2$ ) de isolados causadores de podridão seca e podridão negra, incubados em diferentes temperaturas.

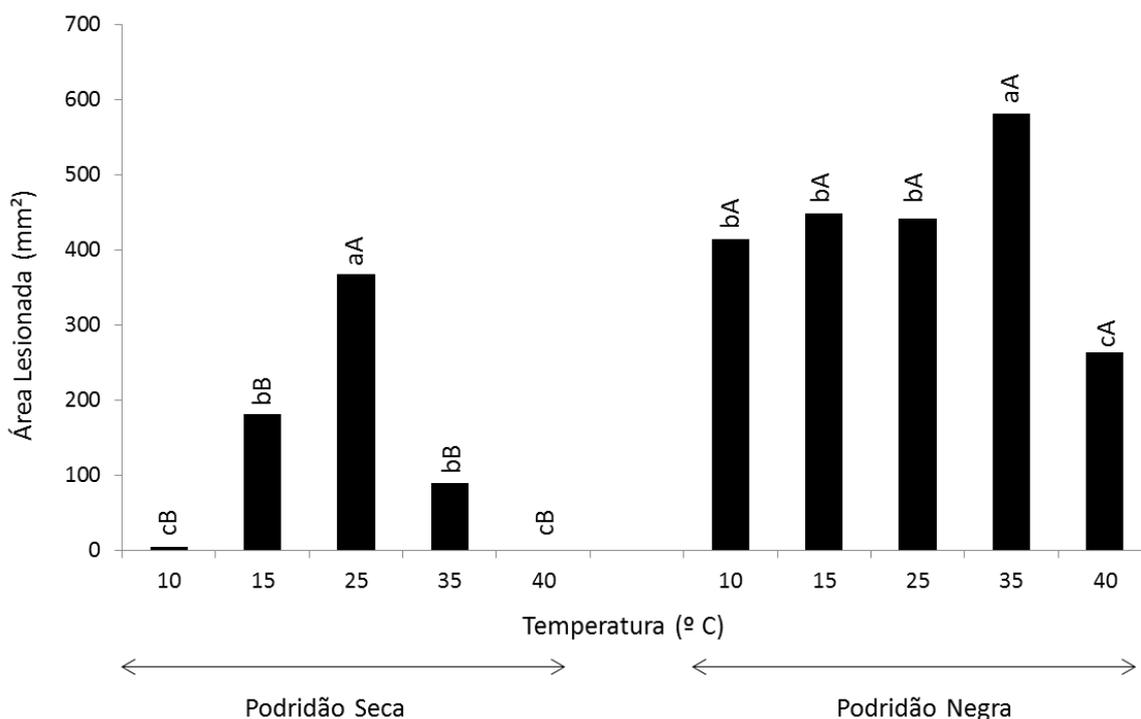
	Temperatura				
	10°	15°	25°	35°	40°
<b>Podridão Seca</b>	0,83 cA	1,87 bA	4,63 aB	1,87 bB	0,5 cB
<b>Podridão Negra</b>	0,5 eA	1,67 dA	34,44 bA	56,16 aA	8,87 cA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).



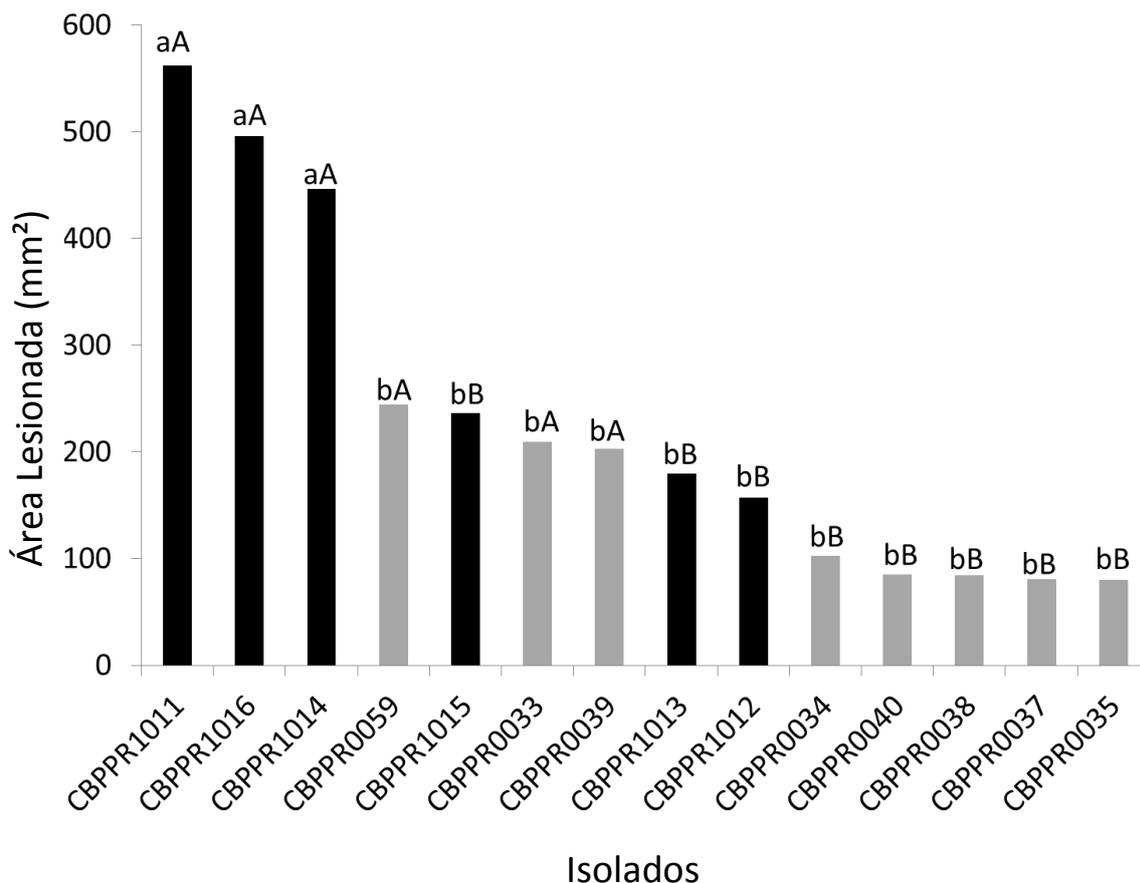
**Figura 1.** Crescimento micelial ( $\text{mm}^2$ ) de patógenos causadores de podridão seca (A) e podridão negra (B). Modelo matemático utilizado:  $(y = a + bx + cx + \ln x + dx\sqrt{x} + e\sqrt{x}\ln x)$ .

Além da influência direta da temperatura sobre o crescimento micelial dos patógenos, a severidade da doença também foi bastante influenciada, ou seja, isolados crescidos e inoculados em sua temperatura ótima foram capazes de incitar sintomas mais severos quando comparado às temperaturas marginais. A inoculação das raízes de mandioca com isolados PCPS, e sua manutenção em temperatura de 25 °C proporcionou maior severidade da podridão, em contraposição a temperaturas marginais (10 e 40 °C), que assim como no experimento do crescimento micelial, provocaram as menores lesões na raiz de mandioca e não diferiram estatisticamente entre si. Para os isolados PCPN, a manutenção das raízes inoculadas em temperatura de 35 °C favoreceu o aparecimento das maiores áreas lesionadas. Por outro lado, aparentemente quando submetidas a temperaturas mais elevadas, a exemplo de 40 °C observou-se uma menor severidade da PCPN (Figura 2).



**Figura 2.** Valores médios da severidade dos sintomas da podridão radicular (negra e seca) em raízes de mandioca, quando submetidas a diferentes temperaturas de crescimento do patógeno. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (comparam a severidade dos grupos de podridão em cada temperatura) e minúscula (comparam o efeito da temperatura na severidade de cada grupo de podridão radicular), não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Dos 14 espécimes avaliados, os isolados de *N. hyalinum* CBPPR1011, CBPPR1016 e CBPPR1014 foram os mais agressivos (Figura 3), resultando em lesões variando de 446,58 a 561,21 mm<sup>2</sup>. Com relação aos PCPS, os isolados de *F. solani*: CBPPR0059 e CBPPR0033; e um isolado de *F. oxysporum* (CBPPR0039) foram os mais agressivos, com lesões variando de 209,26 a 244,17 mm<sup>2</sup> (Figura 3). Portanto, os patógenos associados à podridão negra apresentaram maiores áreas lesionadas nas raízes.



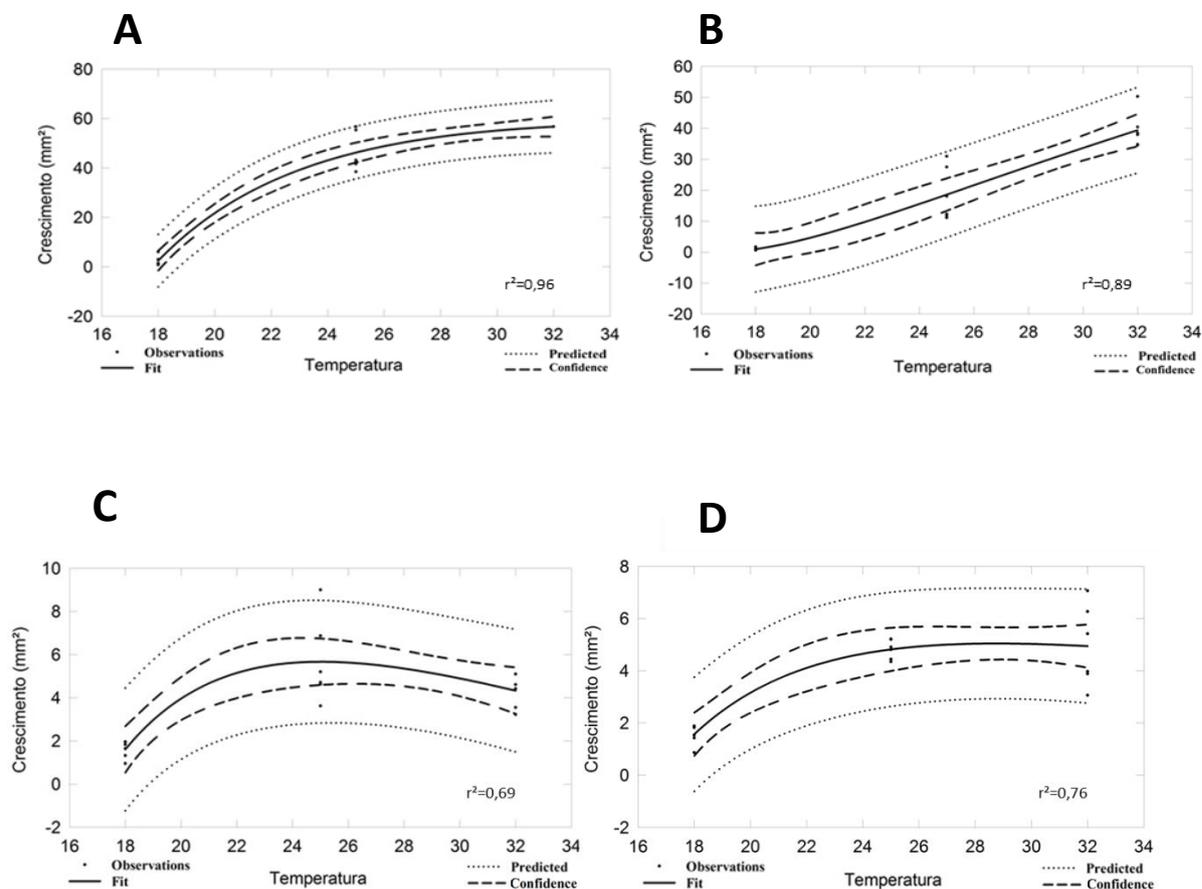
**Figura 3.** Médias da área lesionada causada pela podridão radicular negra (barra de cor preta) e seca (barra de cor cinza) em raízes de mandioca. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (comparam os isolados de podridão dentro do seu grupo de doença) e minúscula (comparam a agressividade dos isolados de forma geral), não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

### Crescimento micelial e esporulação dos isolados

Com base nos resultados anteriores, os isolados mais agressivos de PCPS (CBPPR0059 e CBPPR0033) e PCPN (CBPPR1011 e CBPPR1016) foram selecionados para as análises de crescimento micelial e esporulação em diferentes temperaturas de incubação (18, 25 e 32 °C), cuja variação abrangeu as condições ótimas de crescimento dos dois grupos de isolados.

Independentemente do meio de cultura avaliado (BDA ou SNA), o crescimento micelial dos isolados de PCPS e para PCPN nas diferentes temperaturas foi bastante semelhante ao experimento anterior que definiu as

faixas ótimas de temperatura (Figura 4), sendo que de maneira geral, o meio BDA propiciou o melhor crescimento dos isolados de ambos os grupos de doenças.



**Figura 4.** Gráficos da curva de crescimento micelial de isolados de *Neoscytalidium hyalinum* (podridão negra) cultivados em meio BDA (A) e em meio SNA (B), e isolados de *Fusarium solani* (podridão seca) cultivados em meio BDA (C) e em meio SNA (D). Modelo matemático utilizado:  $(y= a + \frac{b}{\ln x} + \frac{c}{\sqrt{x}})$ .

De modo geral, os isolados causadores de podridão negra apresentaram maior crescimento micelial, e atingiram completamente a borda da placa de Petri em 48 horas, quando incubados em 32 °C, no meio BDA (Tabela 2).

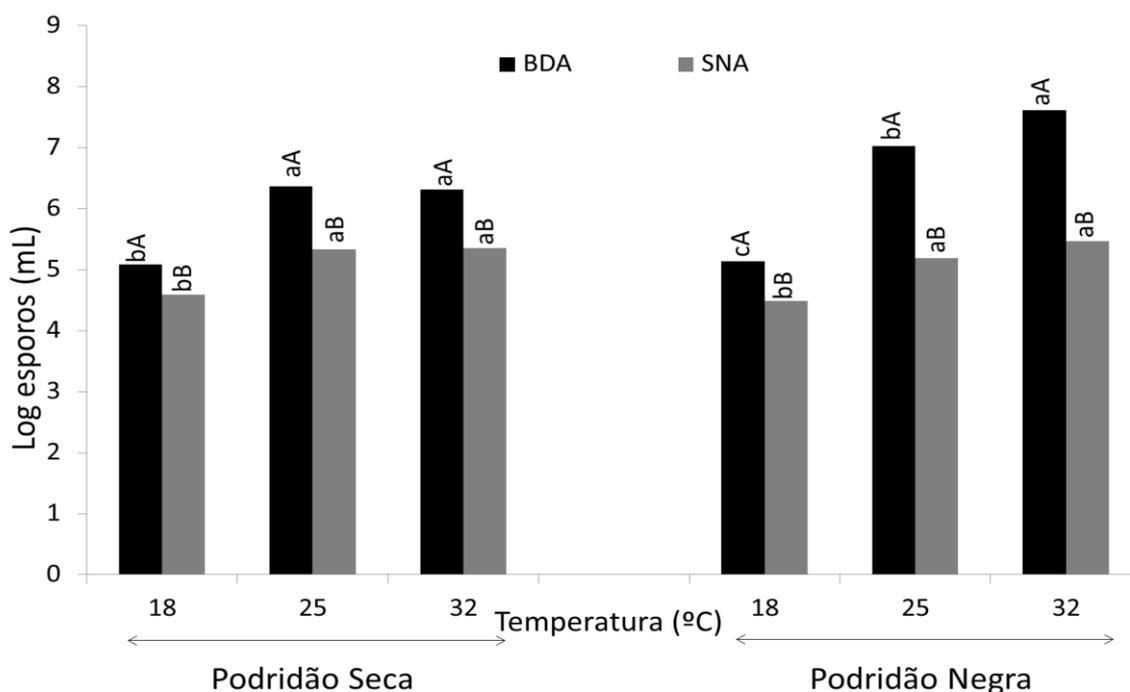
**Tabela 2.** Valores médios do crescimento micelial ( $\text{mm}^2$ ) de isolados causadores de podridão radicular (seca e negra), cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) e *synthetic nutrient agar* (SNA).

	Podridão Seca						Podridão Negra					
	18°		25°		32°		18°		25°		32°	
<b>BDA</b>	1.60	bA	5,66	aA	4,32	abA	2.52	cA	46,25	bA	56,71	aA
<b>SNA</b>	1.57	bA	4,82	aA	4,94	aA	0.95	cA	18,56	bB	39,37	aB

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Independente do meio de cultura e da temperatura de crescimento houve produção de esporos de PCPS e PCPN, embora os isolados de podridão negra tenham apresentado maior esporulação comparado aos de podridão seca ( $5,83 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  e  $5,51 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente).

Estruturas como macro e microconídios foram observadas em *F. solani* em todas as temperaturas, embora as maiores médias de esporulação tenham sido observadas nas temperaturas de 25°C ( $6,37 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) e 32°C ( $6,32 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) no meio BDA (Figura 5). Maior produção de esporos foi observada nos isolados de podridão negra, quando crescidos em meio BDA sob temperatura mais elevada (32°C) ( $7,62 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) (Figura 5).

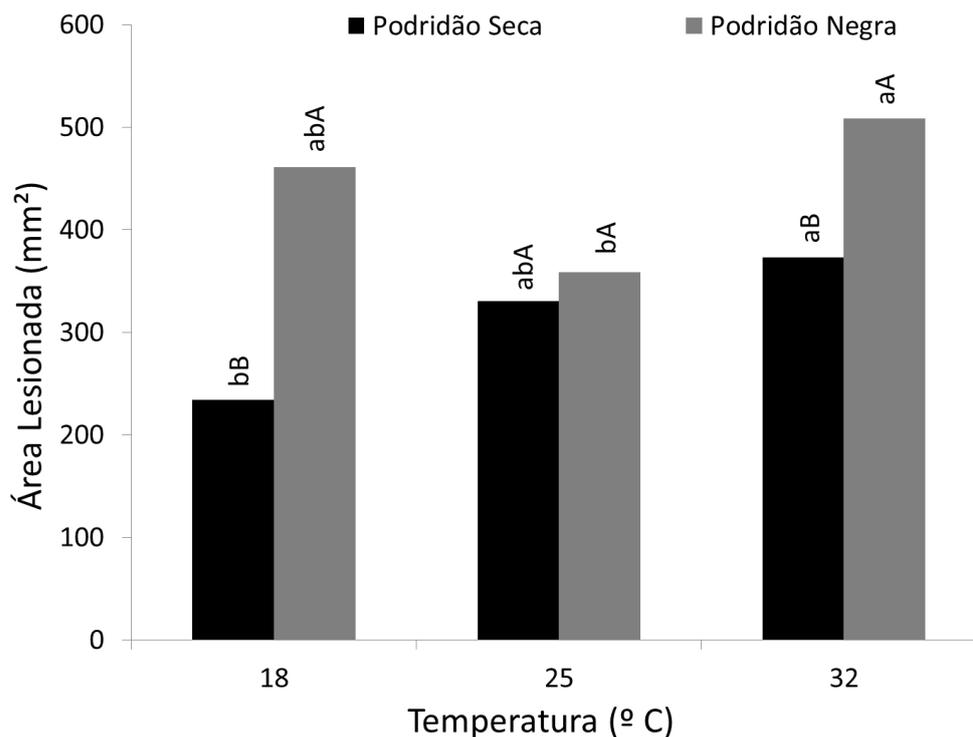


**Figura 5.** Esporulação de fungos causadores de podridão radicular (seca e negra), cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) e *synthetic nutrient agar* (SNA). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (comparam os meios de cultura dentro de cada temperatura) e minúscula (comparam os meios de cultura em todas temperaturas para cada grupo de podridão radicular), não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

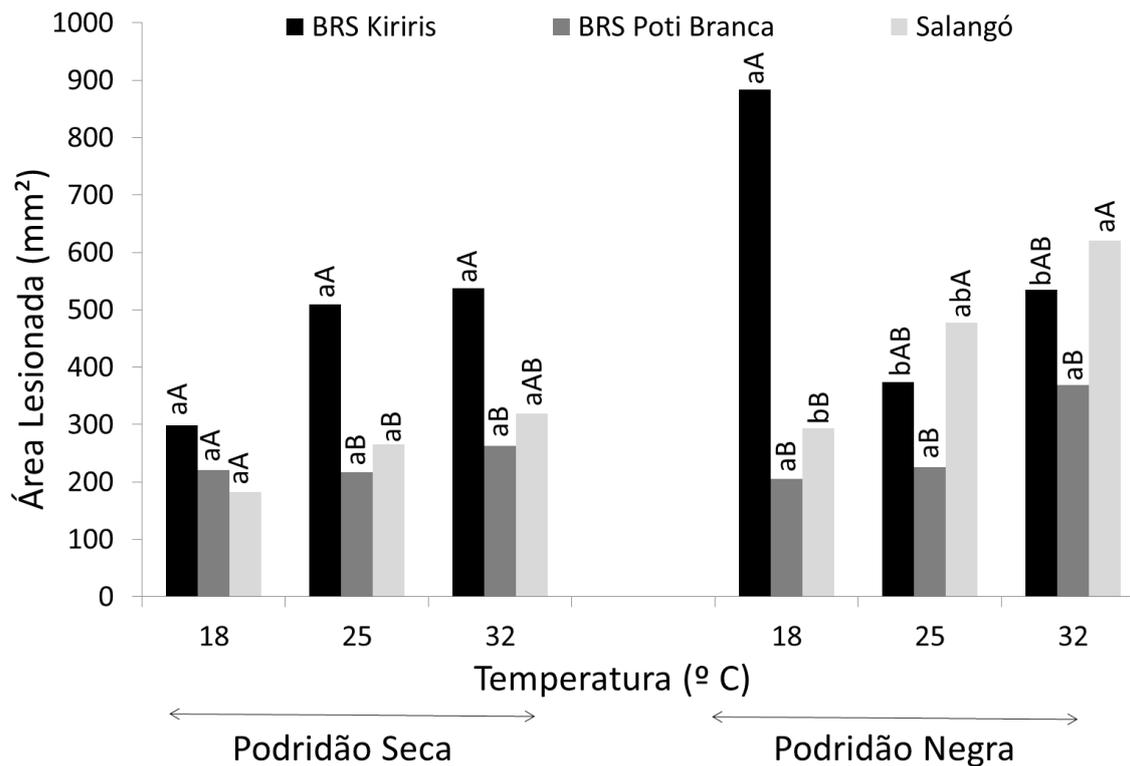
### **Temperatura versus severidade da doença**

Houve influência da temperatura de incubação das raízes e dos fungos causadores da podridão negra e seca na severidade da podridão radicular. Para podridão seca, a severidade da doença aumentou em função do aumento da temperatura, embora não tenha sido observada diferença significativa entre a esporulação desses patógenos a 25 e 32 °C (Figura 6). A severidade das lesões causadas por patógenos associados à podridão negra apresentou um comportamento diferente em relação à podridão seca, pois não foram observadas diferenças significativas entre as temperaturas marginais (18 e 32 °C), mas sim entre a temperatura de 25 °C em relação às demais (Figura 6).

O comportamento dos genótipos de mandioca avaliados variou de acordo com a temperatura e patógeno, ou seja, houve reações diferentes nos dois grupos de doença nas diferentes temperaturas. Quando as três variedades de mandioca foram inoculadas e incubadas a 18°C, não foram observadas diferenças estatísticas das áreas lesionadas para a podridão seca. Porém, nas temperaturas de 25 °C e 32 °C, a BRS Kiriris apresentou as maiores áreas lesionadas (Figura 8). Para a avaliação da podridão negra, diferentemente das demais variedades, a BRS Kiriris apresentou maior susceptibilidade quando submetida à temperatura de 18 °C. Quando incubadas em 25 e 32 °C, as variedades Salangó Preta e BRS Kiriris apresentaram as maiores áreas lesionadas (Figura 7). Por outro lado, a variedade BRS Poti Branca, se manteve estável e apresentou as menores áreas lesionadas para os dois grupos de doença em todas as temperaturas.

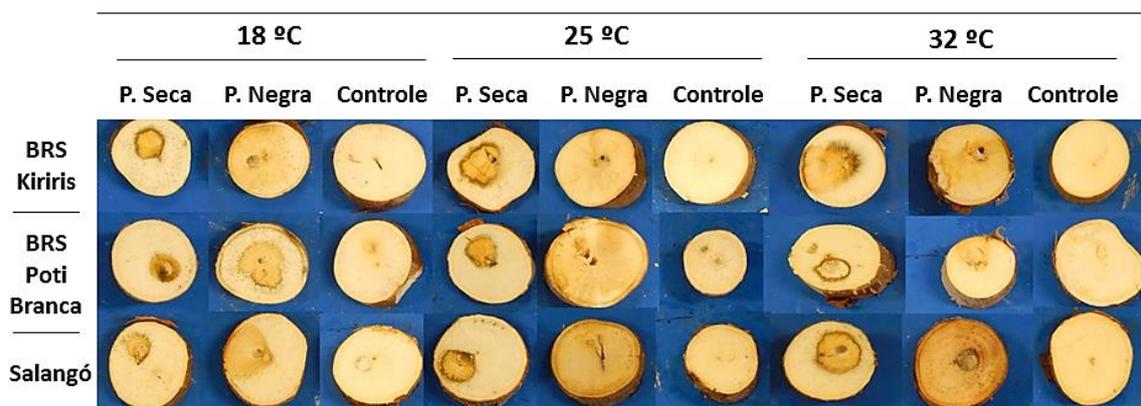


**Figura 6.** Área lesionada nas raízes causada por podridão seca e negra da mandioca, quando submetidos a diferentes temperaturas de crescimento do patógeno e da planta. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (comparam os grupos de doença dentro de cada temperatura de incubação) e minúscula (comparam a severidade de cada grupo de podridão radicular em função da temperatura de incubação), não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7.** Área lesionada nas raízes oriundas de três variedades de mandioca inoculadas por podridão seca e negra, submetidas a diferentes temperaturas de crescimento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (comparam a área lesionada de cada variedade dentro de cada temperatura de incubação) e minúscula (comparam a área lesionada das variedades em função da temperatura de incubação), não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Os isolados diferiram quanto ao tipo de lesão na raiz da mandioca. Em todas as temperaturas e variedades, a podridão seca foi caracterizada por lesões de aspecto seco, a partir do ponto de inoculação, normalmente com um halo amarronzado, enquanto as lesões da podridão negra se expandiram além do ponto de inoculação e apresentaram uma exsudação de albume líquido e amolecimento do tecido infectado (Figura 8).



**Figura 8.** Lesões provocadas por podridão seca e negra em variedades de mandioca incubadas em três temperaturas diferentes.

## DISCUSSÃO

De modo geral, os diversos patógenos associados à podridão radicular da mandioca apresentaram comportamento semelhante apenas para o meio de cultura utilizado para incubação. Por outro lado, a temperatura ótima de crescimento e esporulação *in vitro* dos dois grupos de patógenos foram bastante diferentes. O meio de cultura que propiciou o maior crescimento micelial e esporulação para a podridão seca e negra foi o BDA, sendo o mais indicado para se proceder as inoculações de interesse. Os isolados de PCPS e PCPN, incubados em BDA, apresentaram um micélio aéreo vigoroso e de aspecto cottonoso, enquanto que o meio SNA resultou em um crescimento micelial menos denso para ambos os grupos de patógenos. A possível explicação para esta diferença se deve ao fato do meio BDA apresentar uma maior riqueza nutricional e maior quantidade de carboidratos complexos, de forma a induzir a taxa de crescimento e reprodução desses fungos (SAHA et al., 2008; THOMPSON et al., 2013).

Além do meio de cultura, foi observada a influência da temperatura no crescimento micelial e esporulação das duas espécies, assim como na severidade da doença. A faixa ótima de crescimento e desenvolvimento observada para os isolados causadores de PCPS ( $26 \pm 2$  °C) está em acordo com a faixa ideal de crescimento relatada para outros fungos do gênero, a exemplo de *F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. poae* com temperatura ótima de crescimento *in vitro* de 25° C

(BRENNA et al., 2005; RAMIREZ et al., 2006) e *F. oxysporum* f. sp. *psidii* e *F. solani*, com temperatura ótima de 28 °C (GUPTA et al., 2010). Outros autores tem demonstrado a sensibilidade desses patógenos a temperaturas subótimas (muito baixas ou muito elevadas), fator que pode retardar ou inibir o crescimento desses fungos (JURADO et al., 2008; MEDINA; MEGAN, 2010).

Apesar de o pico de crescimento dos isolados de PCPS e PCPN ter sido observado a 28 °C, a esporulação dos patógenos PCPS não diferiu nas temperaturas de incubação entre 25 e 32 °C. Possivelmente, a redução do crescimento destes fungos em temperaturas mais elevadas tenha provocado um estímulo ao aumento na sua esporulação como uma tentativa de garantir a sobrevivência do fungo neste tipo de ambiente. Para a maior parte das espécies de *Fusarium*, a temperatura ótima de esporulação tem sido relatada entre 25 °C e 35 °C (SCOTT et al., 2010; GUPTA et al., 2010). Esta capacidade de se reproduzir em uma ampla faixa de temperatura pode favorecer o desenvolvimento da doença em diferentes regiões, visto que espécies de *Fusarium* tendem a causar podridão radicular em praticamente todos os ambientes de cultivo da mandioca (BANDYOPADHYAY et al., 2006).

Assim como o crescimento micelial e a esporulação, a severidade da doença causada por PCPS sofreu influência da temperatura de incubação dos patógenos nos dois ensaios. No primeiro ensaio, quando os patógenos foram incubados em diferentes temperaturas e as raízes mantidas em temperatura ambiente (26 °C), a temperatura de incubação que favoreceu a maior severidade da doença foi 25 °C, enquanto que as temperaturas marginais (10 e 40 °C), além de inibirem o crescimento micelial, provocaram as menores lesões na raiz de mandioca e não diferiram estatisticamente entre si. No segundo ensaio, quando os patógenos e as raízes foram mantidos em três temperaturas diferentes (18, 25 e 32 °C), as áreas lesionadas aumentaram conforme a elevação da temperatura, porém não houve diferença entre a severidade da doença nas temperaturas 25 °C e 32 °C, as mesmas temperaturas que proporcionaram uma maior esporulação desses patógenos. Embora não tenha sido observada diferença entre essas duas temperaturas para a esporulação e severidade da doença, a faixa de 26 ± 2 °C pode ser indicada para futuros ensaios em condições controladas, por também ter proporcionado o maior crescimento micelial dos isolados.

Ainda não se sabe se a temperatura pode afetar a cinética das enzimas envolvidas no processo de infecção dos patógenos causadores de podridão radicular na mandioca. Porém, a temperatura pode influenciar na concentração das micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*. Esses fitopatógenos são capazes de produzir um número de micotoxinas tricotecenos que são solúveis em água e podem ser translocadas entre os tecidos ou sugada pelo tecido de origem da infecção (OSBORNE; STEIN, 2007). Para a giberela do trigo, foi observado que a concentração de micotoxinas produzidas por fungos deste gênero é favorecida por temperaturas próximas de  $26 \pm 2$  °C (BRENNAN et al., 2005; RAMIREZ et al., 2006; XU et al., 2007). Recentemente, foi relatada a presença da micotoxina fumonisina, produzida por espécies do gênero *Fusarium*, em chips de mandioca na África (ONANA et al., 2015). Portanto, será necessário que se faça um estudo sobre a correlação entre a produção desses metabólitos secundários, e a agressividade dos isolados e severidade da doença.

De forma contrastante, para os fungos associados a podridão negra, típicos de regiões tropicais e subtropicais, o crescimento micelial, a esporulação e a severidade da doença nos dois ensaios foram favorecidos por temperaturas mais elevadas (em torno de 35 °C), porém a 40 °C seu crescimento e severidade da doença foram afetados. Comportamento semelhante, quando incubados em 40 °C, também foi observado no crescimento e esporulação de outros patógenos da família Botryosphaeriaceae (SAHA et al., 2008).

A faixa que proporcionou o maior crescimento, esporulação e severidade dos isolados causadores de podridão negra da mandioca (30 a 34 °C) também já foi relatada para isolados associados à podridão negra em outras culturas (ALVES et al., 2008; ABDOLLAHZADEH et al., 2010; MARQUES et al., 2013; NETTO et al., 2014), sendo portanto, a mais indicada para o crescimento e produção massal de esporos desses fitopatógenos para o uso em futuras metodologias de inoculação.

Quanto à agressividade das duas espécies, os isolados de *N. hyalinum* foram mais agressivos que os de *F. solani*, e provocaram as maiores lesões na raiz de mandioca. A agressividade de isolados da família Botryosphaeriaceae e do gênero *Fusarium*, associados à podridão radicular da mandioca (ONYEKA et al., 2005c), assim como na manga (REHMAN et al., 2011) e no cacau (ADU-

ACHEAMPONG et al., 2012) foram comparadas em outros trabalhos, porém apenas no cancro do cacau, os patógenos não diferiram quanto a sua agressividade, enquanto nas demais espécies, os isolados associados a podridão negra foram os mais agressivos. A diferença entre a agressividade dessas espécies pode estar associada à capacidade de produção de enzimas necessárias nos processos de penetração e colonização dos componentes estruturais dos tecidos do hospedeiro (SUNITHA et al., 2013).

O sintoma típico de cada patógeno na raiz de mandioca pode ser um indicativo de diferenças nas taxas de produção das enzimas extracelulares entre as duas espécies. Considerando que a polpa da mandioca, em sua matéria seca contém cerca de 50% a 70% de amido e de 20% a 30% de fibras, que são compostas principalmente de celulose e outros polissacarídeos (RATTANACHOMSRI et al., 2009), a quebra desses compostos pode servir como fonte de energia para os isolados em fase de colonização. A produção de enzimas com a capacidade especial para converter o amido e a celulose em polímeros mais curtos pode ser um fator crucial na infecção da raiz.

O processo de penetração e colonização desses fungos pode estar associado à produção de enzimas extracelulares como celulase (TEIXEIRA et al., 2009) para a quebra da parede celular e das fibras da raiz de mandioca, assim como a amilase e pectinase (LACERDA et al., 2008), devido a grande quantidade de macromoléculas de amilose e amilopectina no grão de amido.

A capacidade dos isolados do gênero *Fusarium* em produzir enzimas extracelulares como celulase, amilase, pectinase e xilanase (KWON et al., 2007; NWAGU; OKOLO, 2011; SUNITHA et al., 2013), assim como fungos da família Botryosphaeriaceae (BARBOSA et al., 2007; ROMÃO et al., 2011; VENKATESAGOWDA et al., 2012) tem sido relatada. Porém, não há estudos sobre as respostas fisiológicas e bioquímicas da infecção da raiz de mandioca por esses patógenos. Portanto, ainda é necessário verificar se a quantidade produzida de cada enzima é significativamente diferente entre os diferentes isolados, e qual a sua correlação com a agressividade e consequente severidade da doença.

Quanto ao comportamento das variedades à podridão radicular, a temperatura influenciou bastante na severidade da podridão negra e seca nas

raízes de mandioca. Dentre as três variedades avaliadas, apenas a BRS Poti Branca apresentou comportamento semelhante para os dois grupos de patógenos, independente da temperatura de incubação após a inoculação. Por outro lado, embora a variedade BRS Kiriris seja um híbrido com boas características agrônômicas e tenha sido lançado como variedade resistente à podridão de raízes em campo (FUKUDA et al., 2002), comportou-se como suscetível para podridão seca e negra em todas temperaturas.

Com bases nesses resultados discrepantes, é preciso investigar a existência de distintos mecanismos de resistência à podridão radicular nos diferentes tecidos da planta de mandioca. Por outro lado, a alta suscetibilidade da variedade BRS Kiriris à podridão negra quando submetida à temperatura de 18 °C foi um fato isolado.

Scott et al. (2010), em estudos sobre a murcha do alface, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, verificaram que o impacto da temperatura sobre a doença é claramente dependente da cultivar. Assim, a alta severidade da doença em determinada variedade pode ser devido ao fato de a temperatura modificar as relações fisiológicas da interação planta-patógeno, e com isso resultar em um efeito direto sobre o hospedeiro (GARRET et al., 2006), associada ao fato de que isolados da família Botryosphaeriaceae são frequentemente descritos como sendo patogênicos oportunistas, atacando as plantas quando elas passam por um período de estresse (MOHALI et al., 2005).

De modo geral, a quantificação do efeito da temperatura na reprodução dos patógenos do sistema radicular pode contribuir para aumentar a eficiência do manejo das doenças. Além disso, o conhecimento sobre aspectos epidemiológicos da podridão radicular, a exemplo das exigências de temperatura e sua implicação na severidade da doença consiste em uma etapa importante para o entendimento da associação patógeno-hospedeiro, bem como para o desenvolvimento de metodologias de inoculação e práticas de manejo para controle da doença.

## CONCLUSÕES

Para isolados de *Fusarium solani*, causadores de podridão seca da mandioca, a temperatura ótima de crescimento foi de 24 a 28 °C, enquanto a temperatura ótima de esporulação foi de 25 °C até 32 °C.

Para os isolados de *Neoscytalidium hyalinum*, agentes causais da podridão negra da mandioca, a faixa ótima de crescimento e esporulação foi de 30 a 34 °C.

O meio BDA possibilitou o maior crescimento micelial e esporulação para ambos os grupos de doenças, sendo o mais indicado para crescimento dos isolados e obtenção de inóculo.

Os isolados de podridão negra foram mais agressivos em comparação com os isolados de podridão seca, provocando maiores lesões nas raízes de mandioca.

Quando mantidas nas condições ótimas de esporulação e crescimento micelial dos patógenos, a variedade BRS Kiriris foi mais suscetível à podridão seca e à podridão negra, juntamente com a variedade Salangó Preta, embora à temperatura de 18°C a BRS Kiriris tenha apresentado as maiores lesões.

## REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, J.; JAVADI, A.; MOHAMMADI, E.G.; ZARE, R.; PHILLIPS, A.J.L. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**, v.25, p.1–10, 2010.

ADU-ACHEAMPONG, R.; ARCHER, S.; LEATHER, S. Resistance to dieback disease caused by *Fusarium* and *Lasiodiplodia* species in cacao (*Theobroma cacao* L.) genotypes. **Experimental Agriculture**, v.48, p.85- 98, 2012.

ALVES, A.; CROUS, P.W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A.J.L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v.28, p.1–13, 2008.

BANDYOPADHYAY, R.; MAWANGI, M.; AIGBE, S.O.; LESLIE, J. *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. **Phytopathology**, v.96, p.673-676, 2006.

BARBOSA, A. M.; SALDANHA, R. L.; GARCIA, J. E.; DEKKER, R. F. H.; VILAS-BOAS, L. A. Genetic Diversity Among *Botryosphaeria* Isolates And Their Correlation With Cell Wall-Lytic Enzyme Production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.259-264, 2007.

BRENNAN, J.M.; EGAN, D.; COOKE, B.M.; DOOHAN, F.M. Effect of temperature on head blight of wheat caused By *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. **Plant Pathology**, v.54, p.156-160, 2005.

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.

FISCHER, I.H.; LOURENÇO, S.A.; MARTINS, M.C.; KIM A TI, H.; AMORIM, L. Selection of resistant plants and fungicides for the control of passion fruit collar rot, caused by *Nectria haematococca*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.250-258, 2005.

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

GARRETT, K. A.; DENDY, S. P.; FRANK, E. E.; ROUSE, M. N.; TRAVERS, S. E. Climate change effects on plant disease: Genomes to ecosystems. **Annual Review Phytopathology**, v.44, p.489-509, 2006.

GUPTA, V.K.; MISRA, A.K.; GAUR, R.K. Growth characteristics of *Fusarium* spp. causing wilt disease in *Psidium guajava* L. in India. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, p.451-462, 2010.

JANDEL SCIENTIFIC. **Table curve**: curve fitting software. Corte Madera, CA: Jandel Scientific, 1991. 280p.

JURADO, M.; MARÍN, P.; MAGAN N.; GONZALEZ-JAÉN, M.T. Relationship between solute and matric potential stress, temperature, growth and *FUM1* gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.2032–2036, 2008.

KWON, H.W.; YOON, J.H.; KIM, S.H.; HONG, S.B.; CHEON, Y.; KO, S.J. Detection of extracellular enzyme activities in various *Fusarium* spp. **Mycobiology**, v.35, p.162-165, 2007.

LACERDA, L.G.; AZEVEDO, J.A.M.; CARVALHO FILHO, M.A.S.; DEMIATE, I.M.; SCHNITZLER, E.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R. Thermal characterization of partially hydrolyzed cassava (*Manihot esculenta*) starch granules. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, p.1209-1216, 2008.

LOUZADA, G.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L.M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, v.9, p.145-149, 2009.

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.

MARQUES, M.W.; LIMA, N.B.; MORAIS JUNIOR M.A.; BARBOSA, M.A.G.; SOUZA, B.O.; MICHEREFF, S.J.; PHILLIPS, A.J.L.; CÂMARA, M.P.S. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v.61, p.181–193, 2013.

MEDINA, A.; MAGAN, N. Comparisons of water activity and temperature impacts on growth of *Fusarium langsethiae* strains from northern Europe on oat-based media. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p.365–369, 2010.

MOHALI, S.; BURGESS, T.I.; WINGFIELD, M.J. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. **Forest Pathology**, v. 35, p.385–396, 2005.

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.

NETTO, M.S.B.; ASSUNÇÃO, I.P.; LIMA, G.S.A.; MARQUES, M.W.; LIMA, W.G.; MONTEIRO, J.H.A.; BALBINO, V.Q.; MICHEREFF, S.J.; PHILLIPS, A.J.L.; CÂMARA, M.P.S. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, v.67, p.127-141, 2014.

NTUI, V.O.; THIRUKKUMARAN, G.; PEJMAN AZADI, P.; KHAN, R.S.; NAKAMURA, I.; MII, M. Stable integration and expression of wasabi defensin gene in “Egusi” melon (*Colocynthis citrullus* L.) confers resistance to *Fusarium* wilt and *Alternaria* leaf spot. **Plant Cell Reports**, v.29, p.943–954, 2010.

NWAGU, T.N.; OKOLO, B.N. Extracellular amylase production of a Thermotolerant *Fusarium* sp. isolated from Eastern Nigerian soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, p.649-658, 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.

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, 2005a.

ONYEKA, T.J.; DIXON, A.G.O.; EKPO, E.J.A. Field evaluation of root rot disease and relationship between disease severity and yield in cassava. **Experimental Agriculture**, v.41, p.357–363, 2005b.

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, 2005c.

OSBORNE, L.E.; STEIN, J.M. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.103–108, 2007.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015. URL <https://www.R-project.org/>.

RAMIREZ, M.L.; CHULZE, S.; MAGAN, N. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.291–296, 2006.

RATTANACHOMSRI, U.; TANAPONGPIPAT, S.; EURWILAICHITR, L.; CHAMPREDA, V. Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.107, p.488-493, 2009.

REHMAN, A.; SALEEM, M.; MEHBOOB, S.; BOKHARI, A.A. Fungi associated with rhizosphere soil in mango decline orchards and their *in vitro* control. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v.23, p.112-117, 2011.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; BIANCHIN, V. Control of plant disease by crop rotation. **Summa Phytopathologica**, v.37, p.85-91, 2011.

ROMÃO, A.S.; SPÓSITO, M.B.; ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Enzymatic differences between the endophyte *Guignardia mangiferae* (Botryosphaeriaceae) and the citrus pathogen *G. citricarpa*. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p. 243-252, 2011.

SAHA, A.; MANDAL, P.; DASGUPTA, S.; SAHA, D. Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, p.407-410, 2008.

SCOTT, J.C.; GORDON, T.R.; SHAW, D.V.; KOIKE, S.T. Effect of temperature on severity of *Fusarium* wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Plant Disease**, v.94, p.13-17, 2010.

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.

SERRA, I.M.R.S.; SILVA, G.S.; NASCIMENTO, F.S.; LIMA, L.K.F. *Scytalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, v.35, p.327-328, 2009.

SHARMA, G.; PANDEY, R. R. Influence of culture media on growth, colony character and sporulation of fungi isolated from decaying vegetable wastes. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v.1, p.157-164, 2010.

SILVA, C.A.D.; MEDEIROS, E.V.; BEZERRA, C.B.; SILVA, W.M.; BARROS, J.A.; SANTOS, U.J. Interference of incorporation of soil organic matter in control of cassava black root, caused by *Scytalidium lignicola*. **Bioscience Journal**, v.29, p.1823-1831, 2013.

SUNITHA, V.H.; DEVI, D.N.; SRINIVAS, C. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.9, p.01-09, 2013.

TEIXEIRA, E.M.; PASQUINI, D.; CURVELO, A.A.S.; CORRADINIC, E.; BELGACEM, M.N.; DUFRESNE, A. Cassava bagasse cellulose nanofibrils reinforced thermoplastic cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v.78, p.422–431, 2009.

THOMPSON, R.S.; AVELING, T.A.S.; PRIETO, R.B. A new semi-selective medium for *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* and *F. verticillioides* in maize seed. **South African Journal of Botany**, v.84, p.94–101, 2013.

UBALUA, A.O.; OTI, E. Antagonistic properties of *Trichoderma viride* on post-harvest cassava root rot pathogens. **African Journal of Biotechnology**, v.6, p.2447-2450, 2007.

VENKATESAGOWDA B, PONUGUPATY E, BARBOSA AM, DEKKER RFH. Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oilbearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.71-80, 2012.

XU, M.X.; MONGER, W.; RITIENI, A.; NICHOLSON, P. Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of *Fusarium* species. **Plant Pathology**, v.56, p.943-956, 2007.

## **CAPÍTULO 2**

### **METODOLOGIAS DE SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA PARA RESISTÊNCIA A PODRIDÃO RADICULAR EM AMBIENTE CONTROLADO**

## METODOLOGIAS DE SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA PARA RESISTÊNCIA A PODRIDÃO RADICULAR EM AMBIENTE CONTROLADO

**Resumo:** A podridão radicular (PR) da mandioca tem sido apontada como um dos principais problemas da cultura no Brasil. Atualmente, a abordagem mais econômica e confiável para o controle da doença é o plantio de variedades resistentes, porém a avaliação em campo é dificultada pela distribuição desuniforme dos patógenos. Este trabalho teve como objetivo identificar métodos de inoculação em diferentes tecidos da planta para avaliar de forma precoce, o nível de resistência de variedades de mandioca à podridão seca (PS) e negra (PN) da mandioca. Foram utilizadas metodologias de inoculação baseadas na imersão de tecidos (maniva e raiz) e infestação de solo em casa de vegetação, bem como inoculação em tecido destacado (haste, folha e raiz), em ambiente controlado. As características avaliadas para mensurar a eficiência das inoculações em imersão de tecidos foram o índice de doença ( $\omega$ ), o peso da parte aérea, peso fresco e volume de raiz. Para as inoculações em tecido destacado foi mensurado o percentual de área lesionada. Os métodos de imersão das raízes e de ferimento em manivas não apresentaram sintomas típicos de PR durante o período de avaliação de dois meses. Por outro lado, a infestação do solo foi um método eficiente, por permitir maior redução do peso e volume de raízes, para os dois grupos de patógenos, além de não diferir do método de imersão da maniva, quanto à redução da parte aérea da planta e índice de doença. Houve forte correlação positiva entre os dados de PN na haste e PS na haste ( $r = 0,94$ ,  $P = 0,001$ ), e PS na casca e polpa da raiz ( $r = 0,73$ ,  $P = 0,01$ ), além da correlação moderada entre PN na haste e na casca da raiz ( $r = 0,56$ ,  $P = 0,05$ ). A resistência dentro de cada tecido é aparentemente independente e deve ser comparada com o comportamento dos genótipos em campo. As variedades BRS Kiriris, BRS Verdinha e BRS Aramaris apresentaram maior suscetibilidade para ambos os grupos de patógenos, enquanto as variedades BRS Formosa, Salangó Preta, BRS Poti Branca e Olho Junto apresentaram maior resistência.

**Palavras chave:** *Manihot esculenta* Crantz, doenças radiculares, *Fusarium solani*, *Neoscytalidium hyalinum*, métodos de inoculação.

## METHODOLOGIES OF CASSAVA GENOTYPES SELECTION FOR RESISTANCE TO ROOT ROT IN CONTROLLED ENVIRONMENT

**Abstract:** Cassava root rot has been identified as one of the major threats of this crop in Brazil. Currently, the most economical and reliable approach to controlling the disease is planting resistant varieties, but field evaluation is hampered by the uneven distribution of pathogens. This study aimed to identify inoculation methods in different plant tissues to evaluate early on, the level of resistance of cassava to dry rot (PS) and black rot (PN) of cassava. Methodologies of inoculation based on tissue immersion were used (stake and root) and also soil infestation in the greenhouse as well as inoculation of detached tissue (stem, leaf and root) in a controlled environment. The characteristics evaluated to determine the efficiency of inoculations in tissue immersion were the disease index ( $\omega$ ), the shoot weight, fresh weight and root volume. For the inoculations in detached tissue the percentage of injured area was determined. Immersion methods of roots and injury in stakes did not show typical symptoms of PR during the evaluation period of two months. On the other hand, the soil infestation was an efficient method for allowing further reduction in roots weight and volume, for both groups of pathogens, in addition to not differ from stake immersion method, in reducing the aerial part of the plant and disease index. There was a strong positive correlation between the PN and PS data on the stem ( $r = 0.94$ ,  $P = 0.001$ ), and PS in the peel and root pulp ( $r = 0.73$ ,  $P = 0.01$ ), and moderate correlation between the PN stem and root peel ( $r = 0.56$ ,  $P = 0.05$ ). Therefore, the resistance within each tissue is apparently independent and should be compared with the behavior of the genotypes in the field. The varieties BRS Kiriris, BRS Verdinha and BRS Aramaris showed increased susceptibility to both groups of pathogens, while the varieties BRS Formosa, Salangó Preta, BRS Poti Branca e Olho Junto showed high resistance.

**Keywords:** *Manihot esculenta* Crantz, root diseases, *Fusarium solani*, *Neoscytalidium hyalinum*.

## INTRODUÇÃO

A podridão radicular é uma das doenças mais destrutivas da mandiocultura, e sua importância econômica vem aumentando nos principais países produtores, por provocar queda progressiva na produtividade, inviabilizando ciclos subsequentes da cultura (NOTARO, 2013).

Uma vez que o principal tecido afetado são as raízes, existem dificuldades de reconhecimento da doença por parte dos produtores, já que as plantas podem se manter assintomáticas dependendo do patógeno, sendo identificada somente no momento da colheita. A planta de mandioca tem um extenso 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).

A podridão radicular está relacionada a diferentes gêneros de fitopatógenos e seus sintomas diferem dependendo da espécie associada. A podridão mole é caracterizada por deterioração completa da raiz e a exsudação de um líquido de forte odor, sendo incitada por espécies de *Phytophthora* spp. e *Pythium* spp.; a podridão seca tem como característica lesões de aspecto seco, normalmente com halo amarronzado, cujas principais espécies associadas são *Fusarium* spp. (ex. *F. solani*, *F. verticillioides* e *F. oxysporum*), *Nectria mauritiicola* (= *Spherostilbe repens*), *Armillaria mellea* e *Sclerotium rolfsii*. Por outro lado, a podridão negra apresenta lesões de cor amarronzadas a pretas, com uma exsudação de alburno líquido e amolecimento do tecido infectado, sendo que os principais patógenos são *Lasioidiplodia* spp., *Neoscytalidium hyalinum* e *Neofusicoccum mangiferae* (= *Nattrassia mangiferae*) (ONYEKA et al., 2005a; MSIKITA et al., 2005; BANDYOPADHYAY et al., 2006; AIGBE; REMISON, 2009; OKECHUKWU et al., 2009; BANITO et al., 2007; SENTHIL et al., 2013a; GUO et al., 2012; MACHADO et al., 2014).

A abordagem mais econômica e viável para controlar a podridão radicular da mandioca é o plantio de variedades resistentes (ONYEKA et al., 2005a). Porém, existe uma complexidade no desenvolvimento de variedades resistentes, pois a podridão radicular é uma doença causada por patógenos de solo e a manifestação dos sintomas pode ser influenciada pelas condições edafoclimáticas. Atualmente, o *screening* de fontes de resistência tem sido feito

com base na avaliação de genótipos em condições de campo com histórico da doença (OKECHUKWU et al., 2009). Porém, esse tipo de avaliação, além de necessitar de diversos ensaios experimentais, pode resultar em uma baixa acurácia da seleção de genótipos resistentes, devido à presença de diferentes espécies causadoras da doença e à distribuição heterogênea dos patógenos no solo (ONYEKA et al., 2005c).

Atualmente, existem milhares de acessos de mandioca mantidos em bancos de germoplasma. Com isso, a avaliação destes genótipos em condição de campo demandaria muito tempo e alto investimento em recursos humanos e financeiros, em função do longo ciclo da cultura e do elevado número de acessos a serem avaliados em diferentes ambientes e anos de cultivo. Por outro lado, o desenvolvimento de metodologias de seleção em condições controladas para *screening* do germoplasma de mandioca visando à identificação precoce de fontes de resistência à podridão radicular seria uma alternativa de alta viabilidade técnica e econômica.

O desenvolvimento de metodologias de avaliação precoce da resistência a patógenos consiste numa importante etapa para a seleção de genótipos superiores em programas de melhoramento (ONYEKA et al., 2005a). Estes métodos, permitem controlar as interferências dos fatores ambientais, trabalhar simultaneamente com um número maior de tratamentos, economizar recursos financeiros, otimizar o tempo, avaliar um grande número de genótipos em pequeno espaço físico, além de possibilitar a re-avaliação dos experimentos.

Metodologias de inoculação *in vitro* para avaliar resistência de genótipos de mandioca à podridão radicular seca, negra e mole, separadamente, já foram descritas (ONYEKA et al., 2005a; SENTHIL et al., 2013b) e utilizadas no *screening* de germoplasma do Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) (ONYEKA et al., 2005b) e da EMBRAPA (OLIVEIRA et al., 2013; VILAS-BOAS et al., 2016), cujos resultados demonstraram a classificação dos genótipos resistentes e suscetíveis com alta acurácia. Entretanto, considerando os relatos da presença de duas ou mais espécies associadas à podridão radicular em uma mesma área de cultivo (MSIKITA et al., 2005; BANDYOPADHYAY et al., 2006; BUA; OKELLO, 2011), torna-se necessário desenvolver estratégias de avaliações conjuntas das doenças, e compreender os mecanismos de resistência dos

diferentes tecidos da planta, visto que existe uma variação no comportamento dos genótipos quando são feitas inoculações na polpa e casca da raiz, utilizando métodos padrão de avaliação (VILAS-BOAS et al., 2016).

As espécies causadoras de podridão radicular com maior frequência nas regiões Norte e Nordeste estão as associadas a podridão seca e negra (dados não publicados). Com base nesses resultados, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos que possibilitem a identificação de fontes de resistência múltipla contra aos principais patógenos associados à podridão radicular da mandioca, levando em consideração a existência de diferentes mecanismos de resistência nos tecidos da planta à podridão radicular. Portanto, este trabalho teve como objetivo identificar métodos de inoculações em diferentes tecidos da planta, que possam avaliar de uma forma conjunta e precoce, o nível de resistência de genótipos de mandioca quanto à podridão seca e negra da mandioca.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção do inóculo**

Em todas as metodologias avaliadas utilizou-se um isolado de *Fusarium solani* (CBPPR0059) causador de podridão seca da mandioca, e um de *Neoscytalidium hyalinum* (CBPPR1011) causador de podridão negra, caracterizados em estudos prévios como os mais agressivos dentro dos dois grupos de patógenos estudados (dados não publicados). Estes fungos são provenientes da Coleção de Patógenos Causadores de Podridão Radicular da Mandioca, do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Os isolados foram crescidos em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Agar), à temperatura de  $25\pm 2$  °C com 12 horas de luz, durante sete dias. As suspensões de esporos utilizadas em algumas metodologias avaliadas foram preparadas à partir da adição de 10 mL de água destilada esterilizada em placas de Petri contendo colônias de cada isolado, e os conídios liberados com auxílio de escova de dente macia. A suspensão obtida foi filtrada em dupla camada de gaze, e a concentração dos esporos determinada pela contagem em microscópio ótico utilizando em hemocitômetro (câmara de

Neubauer), ajustada para  $1 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . Como controle da inoculação (testemunha) foi utilizada água destilada esterilizada.

O inóculo para as etapas envolvendo infestação de solo foi produzido em substrato areia:fubá de milho, na proporção de 3:1 p/p de areia lavada peneirada e fubá de milho. A mistura foi acondicionada em sacos plásticos transparentes e autoclavada duas vezes a  $120^\circ\text{C}$ , por 1 hora. Após 24 horas de resfriamento, foram adicionados 150 mL da suspensão de esporos de cada isolado, separadamente, para cada kg da mistura. Para promover o crescimento uniforme dos propágulos fúngicos, os sacos contendo o substrato areia-fubá infestado foram homogeneizados a cada dois dias e incubados em estufa tipo BOD, a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 20 dias.

### **Metodologias baseadas em imersão de tecidos e infestação de solo**

As variedades Fécula Branca e Olho Junto foram utilizadas nas avaliações com as seguintes metodologias:

#### **a) Imersão de manivas**

Manivas de 10 cm foram imersas por 1 hora em suspensão de esporos ( $1 \times 10^5$  conídios/mL) para cada patógeno e posteriormente plantadas em sacos plásticos de 3kg contendo solo esterilizado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 2 (variedades) x 7 (tratamentos) x 3 repetições (6 plantas cada) x 2 (grupos de patógenos).

Os tratamentos utilizados foram: 1 - Solo não infestado x Maniva sadia (controle); 2 - Solo não infestado x Maniva infestada por patógenos de podridão seca; 3 - Solo não infestado x Maniva infestada por patógenos de podridão negra.

As avaliações foram realizadas aos 60 dias após as inoculações, com base nos seguintes parâmetros:

- (i) Peso fresco da Parte Aérea, em gramas (g);
- (ii) Peso fresco das raízes, em gramas (g);
- (iii) Volume do sistema radicular ( $\text{cm}^3$ ), determinado com base na mensuração do deslocamento da coluna de um volume conhecido de água, em proveta graduada;
- (iv) Colonização interna das manivas, com base na escala de notas normalmente utilizada no programa de melhoramento de mandioca:

- 0 = não colonizado;
- 1 = colonização < 1/3 da área interna da maniva;
- 2 = colonização  $\geq$  1/3 e < 2/3 da área interna da maniva;
- 3 = colonização  $\geq$  2/3 da área interna da maniva.

#### b) Imersão de raízes

Manivas com 12 cm, de cada variedade foram brotadas em leito de areia por 15 dias. As raízes das manivas com 12 cm foram imersas em suspensão de esporos ( $1 \times 10^5$  conídios/mL) de cada patógeno por 1 hora e depois plantadas em sacos plásticos contendo 3 kg de solo esterilizado. O tratamento controle foi representado por plantas com sistema radicular mergulhados apenas em água esterilizada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 2 (variedades) x 2 (tratamentos: inoculado e não inoculado) x 4 repetições (6 plantas cada) x 2 (grupos de patógenos). A avaliação foi realizada a cada cinco dias após a inoculação até completar dois meses.

#### c) Plantio de maniva em solo infestado

A infestação do solo foi feita com mistura de areia e fubá (proporção 3:1) infestada com inóculo de cada patógeno. Manivas de 10 cm das variedades foram plantadas em sacos plásticos contendo 3kg de solo estéril e uma camada de 200g da mistura areia e fubá infestado. Como controle, foram distribuídos 100g da mistura areia e fubá pura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 2 (variedades) x 3 (tratamentos) x 3 repetições (6 plantas cada).

Os tratamentos foram: 1 - Solo não infestado x Maniva sadia (controle); 2 - Solo infestado por patógenos de podridão seca x Maniva sadia; 3 - Solo infestado por patógenos de podridão negra x Maniva sadia. As avaliações foram realizadas conforme a metodologia descrita anteriormente (a- imersão de manivas).

#### **Inoculação em tecido destacado**

Nos experimentos de inoculação com tecidos destacados, foram utilizadas as variedades BRS Verdinha, BRS Dourada, BRS Aramaris, BRS Tapioqueira, BRS Poti Branca, BRS Formosa, Olho Junto, Salangó Preta, além das variedades

BRS Kiriris (resistente em condições de campo) e Fécula Branca (altamente suscetível em condições de campo).

#### a) Inoculação em raízes tuberosas

Os experimentos foram realizados seguindo a metodologia de inoculação de raízes inteiras propostas por Onyeka et al. (2005c) e adaptadas por Oliveira et al. (2013), em que as raízes foram lavadas e submetidas à desinfestação com hipoclorito de sódio (0,5%), em seguida perfuradas em três pontos equidistantes (6 mm de diâmetro) e adicionados 40 µL da suspensão de esporos de cada patógeno (conforme metodologia anteriormente descrita). Como controle (testemunha), adicionou-se 40 µL de água destilada esterilizada no centro das perfurações. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) (12 repetições x 10 variedades x 2 grupos de patógenos).

#### b) Inoculação em folhas

Folhas saudáveis de cada variedade de mandioca foram colhidas e desinfestadas com hipoclorito a 0,5%, e posteriormente lavadas com água destilada esterilizada e colocadas para secar sobre papel filtro esterilizado. A nervura central de cada uma das folhas foi perfurada com uma agulha simples e depositado um disco de micélio de 5 mm de crescimento fúngico em meio BDA (conforme descrição anterior) no centro da lesão. Como controle, foram utilizadas folhas inoculadas com meio BDA sem crescimento fúngico. O pecíolo das folhas foi envolvido com algodão umedecido para evitar a dessecação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com: 2 grupos de patógenos x 10 variedades x 6 repetições (3 lóbulos cada).

#### c) Inoculação em hastes destacadas

Segmento de caules de cada uma das variedades, com dois meses de idade, foram colhidos e cortados em pedaços de 10 cm, desinfestadas com hipoclorito de sódio a 0,5% e lavados em água destilada esterilizada. As extremidades dos segmentos foram cobertas com algodão umedecido para evitar a dessecação. Com uma agulha simples, foram realizados três furos em disposição triangular na superfície da haste e depositado um disco de micélio de 5

mm, de cada patógeno. Como tratamento controle (testemunha), depositou-se um disco do meio BDA sem o crescimento fúngico. O delineamento foi inteiramente casualizado com: 2 grupos de patógenos (podridão seca e negra) x 10 variedades de mandioca x 3 repetições (5 hastes cada).

#### d) Método de ferimento em manivas

Segmentos de 10 cm de caule (manivas) de plantas adultas (aproximadamente 12 meses) foram perfurados (6 mm de diâmetro) entre as duas primeiras gemas e em seguida, depositados discos de meio de cultura com 5 mm de diâmetro contendo as estruturas fúngicas de cada patógeno. Os locais de inoculação foram cobertos com algodão umedecido e envolvidos com filme de PVC, para evitar contaminação externa e garantir a umidade no local de inoculação. Como controle utilizou-se discos de meio BDA sem crescimento fúngico.

As manivas inoculadas e controle foram plantadas em sacos contendo 3kg de solo esterilizado (mistura com proporções iguais de areia lavada, fibra de coco e substrato vermiculita). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 variedades x 2 grupos de patógenos x 4 repetições (6 plantas cada). A avaliação foi realizada a cada cinco dias após a inoculação, até completar dois meses. Os parâmetros avaliados foram: 1) mortalidade dos acessos; 2) incidência e sintomas externos, por meio de escala de notas: 0 - Sem sintoma; 1 - Amarelecimento e/ou murcha das folhas do terço inferior; 2 - Amarelecimento e/ou murcha das folhas do terço inferior e médio; 3 - Amarelecimento e/ou murcha das folhas de toda planta; 4 - Desfolha completa e/ou morte da planta.

Todos os ensaios foram conduzidos em câmaras de crescimento com temperatura controlada em  $26\pm 2$  °C, no escuro e umidade relativa >85%. As raízes tuberosas inoculadas foram mantidas em bandejas plásticas, cobertas de sacos plásticos transparentes para manter a umidade, e suas avaliações foram realizadas 10 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).

As folhas e hastes inoculadas foram mantidas em caixas transparentes, do tipo *gerbox*, com a base recoberta por papel filtro estéril, e o desenvolvimento da lesão foi avaliado sete dias após a inoculação, por meio de registro fotográfico, sendo as imagens analisadas com auxílio do programa ASSESS 2.0 (APS Press®, 2002-2008).

### **Análises estatísticas**

Os dados obtidos a partir de escalas de notas arbitrárias foram convertidos em Índice de Doença ( $\omega$ ), de acordo com Czermainsky (1999). Em seguida, os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial e as médias agrupadas pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). A fim de se verificar as relações entre os diferentes métodos testados, procedeu-se teste de correlação de Pearson ( $p \leq 0,05$ ), e análise de agrupamento hierárquico, com base na distância Euclidiana, com auxílio dos pacotes 'easynova'; 'corrgram' e 'gplots' implementados no programa estatístico R (R Core Team, 2015).

## **RESULTADOS**

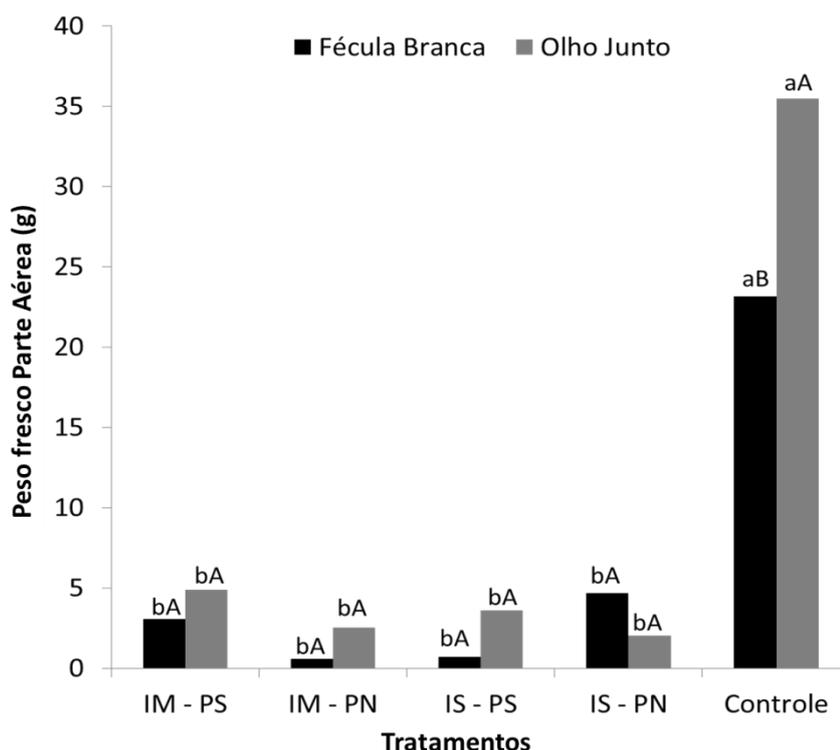
Dentre as oito metodologias testadas, o método de imersão das raízes e de ferimento em manivas não apresentaram sintomas típicos de podridão radicular durante o período de avaliação de dois meses. As demais metodologias apresentaram sintomas inerentes aos patógenos, possibilitando o reisolamento dos mesmos, completando os postulados de Koch.

### **Metodologias de inoculação baseadas em imersão de tecidos e infestação de solo**

Na metodologia de imersão de manivas em suspensão de esporos causadores de podridão seca (IM-PS = imersão de manivas – podridão seca) e podridão negra (IM-PN = imersão de manivas – podridão negra), com exceção do controle (testemunha), todos os tratamentos apresentaram sintomas característicos da doença, como murcha e amarelecimento das folhas, em um período médio de 45 dias após a inoculação (DAI), culminando com a morte da planta aos 60 DAI. O mesmo resultado foi obtido nos tratamentos envolvendo a

infestação de solo com isolados de podridão seca (IS-PS = infestação do solo – podridão seca).

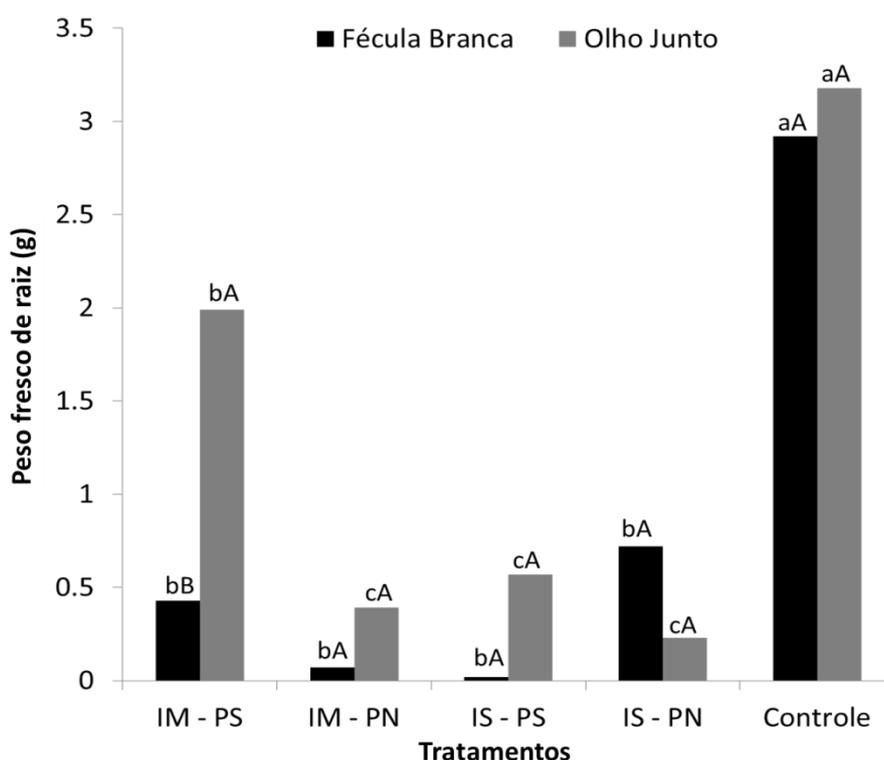
As testemunhas de todos os tratamentos apresentaram maior peso da parte aérea, peso de raiz, volume de raiz e menor índice de doença, diferindo dos diferentes tratamentos inoculados. Por outro lado, a podridão radicular reduziu significativamente o crescimento da parte aérea de ambas as variedades. Não houve diferença na severidade dos sintomas das variedades Fécula Branca e Olho Junto, considerando as diferentes metodologias de inoculação, assim como não houve diferença entre os métodos de imersão e infestação do solo para uma mesma variedade, considerando o peso da parte aérea (Figura 1). Os pesos da parte aérea das variedades Fécula Branca e Olho Junto, respectivamente, para cada tratamento foram IM-PS (3,08 e 4,89 g); IM-PN (0,6 e 2,54 g); IS-PS (0,7 e 3,59 g); IS-PN (4,7 e 2,02 g), enquanto o controle das duas variedades apresentou 23,18 e 35,49 g, respectivamente.



**Figura 1.** Peso fresco (g) da parte aérea das variedades Fécula Branca e Olho Junto quando inoculadas com patógenos de podridão negra e seca. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (comparam variedades dentro do mesmo

tratamento) e minúsculas (tratamentos dentro de variedades) não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

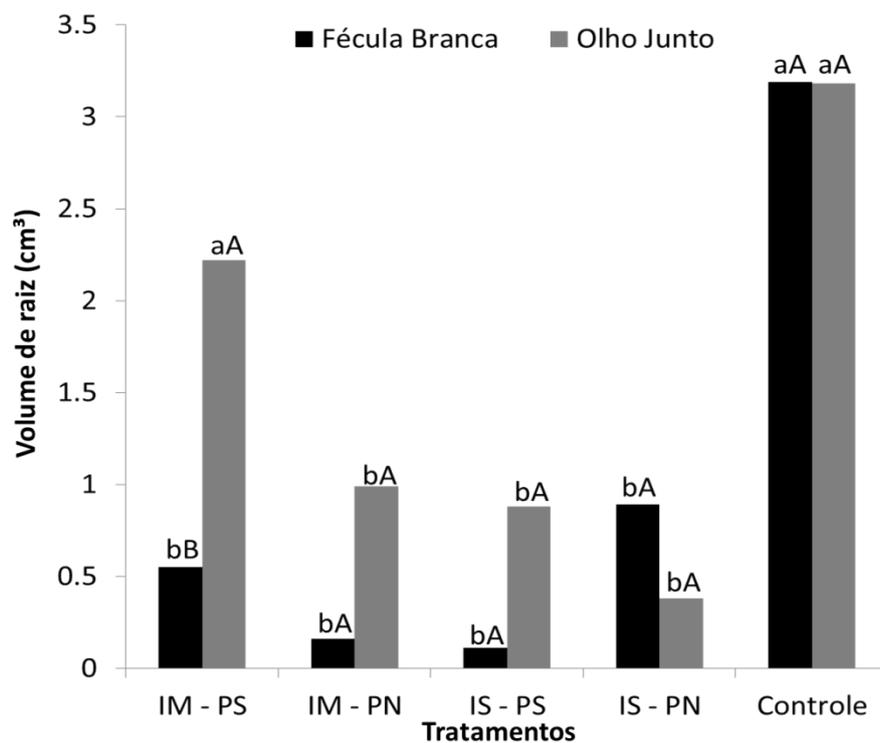
Os diferentes métodos de inoculação baseados em imersão de tecidos e infestação de solo também foram eficientes na redução do peso fresco e no volume de raízes (Figuras 2 e 3). Diferenças varietais foram observadas apenas no método IM-PS, com superioridade da variedade Olho Junto sobre a Fécula Branca quanto ao peso fresco e volume de raízes. Embora sem diferença significativa observou-se maior desenvolvimento do sistema radicular da variedade Olho Junto também no método IS-PS.



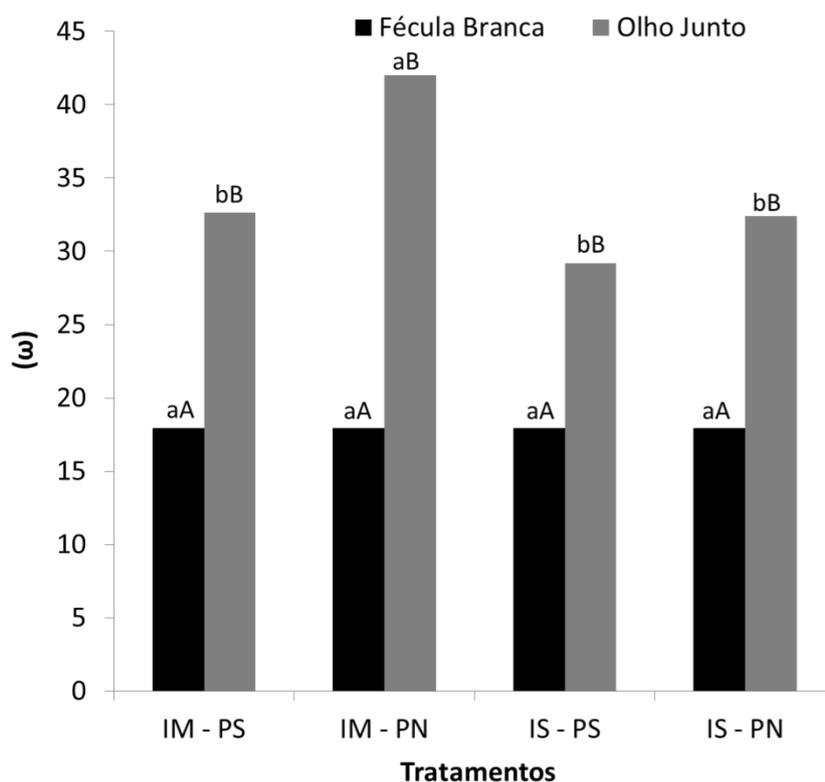
**Figura 2.** Peso fresco de raízes (g) das variedades Fécula Branca e Olho Junto quando inoculadas por patógenos de podridão negra e seca. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (variedades dentro do mesmo tratamento) e as minúsculas (tratamentos dentro de variedades) não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Com relação ao índice de doença, a variedade Fécula Branca apresentou  $\omega = 17,96$  nos quatro métodos de inoculação, enquanto na variedade Olho Junto,

o método IM-PN diferiu dos demais por apresentar maior índice de doença ( $\omega=42,02$ ) (Figura 4).



**Figura 3.** Volume de raízes (cm<sup>3</sup>) das variedades Fécula Branca e Olho Junto quando inoculadas com patógenos de podridão negra e seca. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (variedades dentro do mesmo tratamento) e minúsculas (tratamentos dentro de variedades) não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).



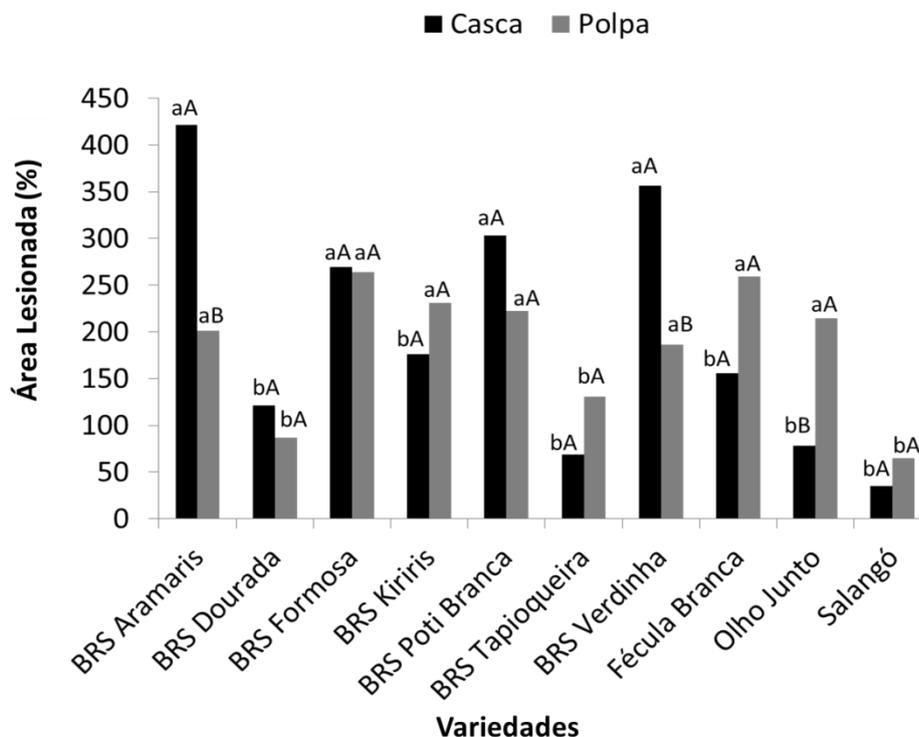
**Figura 4.** Índice de doença ( $\omega$ ) das variedades Fécula Branca e Olho Junto quando inoculadas por patógenos de podridão negra e seca. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (variedades dentro do mesmo tratamento) e as minúsculas (tratamentos dentro de variedades) não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

### **Inoculação em tecido destacado**

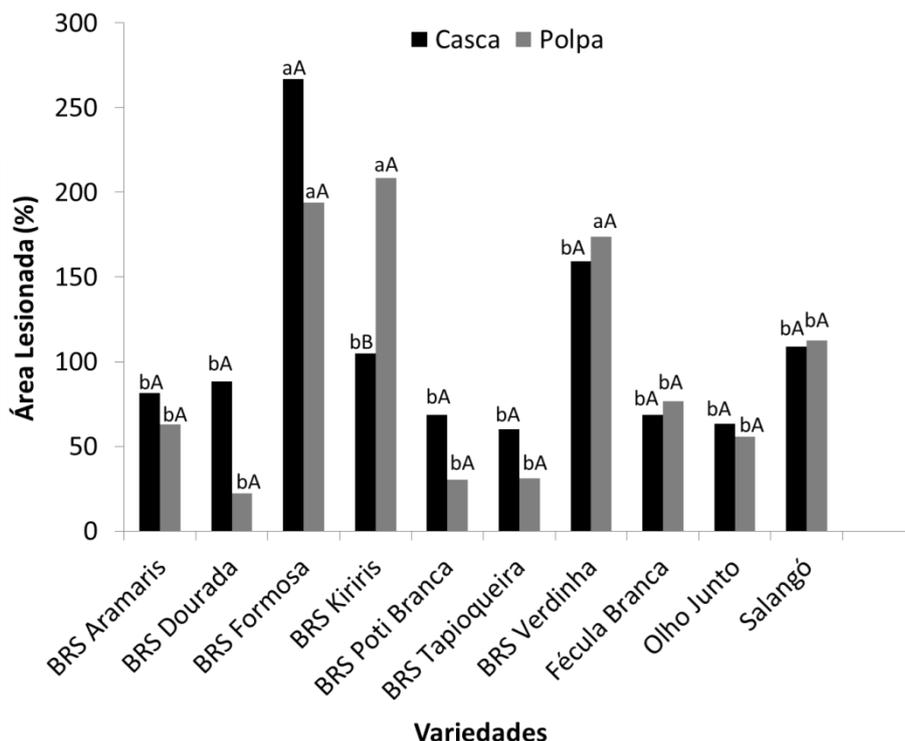
#### Inoculação em raízes tuberosas

De modo geral houve comportamento distinto entre as variedades dentro dos grupos de patógenos e tecidos inoculados. Por exemplo, na avaliação da resistência à podridão negra na casca, a variedade que apresentou a maior lesão foi a BRS Aramaris (421,44mm<sup>2</sup>), enquanto as variedades Salangó Preta, BRS Tapioqueira e Olho Junto, apresentaram as menores áreas lesionadas, com 34,89 mm<sup>2</sup>, 69,05 mm<sup>2</sup> e 78,52 mm<sup>2</sup>, respectivamente. Por outro lado, na avaliação da inoculação na polpa, as variedades BRS Dourada (86,70 mm<sup>2</sup>), Salangó Preta (64,46 mm<sup>2</sup>) e BRS Tapioqueira (130,69 mm<sup>2</sup>), apresentaram as menores lesões (Figura 5). Quando inoculadas com patógenos causadores da podridão seca, a BRS Formosa apresentou maior lesão na casca (266,72 mm<sup>2</sup>), enquanto para a polpa, as maiores áreas lesionadas foram observadas nas variedades BRS Kiriris

(208,44 mm<sup>2</sup>), BRS Formosa (193,88 mm<sup>2</sup>) e BRS Verdinha (173,75 mm<sup>2</sup>) (Figura 6).



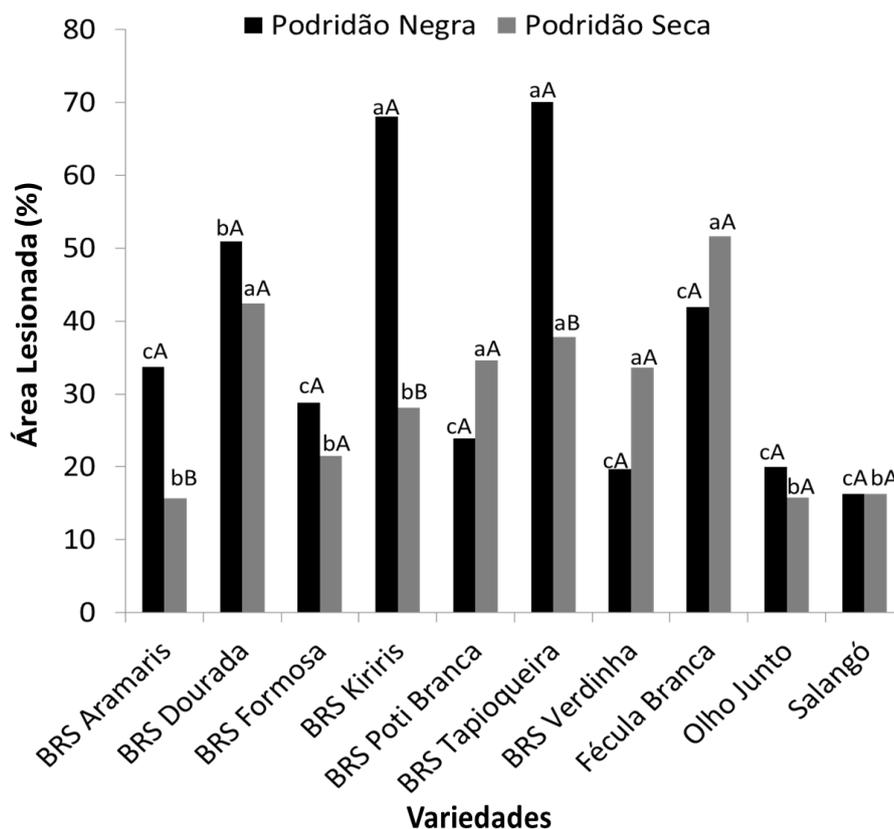
**Figura 5.** Áreas lesionadas por patógenos causadores de podridão negra em diferentes variedades de mandioca, quando inoculadas na casca e polpa das raízes. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (lesão dentro da mesma variedade) e as minúsculas (variedades em cada tecido) não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6.** Áreas lesionadas por patógenos causadores de podridão seca em diferentes variedades de mandioca, quando inoculadas na casca e polpa das raízes. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (lesão dentro da mesma variedade) e as minúsculas (variedades em cada tecido) não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

#### Inoculação em folhas

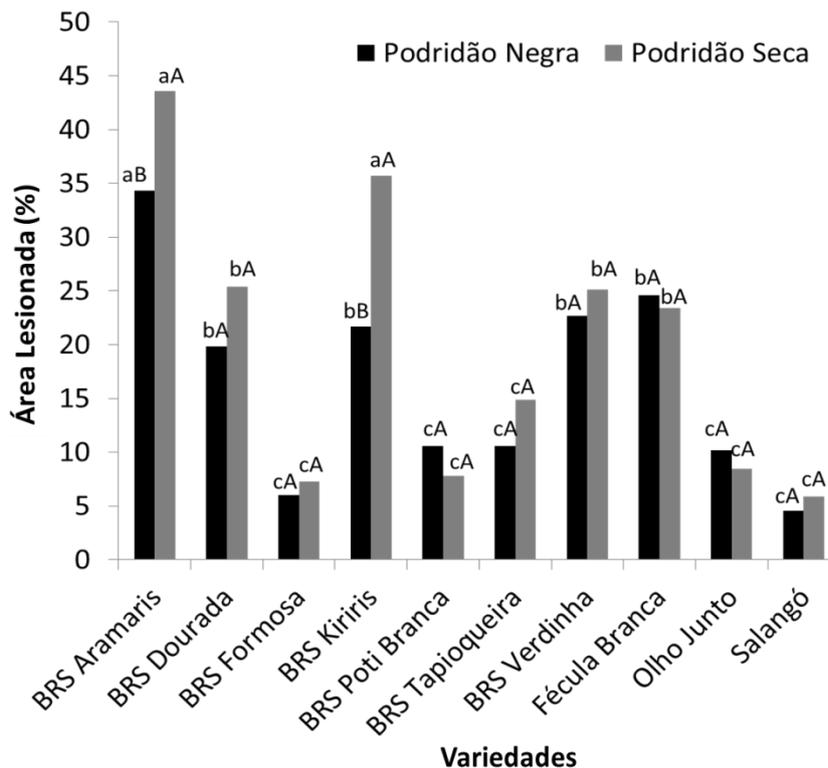
O método de inoculação da podridão radicular em folhas também foi efetivo no aparecimento de sintomas em todas as variedades de mandioca analisadas. Estes sintomas apareceram em forma de lesão na superfície da folha após 48h da inoculação. Como resultado este método também revelou diferenças importantes no percentual da área lesionada nas diferentes variedades, pois a BRS Tapioqueira (70,06%) e BRS Kiriris (68,03%) foram bastante suscetíveis aos patógenos causadores da podridão negra (Figura 8). Por outro lado, as variedades Fécula Branca (51,67%), BRS Dourada (42,38%), BRS Tapioqueira (37,85%), BRS Poti Branca (34,6%) e BRS Verdinha (33,62%) foram as mais suscetíveis na avaliação da podridão seca (Figura 7).



**Figura 7.** Percentual de área lesionada causada por patógenos associados à podridão negra e seca em diferentes variedades de mandioca, após inoculação nas folhas. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (lesão dentro da mesma variedade) e as minúsculas (variedades em cada tecido) não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

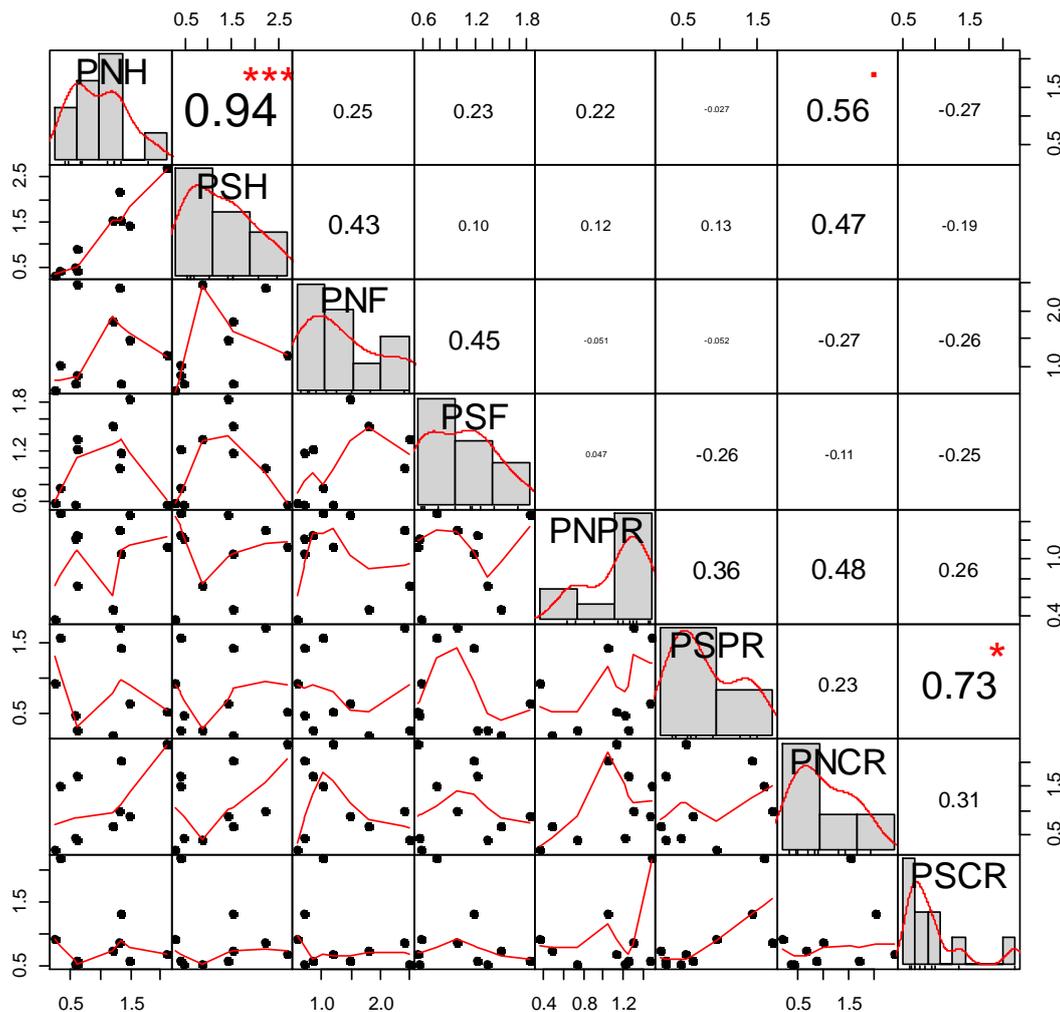
#### Inoculação em hastes destacadas

O método de inoculação em hastes destacadas também foi bastante efetivo no aparecimento de sintomas associados aos patógenos causadores da podridão radicular de mandioca, bem como na diferenciação do comportamento varietal. Com relação aos patógenos de podridão negra, a BRS Aramaris foi a mais suscetível, com um percentual de 34,29% de área lesionada, enquanto para podridão seca, as variedades BRS Aramaris e BRS Kiriris, apresentaram maior percentual de área lesionada (43,59 e 35,71%, respectivamente). As variedades Poti Branca, BRS Tapioqueira, Olho Junto, Formosa e Salangó Preta apresentaram menor área lesionada para os dois grupos de patógenos (Figura 8).



**Figura 8.** Percentual de área lesionada causada por patógenos associados à podridão negra e seca em diferentes variedades de mandioca, após inoculação nas hastes. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (lesão dentro da mesma variedade) e as minúsculas (variedades em cada tecido) não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

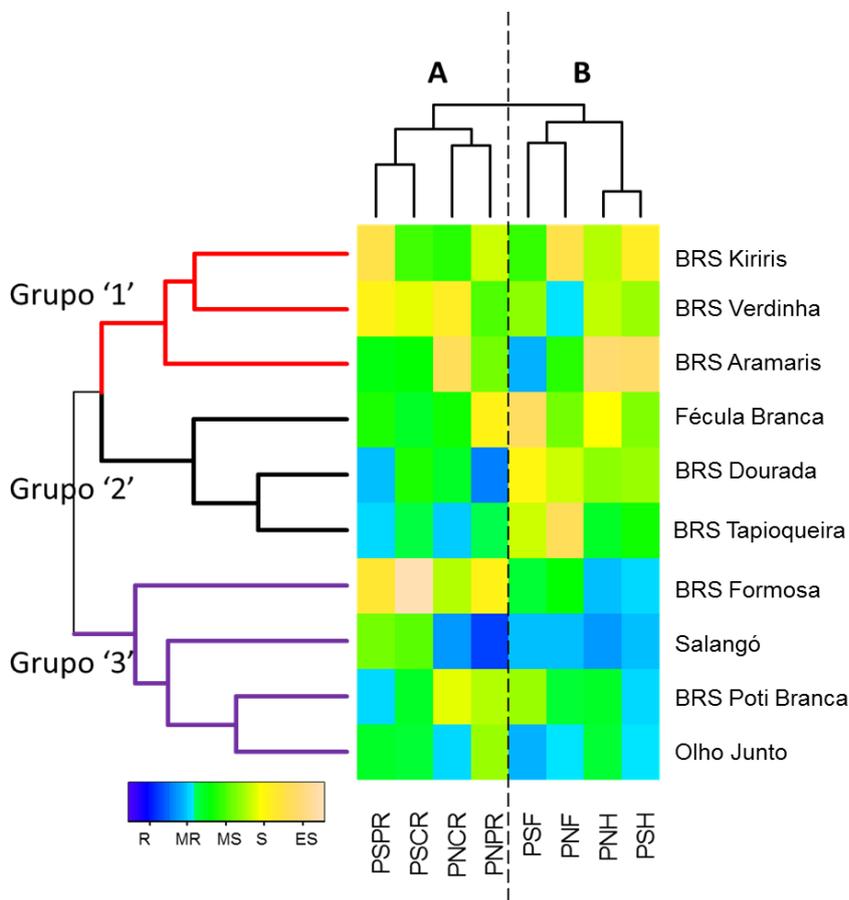
Embora todos os métodos avaliados para *screening* de germoplasma na busca de fontes de resistência tenham apresentado lesões clássicas nas variedades testadas, houve uma grande discrepância no ordenamento das variedades pelos diferentes métodos. Contudo, houve forte correlação positiva entre os dados de podridão negra e seca da haste ( $r = 0,94$ ,  $P = 0,001$ ), e entre a inoculação por podridão seca na casca e polpa da raiz ( $r = 0,73$ ,  $P = 0,01$ ), além da correlação moderada entre podridão negra da haste e casca da raiz ( $r = 0,56$ ,  $P = 0,05$ ) (Figura 9).



**Figura 9.** Correlação de Pearson entre metodologias de inoculação de podridão negra e seca em diferentes variedades de mandioca. Parte superior do correlograma refere-se a significância da correlação entre as variáveis; na diagonal estão as variáveis avaliadas com um histograma (cinza) com a distribuição dos tratamentos; na parte inferior estão os mapas de pontos (Scatterplot) para as correlações entre as variáveis e a linha de tendência da interação. **PNH** = podridão negra da haste; **PSH** = podridão seca da haste; **PNF** = podridão negra em folha; **PSF** = podridão seca em folha; **PNPR** = podridão negra na polpa da raiz; **PSPR** = podridão seca na polpa da raiz; **PNCR** = podridão negra na casca da raiz; **PSCR** = podridão seca na casca da raiz.

O agrupamento da reação das variedades quando inoculadas em diferentes tecidos revelou a formação de três grupos (Figura 10). No geral, as variedades que apresentaram maior suscetibilidade (Grupo '1') foram as BRS

Kiriris, BRS Verdinha e BRS Aramaris. Dentro do Grupo '1', apenas a variedade BRS Kiriris não foi classificada como resistente ou moderadamente resistente em qualquer tecido inoculado, enquanto as variedades BRS Verdinha e BRS Aramaris comportaram-se como moderadamente resistentes à podridão negra de folha e podridão seca de folha, respectivamente.



**Figura 10.** Mapa de calor (*heatmap*) e agrupamento hierárquico das variedades de mandioca quanto ao comportamento quando inoculadas por podridão negra e seca em diferentes tecidos da planta. Grupo A = Inoculação em tecidos do sistema radicular da planta; Grupo B = Inoculação em tecidos da parte aérea da planta. Grupo '1' = Suscetíveis; Grupo '2' = Moderadamente Suscetíveis; Grupo '3' = Moderadamente Resistentes. R = Resistente; MR = Moderadamente Resistente; MS = Moderadamente Suscetível; S= Suscetível e ES = Extremamente Suscetível.

As variedades Fécula Branca, BRS Dourada e BRS Tapioqueira foram alocadas no Grupo '2' (Figura 10), e dentre estas variedades, apenas a Fécula Branca não apresentou resistência em nenhum tecido inoculado. Por outro lado, a

BRS Dourada foi classificada como resistente na polpa da raiz para os dois grupos de patógenos, e a BRS Tapioqueira apresentou resistência moderada à inoculação por patógenos de podridão negra na casca e patógenos de podridão seca na polpa da raiz.

O Grupo '3' foi composto por variedades com maior nível de resistência à podridão radicular (BRS Formosa, Salangó Preta, BRS Poti Branca e Olho Junto). Dentre estas variedades, a Salangó Preta foi a que apresentou o maior percentual de concordância entre as diferentes metodologias, sendo classificada como resistente ou moderadamente resistente em 75% das metodologias avaliadas (6/8).

Em relação aos diferentes métodos de inoculação (Figura 10) foram formados dois grupos distintos, nos quais observou-se maior concordância entre as reações esperadas com as inoculações no sistema radicular (grupo 'A'), assim como para as inoculações realizadas em tecidos da parte aérea (haste e folha, grupo 'B').

## **DISCUSSÃO**

A busca de genótipos resistentes a doenças é um dos principais focos dos programas de melhoramento de mandioca. Portanto, a primeira etapa para seleção de acessos resistentes à podridão radicular seria o estabelecimento de métodos de inoculações eficientes. As metodologias de inoculação baseadas em imersão de tecidos e infestação de solo, resultaram em sintomas típicos da podridão radicular. Porém, ao considerar a possibilidade de avaliação simultânea para diferentes patógenos, a infestação do solo foi mais efetiva na redução do peso e volume de raízes para os dois grupos de patógenos, não diferindo do método de imersão de manivas, quanto à redução da parte aérea e índice de doença. Portanto, o método de infestação do solo pode ser indicado para futuras avaliações da reação de genótipos de mandioca à podridão radicular em casa-de-vegetação. Resultados similares foram obtidos em inoculações com *Fusarium solani* em árvores de jacarandá, nas quais a infestação do solo possibilitou o aparecimento de sintomas típicos de podridão radicular nesta espécie, com elevada redução do peso fresco e volume de raiz e comprimento da parte aérea, quando comparado à inoculação direta no caule (RAJPUT et al., 2008).

Com intuito de reduzir o tempo necessário para o *screening* de acessos de mandioca, e para permitir a avaliação simultânea de um grande número de plantas com otimização de recursos (tempo, espaço, custo), realizou-se a avaliação paralela de seis metodologias para seleção em condições de laboratório, utilizando tecido destacado.

Como resultado, não foi verificada indução de sintomas típicos de podridão radicular quando os tecidos foram submetidos aos métodos de inoculação por 'ferimentos em manivas' e de 'imersão de raízes', durante o período de avaliação de dois meses. Contudo, é possível que a avaliação por um período maior permita a expressão dos sintomas da podridão radicular, porém seria uma metodologia pouco adequada por não permitir uma avaliação precoce. Com isso, o longo período para manifestação dos sintomas da doença reduz a eficácia do método nos quesitos de praticidade e rapidez na avaliação do germoplasma em busca de fontes de resistência.

Embora a inoculação de patógenos da família Botryosphaeriaceae e gênero *Fusarium* em hastes de mudas destacadas tenham sido relatadas em mandioca (ONYEKA et al., 2005c; MSIKITA et al., 2005) e outros patossistemas (BOKHARI et al., 2008; LINALDEDDU et al., 2011), os resultados do plantio das manivas inoculadas por meio de ferimento não resultou em sintomas externos típicos da podridão radicular. Portanto, após os dois meses de avaliação, a metodologia foi adaptada e as hastes que brotaram a partir das manivas infestadas foram destacadas e utilizadas em outro experimento. A metodologia de inoculação por imersão das raízes também é comumente utilizada, com êxito, em testes de resistência a espécies de *Fusarium* em outras culturas (LI et al., 2008; ANITHA; RABEETH, 2009; AGUIAR et al., 2013). Contudo, a sua ineficiência pode estar relacionada com a capacidade de regeneração do sistema radicular da mandioca. A inoculação não impediu o desenvolvimento de novas raízes pelo caule e, conseqüentemente, a recuperação da planta inoculada, mesmo que tenha havido a morte das raízes adventícias presentes no momento da inoculação.

Os demais métodos de inoculação avaliados no presente trabalho foram eficazes na reprodução dos sintomas da podridão radicular, e distinguiram variedades de mandioca quanto à resistência à podridão negra e seca, tanto em

condições de laboratório, como em casa de vegetação. Por conseguinte, podem ser recomendados em trabalhos futuros que tenham por objetivo obter informações sobre o nível de resistência genética em germoplasma de mandioca. Porém, é preciso levar em consideração a presença de dois ou mais patógenos de podridão radicular em condições de campo (MSIKITA et al., 2005; BANDYOPADHYAY et al., 2006; BUA; OKELLO, 2011). Por isso, é necessário a adoção de métodos de inoculação que possibilitem avaliação para ambas as doenças.

Quanto ao desempenho dos métodos de inoculação avaliados, a inoculação em raízes, apesar de ser a metodologia de inoculação atualmente utilizada na busca por fontes de resistência à podridão radicular (ONYEKA et al., 2005a; OLIVEIRA et al., 2013; VILAS-BOAS et al., 2016), é uma metodologia que necessita de uma programação na colheita das raízes (com tempo mínimo de 10 meses de plantio) e uma minuciosa triagem para que não sejam utilizadas raízes com injúrias e com infecções provenientes do campo. Outro agravante é que os sintomas da deterioração fisiológica pós-colheita podem ser confundidos com os sintomas típicos causados pelos patógenos, levando a uma má interpretação dos resultados, conforme observado durante as avaliações destes experimentos. Com base nessas informações, torna-se necessária uma metodologia alternativa e eficiente, que represente o comportamento dos genótipos em campo.

Senthil et al. (2013b), compararam inoculações em hastes, raízes e folhas de mandioca, e observaram correlação positiva (0,88) entre os sintomas na folha e raiz. Correlações negativas para folha e haste (-0,66) e raiz e haste (-0,68), também foram observadas por estes autores. Senthil et al. (2013b), também relataram que a inoculação em folha destacada é um método rápido e confiável, com uma menor variação da resposta das cultivares de mandioca quanto à podridão mole das raízes, causada por *Phytophthora palmivora*, e pode substituir a inoculação em raiz. Resultados similares foram relatados para *Phytophthora tropicalis*, também causador da podridão mole da mandioca com moderada correlação positiva (0,37) entre os sintomas nas folhas e raízes (LOKE et al., 2004). Porém, nenhum dos dois trabalhos apresentou a correlação com os resultados de experimentos em campo.

Quando as folhas de mandioca foram inoculadas com *Fusarium solani* e *Neoscytalidium hyalinum*, foi possível observar a evolução dos sintomas ao longo de todo o período de avaliação, fator que comprova a infecção desses patógenos neste tecido e possibilitou diferenciar as variedades quanto ao percentual de área lesionada. A metodologia de inoculação em folhas tem sido utilizada com sucesso em outros patossistemas com espécies do gênero *Fusarium*, a exemplo da podridão vermelha da raiz da soja, causada por *Fusarium tucumaniae* (FRANCO et al., 2009) e da podridão do melão causada por *Fusarium oxysporum* (NTUI et al., 2010). Porém, a correlação entre os sintomas da podridão radicular da mandioca quando inoculadas nas folhas e hastes foi positiva, mas não significativa. Além disso, não foi observada correlação entre as inoculações em folhas e raízes. Desta forma, ainda será necessário investigar a correlação entre os métodos de inoculação nos diferentes tecidos da planta, para refletir de forma mais acurada a resistência varietal em condições de campo, para a indicação das metodologias mais promissoras para a triagem de genótipos com resistência múltipla.

Independente dos patógenos, os métodos de inoculação foram agrupados separadamente em casca, polpa, haste e folha. A ausência de correlações significativas entre inoculações em tecidos destacados, bem como seu agrupamento em função do tecido (parte aérea ou sistema radicular) levam a crer que os mecanismos de resistência à podridão radicular são diferentes em cada tecido avaliado.

Correlação moderada ( $r = 0,73$ ) entre os sintomas da podridão radicular na casca e polpa da raiz quando inoculadas com *F. solani*, também foi constatada por Vilas-Boas et al. (2016), que sugerem seleção de variedades resistentes com base nos sintomas em ambos tecidos. Essa diferença da resistência entre as variedades de mandioca à podridão radicular pode estar relacionada a seus mecanismos estruturais e bioquímicos, que podem retardar ou bloquear a entrada ou a subsequente atividade dos patógenos em seus tecidos. Essas barreiras são divididas em pré-formadas (fenóis, inibidores protéicos, quitinase, cutícula, tricomas, estômatos, vasos condutores) sendo que a sua expressão independe da presença do patógeno, e pós-formadas (papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça e de abscisão, tiloses, fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese)

quando a expressão só se verifica após o contato com o patógeno (HUCKELHOVEN, 2007).

Loke et al. (2004) atribuíram os diferentes níveis de resistência de 22 genótipos de mandioca quanto à infecção na casca (pré-penetração) e polpa (pós-penetração), aos diferentes níveis de ferro, essencial na síntese de fitoalexinas, substância fungitóxica, e de manganês da planta. Yergeau et al. (2006) também observaram relações significativas entre a incidência de populações de *Fusarium* spp. e os níveis de ferro e manganês em aspargos. Esses compostos podem estimular ou inibir a produção de certas enzimas pectinolíticas em microrganismos (KHAN; BARATE, 2016) e influenciar diretamente na severidade das doenças radiculares (MUCHA et al., 2012). Desta forma, é necessário investigar quais mecanismos de ação podem estar relacionados a fatores estruturais e bioquímicos, pré ou pós-formados, na infecção da mandioca por patógenos de podridão radicular, como forma de entendimento dos níveis de resistência dos genótipos.

Em relação ao comportamento das 10 variedades de mandioca, não foi possível observar nenhuma relação entre o fenótipo atribuída às variedades BRS Kiriris e BRS Aramaris, ambas consideradas resistentes em condições de campo à podridão radicular (FUKUDA et al., 2002), com as inoculações em tecidos destacados. Além disso, essas variedades não apresentaram uniformidade no ranqueamento, quando avaliadas nos diferentes métodos de inoculação.

A BRS Aramaris apresentou resistência moderada aos patógenos causadores de podridão seca apenas na inoculação em folha. Oliveira et al. (2013) avaliaram o comportamento de sete variedades de mandioca quando inoculadas por *Fusarium* spp., e também classificaram a BRS Aramaris e a Fécula Branca como suscetíveis à podridão radicular, e a variedade BRS Kiriris como moderadamente resistente. Estes resultados evidenciam que a resistência à podridão radicular pode ter um padrão quantitativo, controlada por genes de pequenos efeitos, cuja herança é caracterizada pela ausência de resistência completa, além da alta influência do ambiente sobre a incidência e severidade da doença (VILAS-BOAS et al., 2016). Por outro lado, a variedade Fécula Branca, que em experimento anteriores foi classificada como altamente suscetível à

podridão radicular em condições de campo (dados não publicados), também foi classificada como suscetível em todos os tecidos avaliados.

A prioridade na seleção de parentais deve ser a identificação de acessos com desempenho genotípico favorável contra os diversos patógenos causadores da podridão radicular. Porém, além de pouco estudada, a base genética da resistência a múltiplos patógenos é complexa, considerando as interações ambientais, a presença de diferentes estirpes patogênicas, bem como a expressão diferenciada dos sintomas em diferentes partes da planta (dados não publicados), a exemplo do que foi observado na casca, polpa das raízes, hastes e folhas da mandioca.

## CONCLUSÕES

A metodologia de infestação do solo pode ser indicada para avaliações da reação de genótipos de mandioca à podridão radicular em casa-de-vegetação.

Os métodos de ferimento em manivas e de imersão das raízes não apresentaram sintomas típicos de podridão radicular, não sendo indicados para testes de resistência em ambiente controlado.

A baixa correlação entre os métodos de inoculação em tecidos destacados é um indício de que a resistência em cada tecido da mandioca é independente. Será necessário investigar a correlação entre os métodos de inoculação nos diferentes tecidos da planta e os dados em condições de campo, para refletir de forma mais acurada a resistência varietal.

As variedades BRS Kiriris, BRS Verdinha e BRS Aramaris apresentaram uma maior suscetibilidade a ambas as doenças, enquanto as variedades BRS Formosa, Salangó Preta, BRS Poti Branca e Olho Junto apresentaram um maior nível de resistência.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, F.M.; MICHEREFF, S.J.; BOITEUX, L.S.; REIS, A. Search for sources of resistance to *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*) in okra germplasm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.13, p.33-40, 2013.

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, 2009.

ANITHA, A.; RABEETH, M. Control of *Fusarium* wilt of tomato by bioformulation of *Streptomyces griseus* in green house condition. **African Journal of Basic & Applied Sciences**. v.1, p. 9-14, 2009.

BANDYOPADHYAY, R.; MAWANGI, M.; AIGBE, S.O.; LESLIE, J. *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. **Phytopathology**, v.96, p. 673-676, 2006.

BANITO, A.; VERDIER, V.; KPÉMOUA, K.E.; WYDRA, K. Assessment of major cassava diseases in Togo in relation to agronomic and environmental characteristics in a systems approach. **African Journal of Agricultural Research**, v.2, p.418-428, 2007.

BOKHARI, A.A.; SAHI, S.T.; KHAN, A.M.; AHMAD, R.; DIN, I.U. In vivo studies on the biological and chemical control of guava decline caused by different soilborne pathogens. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v.45, p.54-56, 2008.

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.

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.

FRANCO, H.B.J.; CENTURION, M.P.P.C.; BARBOSA, J.C. Inoculation methods study to evaluation soybean cultivars to *Fusarium tucumaniae*. **Summa Phytopathologica**, v.35, p.32-38, 2009.

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

GUO, H.; LI, C.P.; SHI, T.; FAN, C.J.; HUANG, G.X. First report of *Phytophthora palmivora* causing root rot of cassava in China. **Plant Disease**, v.96, p.1072, 2012.

HUCKELHOVEN, R. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. **Annual Review of Phytopathology**, v.45, p.101–127, 2007.

KHAN, I.G.; BARATE, D.L. Effect of various parameters on activity of pectinase enzyme. **International Journal of Advanced Research**, v.4, p.853-862, 2016.

LI, X. M.; LIU, C. J.; CHAKRABORTY, S.; MANNERS, J. M.; KAZAN, K. A simple method for the assessment of crown rot disease severity in wheat seedlings inoculated with *Fusarium pseudograminearum*. **Journal of Phytopathology**, v. 156, p.751-754, 2008.

LINALDEDDU, B.T.; SCANU, B.; MADDAU, L.; FRANCESCHINI, A. *Diplodia africana* causing dieback on *Juniperus phoenicea*: a new host and first report in the northern hemisphere. **Phytopathologia Mediterranea**, v.50, p.473–477, 2011.

LOKE, J.; ÁLVAREZ, E.; CORREDOR, J.A.; FOLGUERAS, M.; JARAMILLO G.; CEBALLOS, H. Preliminary evidence of correlation between foliar and root resistance to root rot caused by *Phytophthora tropicalis* in cassava. Sixth International Scientific Meeting of the Sixth International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, 8-14, SB 211, C3 158, 2004.

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.

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.

MUCHA, J.; GUZICKA, M.; ŁAKOMY, P.; ZADWORNÝ, M. Iron and reactive oxygen responses in *Pinus sylvestris* root cortical cells infected with different species of *Heterobasidion annosum* sensu lato. **Planta**, v.236, p.975–988, 2012.

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.29, p.1832-1839, 2013.

NTUI, V.O.; THIRUKKUMARAN, G.; AZADI, P.; KHAN, R.S.; NAKAMURA, I.; MII, M. Stable integration and expression of wasabi defensin gene in “Egusi” melon (*Colocynthis citrullus* L.) confers resistance to *Fusarium* wilt and *Alternaria* leaf spot. **Plant Cell Reports**, v.29, p.943–954, 2010.

OKECHUKWU, R.U.; DIXON, A.G.O.; AKORODA, M.O.; MWANGI, M.; BANDYOPADHYAY, R. Root rot resistance in new cassava varieties introduced to farmers in Nigeria. **Experimental Agriculture**, v.45, p.15–24, 2009.

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, 2005a.

ONYEKA, T.J.; DIXON, A.G.O.; EKPO, E.J.A. Field evaluation of root rot disease and relationship between disease severity and yield in cassava. **Experimental Agriculture**, v.41, p.357–363, 2005b.

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, 2005c.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015. URL <https://www.R-project.org/>.

RAJPUT, N.A.; PATHAN, M.A.; JISKANI, M.M.; RAJPUT, A.Q.; ARAIN, R.R. Pathogenicity and host range of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., causing dieback of Sisham (*Dalbergia sissoo* Roxb.). **Pakistan Journal of Botany**, v.40, p.2631-2639, 2008.

SENTHIL, M.; NATH, V.S.; MISRA, R.S; JEEVA, M.L. Incidence and identification of cassava tuber rot caused by *Phytophthora palmivora*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 46, p.741-746, 2013a.

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, 2013b.

VILAS-BOAS, S.A.; HOHENFELD, C.S.; OLIVEIRA, S.A.S.; SILVA, S.V.; DE OLIVEIRA, E.J. Sources of resistance to cassava root rot caused by *Fusarium* spp.: a genotypic approach. **Euphytica**, v. 209, p. 237-251, 2016.

YERGEAU, E.; SOMMERVILLE, D.W.; MAHEUX, E.; VUJANOVIC, V.; HAMEL, C.; WHALEN, J.K.; ST-ARNAUD, M. Relationships between *Fusarium* population structure, soil nutrient status and disease incidence in fieldgrown asparagus. **FEMS Microbiology Ecology**, v.58, p.394-403, 2006.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A podridão radicular é uma doença limitante da cultura da mandioca e já foi diagnosticada em todos os estados brasileiros. O uso de variedades resistentes é a medida de controle mais eficiente para a doença, e por isso os programas de melhoramento têm focado em desenvolvimento de pesquisas para identificação de genótipos com resistência múltipla aos patógenos associados à podridão radicular.

Nesse trabalho observou-se que os isolados de podridão radicular diferem quanto à sua agressividade, que o meio de cultura e a temperatura de incubação influenciam o crescimento e esporulação dos isolados, e a severidade da doença provocada pelos diferentes grupos de patógenos associados à podridão radicular foi afetada pela temperatura de incubação do tecido inoculado.

O método de seleção baseado no plantio de hastes em solo infestado artificialmente proporcionou o surgimento de sintomas análogos à situação de campo, envolvendo a morte prematura de manivas, redução do crescimento da parte aérea (peso fresco), do volume e peso fresco do sistema radicular. O comportamento das variedades quando inoculadas em diferentes tecidos destacados evidenciou a existência de possíveis mecanismos de resistência tecido-específicos, devido à baixa frequência de concordância entre as classificações dos acessos para cada um dos tecidos testados.

Dessa forma, as metodologias propostas, em conjunto com estudos sobre a interação planta-patógeno, e o entendimento dos possíveis genes associados a resistência à podridão radicular, servirão de base para o melhoramento genético da mandioca e desenvolvimento de variedades resistentes.