



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

DAIANE SILVA RODRIGUES

**DIVERSIDADE FÚNGICA COM ÊNFASE NA FAMÍLIA BOTRYOSPHAERIACEAE
ASSOCIADA ÀS MANIVAS-SEMENTE DE MANDIOCA**

**Santarém, PA
2024**

DAIANE SILVA RODRIGUES

**DIVERSIDADE FÚNGICA COM ÊNFASE NA FAMÍLIA BOTRYOSPHAERIACEAE
ASSOCIADA ÀS MANIVAS-SEMENTE DE MANDIOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biociências da Universidade Federal do Oeste do
Pará, como parte dos requisitos para obtenção do título
de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ivan Aguilar Vildoso

**Santarém, PA
2024**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

R696d Rodrigues, Daiane Silva
 Diversidade fúngica com ênfase na família Botryosphaeriaceae associadas às manivas-semente de mandioca./ Daiane Silva Rodrigues -Santarém, 2024.
 58 p. : il.
 Inclui bibliografias.

Orientador: Carlos Ivan Aguilar-Vildoso.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biociências.

1. Fitopatologia. 2. Etiologia. 3. Filogenia. 4. Ascomicetos. I. Aguilar-Vildoso, Carlos Ivan, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 571.92

DAIANE SILVA RODRIGUES

**DIVERSIDADE FÚNGICA COM ÊNFASE NA FAMÍLIA BOTRYOSPHAERIACEAE
ASSOCIADAS ÀS MANIVAS-SEMENTES DE MANDIOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biociências da Universidade Federal do Oeste do
Pará, como parte dos requisitos para obtenção do título
de mestre.

Conceito: Aprovado

Data da aprovação: 19/03/2024

 Documento assinado digitalmente
CARLOS IVAN AGUILAR VILDOSO
Data: 19/03/2024 16:40:28-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Carlos Ivan Aguilar Vildoso
Orientador – Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

 Documento assinado digitalmente
GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO
Data: 20/03/2024 08:59:44-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Gustavo da Silva Claudiano
Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

 Documento assinado digitalmente
MARCOS PRADO LIMA
Data: 20/03/2024 14:26:12-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Marcos Prado Lima
Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

 Documento assinado digitalmente
ALESSANDRA KEIKO NAKASONE
Data: 20/03/2024 13:52:54-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Alessandra Keiko Nakasone
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Aos meus pais, que sempre deixaram claro do valor e da importância dos estudos na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo presente que é a vida, por toda capacidade vinda de suas mãos, Ele que é o meu amparo e meu refúgio em todos os momentos de angústia.

Aos meus familiares, por todo apoio, por acreditar em mim, pela compreensão nos momentos de ausência, e principalmente aos meus pais, Orlando e Luisa, que nunca mediram esforços no incentivo aos meus estudos.

Ao meu amor, Jefferson Rossy, meu grande parceiro de vida, que esteve presente em todas as etapas deste curso, com incentivo, carinho, afeto e ajuda durante esta pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ivan Aguilar Vildoso, por todo ensinamento, orientação, por acreditar em minha capacidade, e não medir esforços em ajudar com as dúvidas, mesmo na dificuldade de uma orientação a distância.

Ao meu grupo de pesquisa do Laboratório Genética da Interação, em especial Claudiane, Leandro e Cleber, por toda parceria e ajuda com os experimentos e atividades realizadas durante esta pesquisa.

Aos colegas da UFOPA, professores, alunos, secretarias municipais e parceiros na ajuda para a coleta do material de estudo.

Ao projeto Maniva Tapajós, na pessoa da Prof. Eliandra de Freitas Sá, por todo apoio da equipe e ensinamentos repassados.

À Cargill, pelo apoio financeiro ao projeto, na aquisição de reagentes e equipamentos necessários para o desenvolvimento da pesquisa.

À Universidade Federal do Oeste do Pará, por toda minha trajetória acadêmica, desde a graduação a atualmente ao Programa de Pós-Graduação em Biociências pela oportunidade de acesso ao curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa durante a pesquisa.

RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é considerada de grande importância para a segurança alimentar, com raiz tuberosa, rica em amido e alto valor calórico. Dentre as doenças, as podridões radiculares e das manivas são mais frequentes causando perdas diretas na produção e por disseminação dos patógenos, respectivamente. Estudos revelaram a ocorrência de uma diversidade de fungos fitopatogênicos, destacando-se os da família Botryosphaeriaceae, associados à podridão de manivas. Esse trabalho teve como objetivo identificar a diversidade fúngica com ênfase a família Botryosphaeriaceae, associadas as manivas-sementes de mandioca, após desinfecção e indução de apodrecimento. Foram realizados isolamentos de fungos por diluição seriada, das manivas apodrecidas dos municípios de Alenquer, Belterra, Curuá, Faro, Itaituba, Juruti, Mojuí dos Campos, Prainha e Santarém, seguido da extração de DNA, por meio do kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega). Para o estudo da diversidade foi realizada a identificação pela amplificação da região gênica do espaçador transcrito interno (ITS) com os primers universais ITS1 e ITS4 e posterior envio para sequenciamento, através do método Sanger. Os eletroferogramas foram trimados e editados, para os contigs serem usados para a identificação. A identificação molecular foi iniciada pelo uso do Blast e posterior comparação com sequências padrões das espécies do gênero/ seção/ complexo associado. Foi realizada análise filogenética de espécies da família Botryosphaeriaceae das regiões gênicas do fator de alongação da tradução (TEF 1 – α), RNA polimerase subunidade II (rpb2) e espaçador transcrito interno (ITS). Onze gêneros foram identificados na diversidade fúngica em manivas-sementes (*Lasiodiplodia*, *Neoscytalidium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Hyphopichia*, *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Diaporthe* e *Phomopsis*). O gênero *Lasiodiplodia* foi o mais frequente, sendo detectadas no mínimo as espécies *Lasiodiplodia theobromae*, *L. brasiliensis*, *L. euphorbiaceicola* e *L. pseudotheobromae*, além da espécie *Neoscytalidium dimiditum*, distribuídos diferencialmente entre as diferentes comunidades e municípios da região oeste do Pará, sendo que todos os isolados de *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium* foram capazes de causar lesões em raízes de macaxeira e foram reisolados confirmando a sua patogenicidade. Estes dados demonstram a importância do material de propagação sadio, devido que os patógenos podem ser disseminados mesmo assintomáticos e com tratamentos de desinfecção superficial.

Palavras-chave: Fitopatologia. Etiologia. Filogenia. Ascomycetos.

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is considered of great importance in food security, with a tuberous root, rich in starch, and high caloric value. Root and stem rot are diseases that compromise the crop, causing major losses, due to direct losses in production and the spread of pathogens, respectively. Studies have revealed the occurrence of a diversity of phytopathogenic fungi, standing out those of the Botryosphaeriaceae family, associated with stem rot. This work aimed to identify fungal diversity with emphasis on the Botryosphaeriaceae family, associated with cassava seed stems, after disinfection and induction of rot. Fungal isolations were carried out by serial dilution, of the rotten cuttings from Alenquer, Belterra, Curuá, Faro, Itaituba, Juruti, Mojuí dos Campos, Prainha and Santarém municipalities, followed by DNA extraction using the Wizard® Genomic DNA Purification kit. (Promega). To study diversity, identification was carried out by amplification of the ITS region with the universal primers ITS1 and ITS4 and subsequent sending for sequencing, using the Sanger method. The electropherograms were trimmed and edited so that the contigs could be used for identification. Molecular identification was initiated by using Blast and subsequent comparison with standard sequences of the species of the associated genus/section/complex. Phylogenetic analysis of species from the Botryosphaeriaceae family was carried out in the gene regions of the translation elongation factor (TEF 1 – α), RNA polymerase subunit II (rpb2) and internal transcribed spacer (ITS). Eleven genera were identified in the fungal diversity in cassava cuttings (*Lasiodiplodia*, *Neoscytalidium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Hyphopichia*, *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Diaporthe* and *Phomopsis*). The genus *Lasiodiplodia* was the most frequent, with at least the species *Lasiodiplodia theobromae*, *L. brasiliensis*, *L. euphorbiaceicola* and *L. pseudotheobromae* detected, in addition to the species *Neoscytalidium dimiditum*, distributed differentially among the different communities and municipalities in the western region of Pará, and all isolates of *Lasiodiplodia* and *Neoscytalidium* were capable of causing lesions in cassava roots and were reisolated, confirming its pathogenicity. These data demonstrate the importance of healthy propagation material, as pathogens can be disseminated even when asymptomatic and with superficial disinfection treatments.

Keywords: Phytopathology. Etiology. Phylogeny. Ascomycetes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Localização dos locais de coleta de manivas-semente de mandioca.	24
Figura 2: Inoculação de raízes, com os três pontos de perfuração, proximal e distal com os discos do patogênico e o ponto central como controle, apenas perfurado e recolocado com a casca.....	28
Figura 3: Manivas apodrecidas. (A) Alenquer. (B1, B2) Belterra. (C1, C2) Curuá. (D1, D2) Faro. (E) Itaituba. (F) Juruti. (G1, G2, G3) Mojuí dos Campos. (H) Prainha. (I1, I2, I3, I4, I5) Santarém.	29
Figura 4: Variação da cor das colônias dos fungos isolados de manivas de mandioca. (A) Cinza. (B) Preto. (C, D, E) Branco. (F) Creme. (G) Amarelo. (H, I, J) Verde.	30
Figura 5: Aspecto cultural (A) e microscópico (B) do isolado LGI113-23, indicativo do gênero <i>Fusarium</i>	32
Figura 6: Estruturas culturais e microscópicas do isolado de <i>Lasiodiplodia</i> . (A) Coloração branco-acinzentado. (B) Coloração cinza a preto. (C) Hifas em meio BDA. (D) Estrutura da podridão na maniva. (E, F, G) Esporos observados nos pontos de podridão.	33
Figura 7: Estrutura cultural e microscópica do isolado LGI187-23 de <i>Scytalidium/Neoscytalidium</i>	34
Figura 8: Árvore filogenética dos grupos de gêneros gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança da região gênica ITS.	35
Figura 9: Mapa de distribuição geográfica dos gêneros associados a manivas-sementes, na região Oeste do Pará.	37
Figura 10: Árvore filogenética de <i>Lasiodiplodia</i> , gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança da região gênica ITS, bootstrap 500. Árvore enraizada com <i>Lasiodiplodia crassispora</i> e <i>Lasiodiplodia pyriformis</i> . Os isolados deste estudo estão identificados como LGI.	40
Figura 11: Árvore filogenética de <i>Lasiodiplodia</i> , gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança da região gênica TEF 1 – α , bootstrap 500. Árvore enraizada com <i>Lasiodiplodia gonubiensis</i> e <i>Lasiodiplodia rubropurpurea</i> . Isolados identificados como LGI.	41
Figura 12: Árvore filogenética de <i>Lasiodiplodia</i> , gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança da região gênica rpb2, bootstrap 500. Árvore enraizada com <i>Lasiodiplodia crassispora</i> e <i>Lasiodiplodia pyriformis</i> . Isolados identificados como LGI.	42

Figura 13: Árvore filogenética de <i>Lasiodiplodia</i> , gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança das regiões combinadas ITS e TEF 1 – α , bootstrap 500. Árvore enraizada com <i>Lasiodiplodia gonubiensis</i> e <i>Lasiodiplodia rubropurpurea</i>	43
Figura 14: Árvore filogenética de <i>Neoscytalidium</i> , gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança da região gênica ITS, bootstrap 500. Árvore enraizada com <i>Botryosphaeria dothidea</i> e <i>Cophinforma atrovirens</i>	44
Figura 15: Teste de patogenicidade em raízes. (A) Isolados de <i>Lasiodiplodia</i> sp. com 2 a 5 dias de inoculação. (B) Isolados de <i>Neoscytalidium</i> com 2 e 3 dias de inoculação.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 <i>Manihot esculenta</i> Crantz.....	15
2.2 Podridões em manivas-semente de mandioca	19
2.3 Família Botryosphaeriaceae.....	19
2.3.1 <i>Lasiodiplodia</i>	21
2.3.2 <i>Neoscytalidium</i>	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Coleta das amostras	24
3.2 Indução da podridão nas manivas.....	25
3.3 Isolamento.....	25
3.4 Conservação	25
3.5 Aspectos morfológicos	26
3.6 Extração de DNA	26
3.7 PCR e sequenciamento	26
3.8 Análise filogenética	27
3.9 Teste de patogenicidade.....	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Indução da podridão e desinfecção nas manivas	29
4.2 Isolamento dos fungos	30
4.3 Identificação Molecular.....	34
4.3.1 Diversidade fúngica.....	34
4.3.2 Filogenia de espécies de <i>Lasiodiplodia</i> e <i>Neoscytalidium</i>	38
4.4 Teste de patogenidade	45
5. DISCUSSÃO	46
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A mandioca pertence à família das euforbiáceas com raízes tuberosas, rica em amido, o que confere alto valor energético. É separada conforme a quantidade de ácido cianídrico, em mandioca-brava, devendo ser usada para fins industriais, ou mandioca-mansa (aipim ou macaxeira) utilizada para consumo humano, cozida ou frita (MATTOS, 2006). É considerada uma cultura de grande importância na segurança alimentar, com fornecimento de alimento e renda para mais de 800 milhões de pessoas no mundo (MAXMEN, 2019). Está entre uma das principais culturas agrícolas, no Brasil, com importância social e econômica, seu cultivo disperso em todos os biomas do país (CARVALHO et al., 2022).

Na região Amazônica esta cultura possui papel socioeconômico fundamental na agricultura familiar, com a região Norte sendo a principal produtora de mandioca no Brasil, com produção de 6,4 milhões de toneladas, no último ano (IBGE 2024), o que a torna de grande relevância com pesquisas em melhoramento vegetal a fim de obter plantas saudáveis, livres de doenças e consequentemente maior produtividade, estabilidade e benefícios socioeconômicos para a região.

A propagação da mandioca é normalmente de forma assexuada ou vegetativa, embora tenha reprodução sexuada por sementes, com a presença de inflorescências masculinas e femininas em uma mesma planta (monóica), com protoginia acentuada, favorecendo a polinização cruzada (alógama), o que leva a aumentar a variabilidade genética podendo ser explorado em programas de melhoramento (SILVA, 2001). A propagação com o uso de pedaços do caule, denominados de manivas-semente, possibilita que, a partir da identificação de uma planta de interesse, ela tenha suas características genéticas replicadas integralmente, por meio de suas manivas, assim, cada maniva retirada de uma planta é uma cópia (clone) do genótipo dessa planta (SANTOS et al., 2009).

Entretanto, a propagação vegetativa, a partir das manivas-semente da mandioca, as tornam veículo de disseminação de pragas e doenças causadas por bactérias, fungos, vírus, nematóides e protozoários, resultando em perdas na produtividade da cultura. Dentre as doenças se encontram as podridões radiculares, causadas por fungos, com possível progressão para as manivas, normalmente são classificadas como podridão seca, podridão mole e podridão negra, como principais patógenos espécies dos gêneros *Phytophthora*, *Phytophthium*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium* (MUNIZ et al., 2006; NOTARO et al., 2013; HOHENFELD et al., 2018).

Nas manivas, há ocorrência da podridão seca, causada por fungos da família Botryosphaeriaceae, em específico *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., afetando manivas-semente em armazenamento e hastes do campo, o patógeno penetra nas hastes por meio de ferimentos, sendo favorecido em condições de alta umidade e temperatura, e disseminado por meio das manivas-semente (MASSOLA; BEDENDO, 2005). Nas raízes, a doença é denominada de podridão negra, que também afetam a parte aérea, com amarelecimento e queda das folhas, causados por fungos, também da família Botryosphaeriaceae.

Esses fungos ao incidir sobre as manivas podem diminuir a capacidade de germinação das gemas, o que pode estar relacionado com a podridão seca das manivas gerando plantas doentes devido a diminuição da viabilidade do material propagativo contaminado (MASSOLA JR. et al., 2016). A partir de estudos filogenéticos, realizados no Brasil, foi verificado que os agentes etiológicos da podridão negra das raízes se tratavam de *Lasiodiplodia* spp. e *Neoscytalidium dimidiatum* (= *N. hyalinum*) (MACHADO et al., 2014a), apesar de *Scytalidium lignicola* ter sido descrito como causador da podridão negra em raízes e caules de mandioca, foi a partir de análises filogenéticas a identificação de *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) Crous & Slippers (= *N. hyalinum*) como patógeno causador da podridão negra, este possui semelhanças morfológicas com *Scytalidium lignicola* Pesante (MACHADO et al., 2014a; VILAS BOAS et al., 2017).

Os gêneros *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium* estão incluídos na família Botryosphaeriaceae, com fortes indícios de elevada diversidade de espécies associadas a podridões em manga, mamão e podridão radicular em pinhão-mansão no Brasil (MARQUES et al., 2013a; NETTO et al., 2014; MACHADO et al., 2014b). Em se tratando da cultura da mandioca, estudos realizados no Brasil, identificou com frequência a presença de *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium* causando podridão negra das raízes e podridão seca das manivas, doenças que podem estar relacionadas pelo mesmo grupo de patógenos (BRITO et al., 2020).

Considerando a importância da cultura da mandioca, e a necessidade da identificação dos patógenos existentes nas manivas-sementes, utilizadas como método de propagação da mandioca, é de grande relevância o conhecimento dessas espécies patogênicas, sua diversidade e identificação dentro da família Botryosphaeriaceae, para adquirir uma maior eficiência nas medidas de controle e evitar a disseminação por meio das manivas-semente.

Diante disto, há necessidade da identificação da diversidade fúngica e das espécies da família Botryosphaeriaceae associadas as manivas-semente da mandioca com aspecto sadio e

que sofreram sanitização, de diferentes comunidades e municípios da região Oeste do Pará, onde a cultura é de grande importância para a agricultura familiar.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Manihot esculenta* Crantz

A mandioca é uma dicotiledônea classificada taxonomicamente ao nível de espécie como *Manihot esculenta* Crantz, a qual pertence à Classe Magnoliopsida, Ordem Malpighiales, Família Euphorbiaceae, Tribo Manihoteae e Gênero *Manihot* (NCBI 2023). É uma planta com raízes tuberosas, responsável pelo armazenamento de amido, e sistema radicular fibroso, responsável pela absorção de água e nutrientes, é um modelo de planta subarborescente ereto, lenhoso, com presença de nós salientes, de ramificação baixa ou alta, com folhas simples inseridas nos caules, de flores unissexuadas e monoclamídeas (CARVALHO, 2006).

Não há um consenso a respeito da sua origem, apesar que pode ter sua ascendência no Brasil Central, considerado o maior centro de diversidade do gênero com ocorrência de 38 das 98 espécies do gênero *Manihot*, e no México considerado o segundo maior centro de diversidade com 17 espécies (ALLEM, 2002; NASSAR et al., 2008), reforçando a hipótese de origem e domesticação Neotropical, principalmente no Brasil central, onde ocorre a maior diversidade biológica (CARVALHO, 2006). Sua distribuição mundial ocorreu após o descobrimento da América, quando os portugueses levaram para a costa oeste da África e depois para a costa leste, onde houve uma grande disseminação neste continente, na Ásia foi levada pelos espanhóis e da África foi distribuída para a Índia (ALBUQUERQUE, 2008).

É uma cultura de grande importância e fornece alimento e renda a nível mundial, e no Brasil em se tratando da região amazônica, é de grande relevância na região Norte, em relação ao ponto de vista cultural, econômico e social, considerada de segurança alimentar da maioria da população de baixa renda e cultivada em todos os municípios da região Norte, predominantemente por agricultores familiares, na transformação em farinha de mesa e outros subprodutos como fécula, tucupi e folhas cozidas (manipô) (ALVES et al., 2020).

A região Norte é a região de maior produção de mandioca no país, em 2023 obteve uma produção de 6,3 milhões de toneladas, seguida pela região Sul com 4,3 e a região Nordeste com 4,1 milhões de toneladas. O estado do Pará é o líder nas produções, com valores de 4,0 milhões de toneladas em 2023, seguido por Paraná com 3,2 milhões de toneladas (IBGE, 2023). A nível mundial, o Brasil liderou a produção de mandioca até a década de oitenta, quando perdeu o primeiro lugar entre os países produtores, e atualmente a Nigéria é a maior produtora mundial, com um total de 63 milhões de toneladas, no ano de 2021, segundo dados atualizados da

Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), seguida por República Democrática do Congo, Tailândia, Gana, Indonésia e Brasil (FAOSTAT, 2023).

A mandioca se divide em mandioca-brava de onde se origina a farinha, tucupi, goma, entre outros, e mandioca-mansa ou doce ou de mesa, também chamada de macaxeira ou aipim, e sua utilização é na forma in natura. Essa divisão, segundo os agricultores, se origina a partir do sabor amargo da mandioca-brava, que contém uma maior quantidade de “veneno” da mandioca, o que leva a morte se consumido em altas doses. Esse “veneno” corresponde a compostos cianogênicos (ácido cianídrico – HCN) presentes na mandioca, era percebido por povos antigos, durante a domesticação da planta, que as mandiocas com teores elevados desse ácido ficavam protegidas de animais, insetos e doenças, por conta do sabor amargo e tóxico (CUNHA; NETO, 2016).

De acordo com o teor de ácido cianídrico (HCN) presente nas raízes, as cultivares de mandioca são utilizadas para consumo fresco humano e animal e/ou processadas. Para consumo humano o ideal é que as cultivares apresentem teor de ácido cianídrico abaixo de 50 mg de HCN/Kg de raízes frescas, esse teor pode variar com a cultivar, o ambiente e idade da colheita. Para a indústria, as cultivares de mandioca são selecionadas conforme sua finalidade de utilização, o teor de HCN é liberado durante o processamento, o que leva para a utilização na indústria tanto a variedade brava como mansa. A mandioca industrializada dá origem a vários produtos, como a farinha, a fécula, também chamada de amido, tapioca ou goma, entre outros (MATTOS; CARDOSO, 2003).

Na Amazônia, a mandioca é uma das mais importantes culturas na agricultura familiar, todas as partes da planta pode ser beneficiado e transformado em produto, suas folhas são utilizadas na alimentação humana e animal, a base do caule pode ajudar na geração de energia, uma parte do caule é selecionado para novos plantios, além da utilização como forragem na alimentação animal. Com a raiz se retira a fécula, com várias aplicações na indústria, a raiz triturada se origina a farinha, o tucupi, muito utilizado na culinária paraense, e as cascas das raízes podem compor rações de animais e adubo orgânico (ALVES; JÚNIOR, 2022).

A mandioca possui capacidade de sobreviver em solos ácidos e com baixo teor de nutrientes, com altas temperaturas e em períodos secos (EL-SHARKAWY, 2014). Mesmo sob condições precárias, a produtividade das raízes pode chegar a 9 t/ha, como em regiões do Nordeste e Norte do Brasil, que em sua maioria é realizado por pequenos produtores que pouco utilizam de adubos químicos, mas adicionam adubo orgânico com periodicidade e quantidade incerta (ALMEIDA et al., 2018).

A propagação da mandioca ocorre de forma sexual, por meio de sementes, e assexual a partir de estacas, e por micropropagação. A forma assexual compreende a composição genética do indivíduo original para as próximas gerações, fixando genótipos relevantes aos produtores na multiplicação do mesmo indivíduo. A forma sexual ocorre por recombinação de alelos e genes na obtenção de novos indivíduos, essencial para os programas de melhoramento para adquirir novos clones de interesse (NASS et al., 2001).

A propagação assexual, ou vegetativa, é a forma mais utilizada na cultura da mandioca, principalmente por meio de estacas ou manivas-semente, que são pedaços de caule, permitindo a manutenção das características genéticas da planta matriz, bem como as características morfológicas e agrônômicas, o que representa uma grande vantagem. A propagação através das estacas (manivas-semente), consiste na capacidade de regeneração dos tecidos e emissão das raízes, elas devem possuir de cinco a sete gemas, uma grossura aproximada de 2,5 cm, o corte deve ser reto, e com comprimento em torno de 20 cm, a maniva-semente é destacada de uma planta de interesse e adicionada em substrato adequado (FUKUDA et al., 2006).

Entretanto a propagação vegetativa apresenta desvantagens como a impossibilidade de armazenar as manivas-sementes por tempo prolongado levando a perda da viabilidade do material e a disseminação de pragas e patógenos resultando em perdas na produção, quantidade e qualidade do material propagativo (SANTOS et al., 2009).

As manivas de mandioca são veículos de disseminação de patógenos causando diversas doenças na cultura, no Brasil existem cerca de 20 doenças associadas a mandioca que ocorrem por disseminação de patógenos a partir do material de propagação.

O mosaico comum, é a doença mais citada no Brasil em culturas de mandioca, como agente causal o *Cassava common mosaic virus* (CsCMV), com sintomas de áreas verdes claras em folhas jovens ou de meia idade, e sua transmissão ocorre pelo material propagativo doente (CALVERT & THRESH, 2002).

O mosaico das nervuras, causado pelo vírus *Cassava vein mosaic virus* (CsVMV), com sintomas de clorose junto as nervuras em folhas de meia idade, progredindo à medida que a folha envelhece, também transmitido somente por material de propagação (CALVERT & THRESH, 2002).

A doença couro de sapo, causada pelo vírus de couro de sapo de mandioca (*Cassava frogskin disease*, CFSD), suas raízes não engrossam e não acumulam amido, se tornando fibrosas e reduzindo a produção, é transmitido pelo uso de manivas infectadas e pelas moscas

brancas *Bemisia tuberculata* Bondar e *Aleurotrachelus sociales* Bondar (CALVERT et al., 2008).

O superbrotamento ou vassoura de bruxa da mandioca, causado por fitoplasma, encontrado com frequência em várias regiões do Brasil, as plantas apresentam nanismo, brotação excessiva com aspecto semelhante a uma vassoura, sua disseminação é por meio de manivas doentes (MASSOLA & BEDENDO, 2005).

A murcha bacteriana ou bacteriose, como agente causal *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* (Berthet and Bondar, 1915) Constantin et al. 2016, como sintomas a murcha das folhas, exsudação de látex, necrose do sistema vascular e morte descendente, o plantio com mudas infectadas é identificado por meio da murcha de folhas novas e a morte da planta, a bactéria se move para o pecíolo e haste através do xilema levando a infecção sistêmica da planta, é disseminado pelo material de propagação contaminado (HILLOCKS & WYDRA, 2002; MASSOLA & BEDENDO, 2005).

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides* f. sp. *manihotis* Henn (Penz) Sacc, se apresenta de duas formas, branda e severa, a forma branda ocorre no final do ciclo por estirpes fracas do patógeno, a forma severa ocorre por estirpes mais agressiva com danos maiores, podendo ocorrer morte de toda a parte área da planta, deve-se eliminar hastes infectadas (HILLOCKS & WYDRA, 2002).

A podridão seca das manivas, relatado como causador o fungo *L. theobromae*, afetando manivas em armazenamento e hastes no campo com a penetração do patógeno por meio de ferimentos, favorecido por temperaturas elevadas, ocorrem amarelecimento nos tecidos internos a partir das extremidades das manivas, a doença é espalhada por manivas contaminadas (MASSOLA et al., 2016).

E as podridões radiculares, causadas por fungos e oomicetos, uma das doenças mais importantes da cultura da mandioca no Brasil, responsáveis por uma perda de quase 80% na produtividade, e com poucos relatos detalhados sobre as espécies associadas as podridões radiculares e sua distribuição geográfica (VILAS BOAS et al., 2016; VILAS BOAS et al., 2017). Como um fator limitante no cultivo da mandioca, é observado que uma parte dos agricultores familiares estão migrando para outras atividades, devido a desmotivação com a cultura em razão das podridões radiculares, provocando redução na produtividade e baixa oferta da farinha e outros produtos (ALVES et al., 2020).

As podridões nas raízes correspondem um dos maiores problemas aos agricultores na região Amazônica, provocados por diferentes fungos, de difícil controle, ocorrendo em

qualquer estágio de desenvolvimento da planta, com murchas, clorose na parte aérea e nas raízes com sintomas classificados em podridão mole, podridão seca e podridão negra (ALVES et al., 2020). Dentre os principais patógenos se encontram espécies fúngicas do gênero *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Neoscytalidium*, *Phytophthora*, *Pythium* e *Phytopythium* causando os três tipos de podridão (MACHADO et al., 2014; VILAS BOAS et al., 2017; ALVES et al., 2020). Além das podridões radiculares, as manivas-semente também são afetadas prejudicando um dos principais meios de propagação da cultura da mandioca.

2.2 Podridões em manivas-semente de mandioca

A qualidade das manivas-semente é essencial, pois além do seu uso para a multiplicação da planta, é também um meio de propagação de patógenos, como das podridões, que ocorrem nas raízes podendo progredir para as manivas e assim espalhar o patógeno em futuras plantações por meio das manivas. Dentre as podridões se encontra a podridão seca das manivas, relatado como causador o fungo *L. theobromae*, é uma doença que afeta as manivas em armazenamento e hastes no campo, por meio da penetração do patógeno nas hastes que é favorecido em condições de temperatura e umidade alta, e assim, surgindo a podridão em manivas com áreas amareladas ou pardo-acinzentadas nos tecidos internos e posteriormente o escurecimento do tecido (MASSOLA et al., 2016).

Estudos realizados no Brasil, no Nordeste e Minas Gerais, identificou uma diversidade de espécies fúngicas da ordem Botryosphaeriales, associadas a podridão seca das manivas e podridão negra das raízes, sendo encontrados as espécies *Lasiodiplodia brasiliense*, *L. caatinguensis*, *L. euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. laeliocattleyae*, *L. parva*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* e *Neoscytalidium dimidiatum*, que foi concluído como doenças relacionadas causadas pelo mesmo grupo de fungos, o patógeno pode infectar as manivas, utilizadas como material de propagação, e ao serem plantadas, esses fungos podem colonizar as raízes causando a podridão negra (BRITO et al., 2020). Isso enfatiza a importância na melhoria dos tratamentos do material de propagação, evitando a disseminação de doenças por meio das manivas-sementes.

2.3 Família Botryosphaeriaceae

A ordem Botryosphaeriales (Dothideomycetes) (Schoch, Crous & Shoemaker) foi estabelecida por Schoch et al. (2006) que incluiu uma única família, a Botryosphaeriaceae. Mais tarde, indícios moleculares fornecidos por Minnis et al. (2012), incluiu a família Planistromellaceae. Wikee et al. (2013) ressurgiu Phyllostictaceae como uma família em Botryosphaeriales e Slippers et al. (2013) introduziu Aplosporellaceae, Melanopsaceae e Saccharataceae. Mais tarde Wyka & Broders (2016) acrescentaram Septorioideaceae e em seguida Yang et al. (2017) enunciou Endomelanconiopsisaceae e Pseudofusicoccumaceae, resultando em nove famílias dentro da ordem. Phillips et al. (2019) em estudos, argumentou um conjunto de dados reduzidos (LSU e ITS) e considerou que a ordem deve conter apenas Aplosporellaceae, Botryosphaeriaceae, Melanopsaceae, Phyllostictaceae, Planistromellaceae e Saccharataceae (ZHANG et al., 2021).

Os gêneros *Alanomyces* e *Aplosporella* são aceitos na família Aplosporellaceae. A família Botryosphaeriaceae, considerada a família mais diversa, compreende 22 gêneros: *Alanphillipsia*, *Barriopsis*, *Botryobambusa*, *Botryosphaeria*, *Cophinforma*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Endomelanconiopsis*, *Eutiarospora*, *Lasiodiplodia*, *Macrophomina*, *Marasasiomyces*, *Mucoharknessia*, *Neodeightonia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Oblongocollomyces*, *Phaeobotryon*, *Sakireeta*, *Sardiniella*, *Sphaeropsis* e *Tiarospora*. Melanopsaceae apenas com *Melanops*. A família Phyllostictaceae inclui dois gêneros, *Phyllosticta* e *Pseudofusicoccum*. Planistromellaceae com *Kellermania* e *Umthunziomyces*. E Saccharataceae compreende *Pileospora*, *Saccharata* e *Septorioides* (DISSANAYAKE et al., 2021).

A família Botryosphaeriaceae foi originalmente introduzida, por Theissen & Sydow (1918), como uma subfamília em Pseudosphaeriaceae, em seguida vários gêneros foram incluídos, mesmo sem o suporte de dados de sequências de DNA, foram realizados estudos com bases morfológicas, descrições detalhadas e chaves para gêneros e espécies da cultura, com a adição de mais gêneros, resultando, após vários tratamentos, no reconhecimento atual de 33 gêneros (ZHANG et al., 2021).

Membros de Botryosphaeriaceae possui grande distribuição geográfica e climática, exceto regiões polares, com capacidade endofítica, patogênica ou saprofítica, em ampla variedade de hospedeiros, associados a plantas lenhosas e herbáceas (PHILLIPS et al., 2013). Na forma endofítica, como latentes, esses fungos podem ser uma ameaça à agricultura por viverem em harmonia com seus hospedeiros, despercebidos e assim demonstrando sua capacidade patogênica em condições de estresse (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007). Na forma

patogênica podem agir como biotróficos, necrotróficos ou saprofíticos, responsáveis por doenças importantes, como manchas foliares, gomose, cancro, morte, podridão de frutos, caule e raízes (FERNÁNDEZ-HERRERA et al., 2017; MUNIRAH et al., 2017; HUDA-SHAKIRAH et al., 2022; SANGPUEAK et al., 2023).

A ecologia dos táxons da família Botryosphaeriaceae é considerado complexo e de difícil compreensão, há relatos de espécies patogênicas que foram isoladas da superfície e tecidos internos de plantas lenhosas, representando o que chamam de “fase endofítica”, o que não houve sintomas nos tecidos internos da planta, de onde foi isolado, e nem houve impactos negativos no crescimento do hospedeiro, como exemplo a espécie *Diplodia sapinea*, isolada de *Pinus*, além de outros relatos semelhantes encontrados, de espécies patogênicas e posteriormente isolado durante a fase endofítica (PETRINI; FISHER, 1988; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; LUO et al., 2019; HRYCAN et al., 2020; GARCIA et al., 2021).

Membros da família Botryosphaeriaceae são causadores de doenças em diversas culturas de grande importância, como a podridão-descendente da videira, podridão peduncular da mangueira, são relatados casos em vários países, incluindo o Brasil (TAVARES; MENEZES; CHOUDHURY, 1991; NOGUEIRA; FERRARI; LOUZEIRO, 2001; COSTA et al., 2010; MARQUES et al., 2012).

Os fungos que causam a podridão peduncular normalmente ocorrem de forma endofítica em tecidos maduros da planta, colonizando a inflorescência que leva a atingir de forma descendente até o pedúnculo, onde penetra o fruto em formação (LINS et al., 2010). Além de espécies do gênero *Lasiodiplodia*, já foram relatadas espécies de Botryosphaeriaceae patogênicas em mangas, como *Botryosphaeria dothidea*, *Botryosphaeria mamane*, *Fusicoccum fabicercianum*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum* sp., *Neoscytalidium dimidiatum* e *Pseudofusicoccum stromaticum* (MARQUES et al., 2013b).

Na cultura da mandioca foram identificadas as espécies *Lasiodiplodia theobromae*, *L. euphorbiaceicola* e *Neoscytalidium dimidiatum* causando podridão negra do caule e das raízes, na Tailândia (SANGPUEAK et al., 2023). E no Nordeste do Brasil e estado de Minas Gerais foram identificadas espécies de *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium* associados a podridão negra das raízes e podridão seca das manivas (BRITO et al., 2020).

2.3.1 *Lasiodiplodia*

Lasiodiplodia Ellis & Everh. é um dos gêneros dentro da família Botryosphaeriaceae mais relatado como causador de doenças em plantas, contendo várias espécies encontradas em uma variedade de plantas hospedeiras como saprófitas, parasitas e endófitos (PHILLIPS et al., 2013). Dentro do gênero se encontram 38 espécies descritas com base nos dados de sequências de DNA e características morfológicas (SLIPPERS et al., 2017). No entanto, estas espécies em sua maioria são consideradas crípticas dentro do complexo de espécies de *Lasiodiplodia theobromae* com 14 espécies apresentando caracteres morfológicos distintos (CRUYWAGEN et al., 2017). No Brasil, várias culturas de interesse econômico são afetadas por espécies de *Lasiodiplodia*, como exemplo, a mandioca (*M. esculenta*), manga (*Mangifera indica* L.), mamão (*Carica papaya* L.), pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), videira (*Vitis vinífera* L.) entre outros (MARQUES et al., 2013a; NETTO et al., 2014; MACHADO et al., 2014b; CORREIA et al., 2016; BRITO et al., 2020).

Lasiodiplodia é um gênero que possui a espécie *L. theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. como a espécie tipo do gênero, com morfologia de micélio imerso ou superficial, ramificado, septado e marrom escuro. Ascoma eustromático, castanho escuro a preto. Pseudoparáfises hialinas, septadas. Ascus bitunicados com endotúnica espessa, 8 esporos. Ascósporos irregularmente biseriados, inicialmente hialinos, tornando-se marrom-escuros, asseptados. Conidiomas estromáticos, imersos ou superficiais, separados ou agregados e confluentes, globosos, marrom-escuros, uni ou multiloculares. Conídios hialino quando jovem, tornando-se mais tarde medianamente euseptado, marrom escuro com estrias longitudinais, paredes espessas, oblongo a elipsóide, reto, amplamente arredondado no ápice, base truncada. Paráfise hialina, cilíndrica, septada (PHILLIPS et al., 2013).

2.3.2 *Neoscytalidium*

O gênero *Neoscytalidium* foi proposto por Crous & Chinelos (2006) para acomodar *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) Crous & Slippers, e em estudos seguintes, a espécie *hyalinum* foi considerada uma variante de *N. dimidiatum* (CURSI et al., 2011). *Neoscytalidium* já foi relatado como patógeno de plantas e como patógeno humano, causando infecções em pele (PAVLIC et al., 2008; MADRIDA et al., 2009). Existem relatos de espécies do gênero causando cancro do caule, podridão em fruta, ferrugem em folhas, morte do inhame, morte e podridão em manga, gomose em citros e rinossinusite (POLIZZI et al., 2009; CHUANG et al., 2012; MARQUES et al., 2013a; BAKHSHIZADEH et al., 2014; SANAHUJA et al., 2016; LIN et al.,

2017; NURUL NADIAH et al., 2017). Na mandioca foi identificado a presença do gênero como causador de podridão negra em raízes, nas regiões do Maranhão e Paraíba, no Brasil, além de relatos como causador da podridão seca em manivas (MACHADO et al., 2014a; BRITO et al., 2020), sendo que anteriormente era citado como *Scytalidium lignicola*, entretanto os estudos moleculares não confirmaram esta espécie, mas até o momento só *N. dimidiatum*.

Neoscytalidium possui morfologia de micélio aéreo, desarticulados, cilíndrico-truncados, oblongo-obtusos, marrom escuro, de paredes espessas, septados. Conídios em cadeias átricas. Morfo sinassexual do celomiceto, com micélio imerso, ramificado, septado, hialino. Conidiomas estromáticos e irregularmente multiloculares, ou picnídios e uniloculares, castanho escuro. Conídios holoblásticos, castanho claros, lisos ou verruculosos, de paredes finas, euseptados, septos espessos e proeminentes, cilíndricos a fusiformes, ápice obtuso, base truncada, egutulada, ocasionalmente com um apêndice apical mucilaginoso (PHILLIPS et al., 2013).

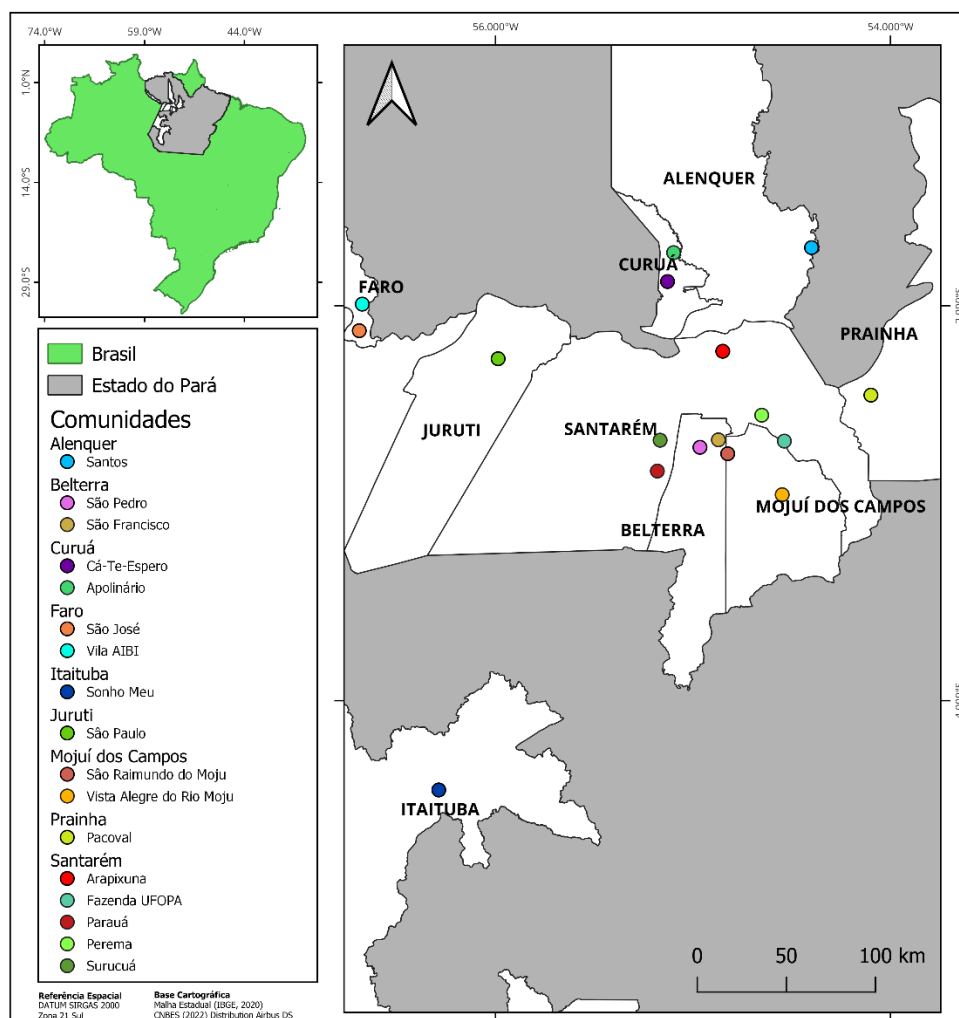
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de manivas-semente de mandioca, com aspecto sadio, de 17 locais da região Oeste do Pará, abrangendo comunidades dos municípios de Alenquer, Belterra, Curuá, Faro, Itaituba, Juruti, Mojuí dos Campos, Prainha e Santarém (Figura 1).

As coletas foram realizadas em parceria com as Secretarias de Agricultura dos municípios, agricultores e alunos da UFOPA, e encaminhado para o Laboratório Genética da Interação (LGI), localizado na UFOPA campus Tapajós, Bloco Modular I.

Figura 1: Localização dos locais de coleta de manivas-semente de mandioca.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

3.2 Indução da podridão nas manivas

Ao receber as manivas, iniciou-se o processo de indução por meio de câmara úmida, as manivas foram cortadas entre 15 e 20 cm, lavadas e submetidas a tratamento de sanitização com solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm (1 ml de água sanitária e 100 ml de água destilada) por 2 minutos, e em seguida deixadas para secar. As manivas foram acondicionadas em bandejas, e mantidas em câmara úmida dentro de saco plástico com um copo com água, para manter a umidade, até o surgimento de aspectos de podridão. A cada semana foram analisadas para verificar o processo da podridão.

3.3 Isolamento

O isolamento dos fungos foi realizado a partir de partes do caule em podridão, com isolamento por diluição seriada, para adquirir culturas monospóricas dos fungos presentes. A diluição se deu por meio de um pequeno corte do tecido com presença de esporos, ou seja, de uma parte em estado de podridão, e adicionado em um tubo contendo 900 µl de água destilada estéril, sendo levado ao vórtex para homogeneização da mistura, e em seguida o início da diluição (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) com 900 µl de água destilada estéril em cada tubo, e retirado 100 µl para cada diluição. O plaqueamento foi realizado nas diluições 10^{-2} e 10^{-4} , com 200 µl adicionado em placa de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) e incubadas em câmara do tipo BOD a 25°C. O surgimento das colônias foi acompanhado todos os dias e em seguida a sua detecção individualizada foi realizado o repique imediato, para assim obter o isolamento da cultura monospórica.

3.4 Conservação

A conservação dos isolados foi realizada através do método de conservação em óleo mineral e pelo método de Castellani. Discos de aproximadamente 5mm contendo meio de cultura e estruturas ativas dos fungos foram imergidos em tubos contendo 1,0 ml de óleo mineral (BUELL E WESTON, 1947) e outro tubo com 1,0 ml de água destilada (CASTELLANI, 1939), ambos estéreis, respectivamente, identificados e armazenados. As conservações fazem parte da coleção do Laboratório Genética da Interação (LGI) da UFOPA.

3.5 Aspectos morfológicos

Para a identificação morfológica os isolados foram repicados para meio de cultura batata dextrose ágar (BDA). Foram observados aspectos macro e micromorfológicos das estruturas reprodutivas dos isolados e comparadas com a literatura especializada, para identificação a nível de gênero de fungos filamentosos (BARNETT e HUNTER, 1998).

3.6 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada por raspagem e maceração do micélio com nitrogênio líquido e pelo kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega). Primeiramente, os isolados cultivados em meio BDA, após crescimento, parte de seu micélio foi raspado e depositado em cadinhos, e com auxílio do nitrogênio, para auxiliar na quebra da parede celular do fungo, foi macerado e em seguida adicionado 600 µl de Nuclei Lysis Solution, e transferidos para microtubos. As amostras foram incubadas em banho maria a temperatura de 65°C por 30 minutos. Após o banho maria, foi adicionado 200 µl de Protein Precipitation Solution e centrifugadas por 10 minutos e velocidade de 10.000 rpm. O sobrenadante formado foi retirado e transferido para outro microtubo contendo 600 µl de isopropanol gelado, em seguida centrifugado novamente por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e após secagem, adicionado 50 µl de DNA Rehydration Solution e em seguida as amostras foram conservadas em freezer.

3.7 PCR e sequenciamento

A reação de PCR foi realizada a partir do DNA extraído dos isolados utilizando iniciadores específicos para as regiões de ITS1-5,8-ITS2 com os primers universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990). Foi amplificado a região gênica do fator de elongação 1 α (*tef1* - α), com os primers EF1 - 688F (5'- CGGTCACCTTGATCTACAAGTGC -3') e EF1 - 1251R (5'- CCTCGAACTCACCAGTACCG -3') (JACOBS et al., 2004). E por fim, a amplificação da região do gene da subunidade II da RNA polimerase (*rpb2*) com o par de primers rpb2-LasF (5'-GGTAGCGACGTCACCTCCT-3') e rpb2-LasR (5'-GCGCAAATACCCAGAATCAT-3') (CRUYWAGEN et al., 2017). As reações de PCR foram realizadas usando a DreamTaq Green

Buffer, nas seguintes concentrações: 5,0 µl de 10x DreamTaq Green Buffer (20mM), 3,0 µl de mistura dNTP (20mM cada), 3,0 µl de primer *forward* e *reverse* (10 mM), 0,4 µl (5U/µl) da Taq DNA polimerase, 1 µl de DNA molde e o volume total da PCR ajustado para 50 µl com água ultrapura estéril.

O ciclo para o ITS consistiram em desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 5 minutos. Para o *tef1-α* as condições consistiram em desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos seguidos de 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. E para o *rpb2*, as condições foram desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos seguidos de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 52°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos e extensão final de 72°C por 5 minutos.

As reações foram conduzidas em termociclador ProFlex™ 3x32-Well PCR System (Thermo Fisher Scientific). Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,0% e evidenciados com *Blue Green* em transluminador de luz azul.

Os produtos do PCR para sequenciamento foram secos em estufa a 60°C com o objetivo de envio para sequenciamento pelo método Sanger pela ACTgene (<https://actgene.com.br/>). As sequências obtidas *forward* e *reverse* foram editadas manualmente com o auxílio do software BioEdit Sequence Alignment Editor, para obter a sequência consenso foi utilizado o CAP3 Sequence Assembly Program (PRABI-Doua), em seguida submetidas no GenBank, por meio da ferramenta BLASTn para a determinação ao nível de gênero conforme as similaridades das sequências com o banco de dados.

3.8 Análise filogenética

Para a determinação da diversidade foram utilizadas as sequências consenso da região ITS dos isolados, e passaram por alinhamento múltiplo, no MEGA X, por meio do Muscle, em seguida a construção da árvore filogenética pelo método máxima verossimilhança, utilizando o modelo Tamura-Nei, com bootstrap de 500 reamostragens.

Na identificação molecular das espécies de *Lasiodiplodia*, foram obtidas sequências tipo ou de coleções de referência, no NCBI, das regiões ITS, fator de elongação 1 α (*tef1* – α) e subunidade II da RNA polimerase (*rpb2*), foram alinhadas as sequências tipo e dos isolados obtidos neste trabalho, das respectivas regiões, separadamente, no MEGA X, por meio do

Muscle, e construído a árvore filogenética para analisar os grupos formados. E por último foi construído a árvore concatenada das regiões ITS e *tef1* – α , gerado pelo método máxima verossimilhança, modelo Tamura-Nei e bootstrap de 500 reamostragens.

3.9 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade foi realizado com os isolados de *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium*, em raízes de macaxeira, obtidas no mercado municipal em Santarém/PA, foram selecionadas raízes inteiras e sem ferimentos e levadas ao laboratório Genética da Interação (LGI). As raízes foram lavadas e em seguida foi realizado a desinfecção superficial imergindo em solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm por cinco minutos, e colocadas para secar. Após a secagem, iniciou-se a metodologia adaptada de Onyeka et al. (2005), com ferimentos por meio de um perfurador de metal (diâmetro de 12 mm) em pontos equidistantes da raiz nas regiões proximal, central e distal. No ponto central foi apenas perfurado e recolocado o disco da casca e fechado com fita crepe, sendo considerado o controle. Nos pontos proximal e distal foram adicionados discos contendo meio de cultura e micélio dos fungos e em seguida fechado com o disco da casca e passado fita crepe (Figura 2).

Após a inoculação, as raízes foram mantidas em câmara úmida, acondicionadas em bandejas com saco plástico e um copo com água, para manter a umidade. Foram realizados experimentos prévios com 2, 3 e 5 dias para definir a quantidade exata de duração do experimento, baseado no surgimento de lesões. A avaliação das inoculações se deu na capacidade de produção de lesões nas raízes e em caso positivo de lesões foi realizado o reisolamento de partes da região com lesão em meio BDA, e em seguida a caracterização morfológica do fungo isolado, atendendo o postulado de Koch.

Figura 2: Inoculação de raízes, com os três pontos de perfuração, proximal e distal com os discos do patogênico e o ponto central como controle, apenas perfurado e recolocado com a casca.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

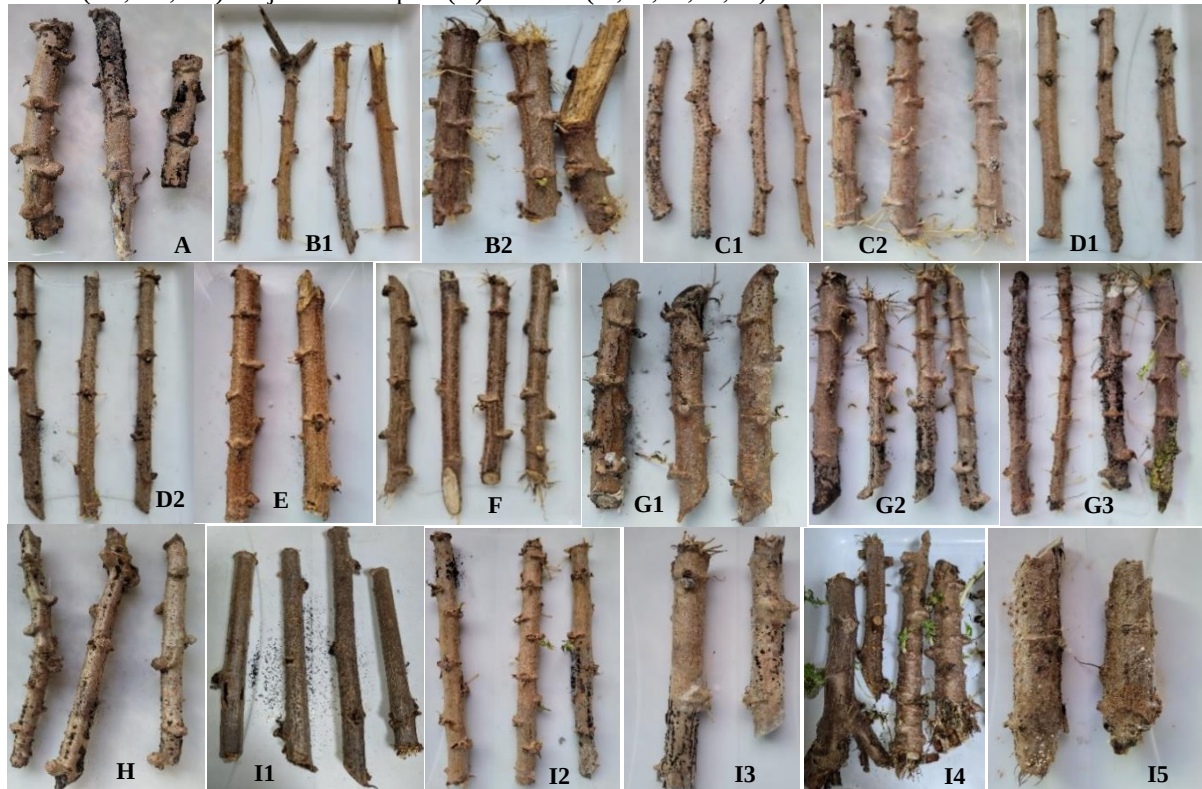
4. RESULTADOS

4.1 Indução da podridão e desinfecção nas manivas

Na indução de podridão nas manivas-semente, tanto nas hastes que passaram por processo de desinfecção ou sanitização com hipoclorito como as que não foram tratadas, houve ocorrência de podridões. O processo de desinfecção superficial das manivas, com hipoclorito de sódio a 200 ppm, não alterou o padrão de ocorrências de podridões nas manivas. Evidenciando a presença do inóculo não de forma superficial, mas podendo estar no tecido como infecção latente ou endofítica, e evidenciando que esta prática agrícola não é eficiente para eliminar estes fungos, que provocam podridões de manivas-semente.

Ao observar o aspecto das manivas com podridões, dos locais de coleta (Figura 3), foi constatada a predominância de estruturas pulverulentas de cor preta, mas também outras variações de cor e aspecto, o que evidencia uma diversidade fúngica associada aos tecidos, dependente de cultivar e principalmente do local.

Figura 3: Manivas apodrecidas. (A) Alenquer. (B1, B2) Belterra. (C1, C2) Curuá. (D1, D2) Faro. (E) Itaituba. (F) Juruti. (G1, G2, G3) Mojuí dos Campos. (H) Prainha. (I1, I2, I3, I4, I5) Santarém.

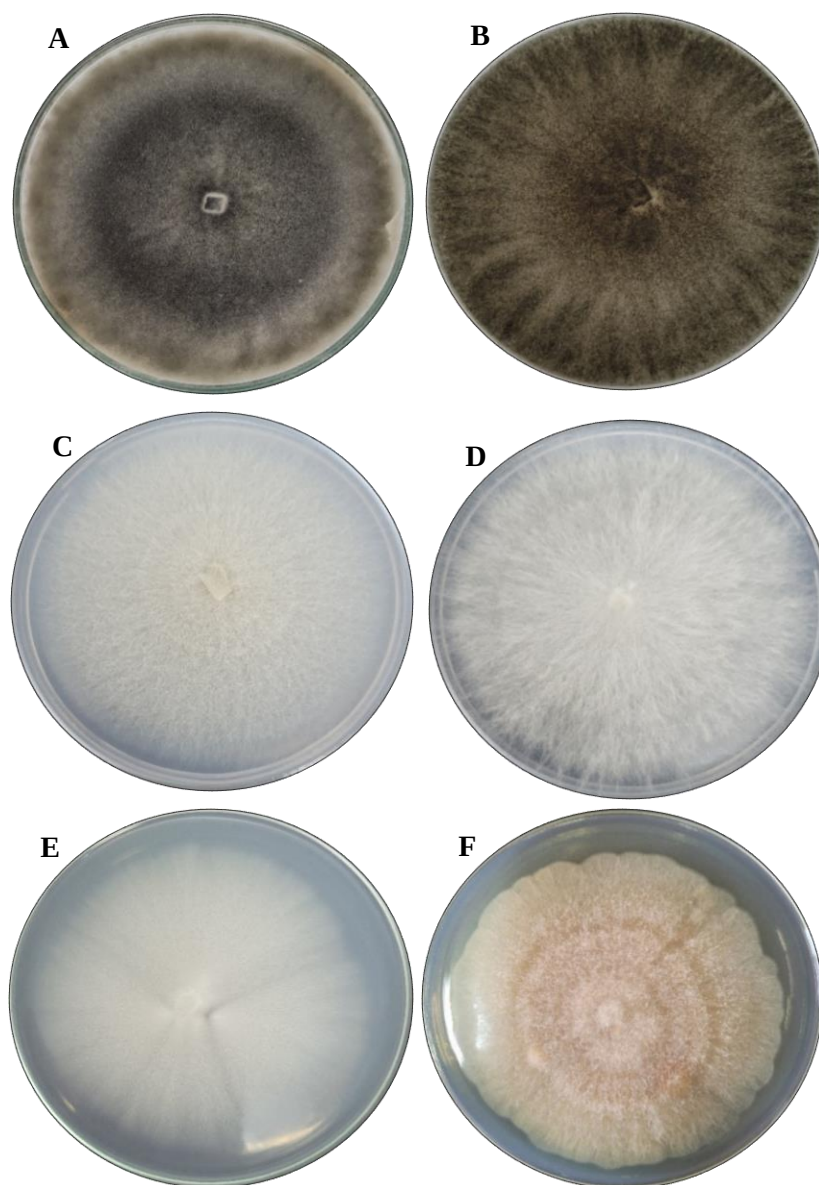


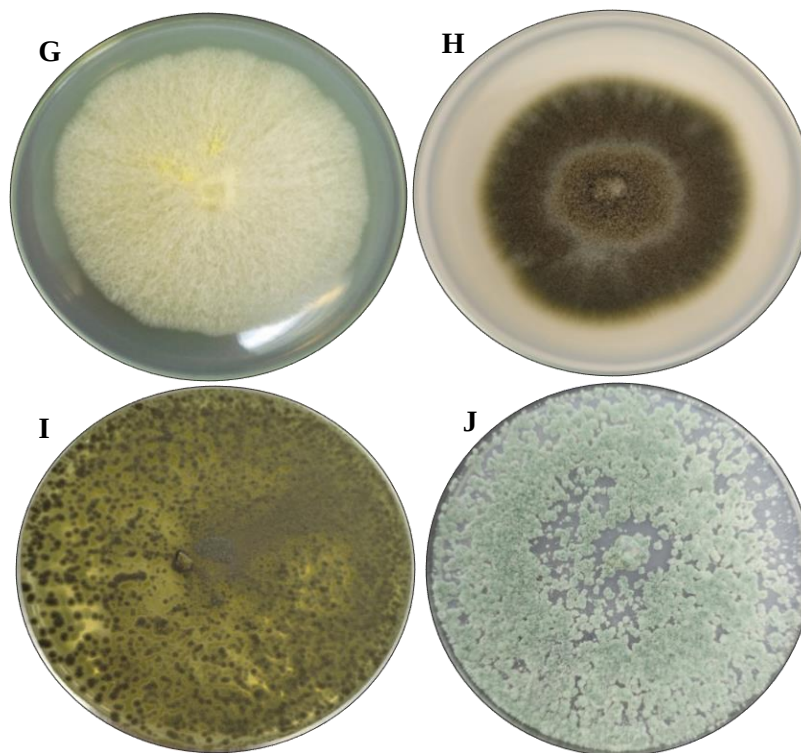
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

4.2 Isolamento dos fungos

Os isolamentos apresentaram resultados já esperados pelo aspecto das podridões nas manivas, dos 17 locais de coleta foi obtida uma diversidade de fungos, com aspectos culturais variados em tons de coloração que incluíram preto, cinza, branco, verde escuro, amarelo e creme, com intensidades variando conforme o crescimento e o tipo de isolado (Figura 4). As culturas apresentaram micélios aéreos, texturas cotonosas, com rápido e lento crescimento, com micélios no início na cor branca e ao longo do tempo escurecendo para tons acinzentados.

Figura 4: Variação da cor das colônias dos fungos isolados de manivas de mandioca. (A) Cinza. (B) Preto. (C, D, E) Branco. (F) Creme. (G) Amarelo. (H, I, J) Verde.



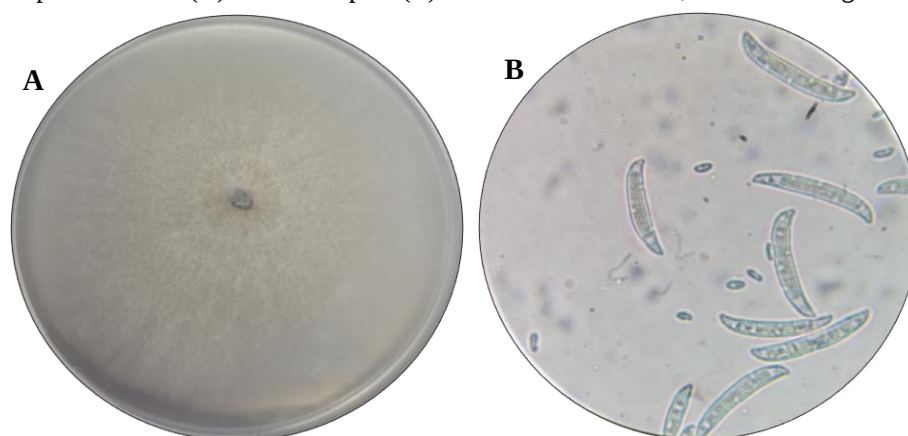


Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

A partir de aspectos culturais e estruturas encontradas em pré-isolamento ou pós-isolamento levou-se ao indicativo de alguns gêneros como *Fusarium*, *Lasioidiplodia* e *Scytalidium/Neoscytalidium*, já identificados na literatura como fungos associados a mandioca e *Trichoderma* dentre os diversos, os demais isolados encontrados foram de difícil identificação morfológica, sendo possível a identificação a nível de gênero a partir de análise molecular.

O gênero *Fusarium* apresentaram aspecto cultural de coloração branco, com textura cottonosa e micélio aéreo (Figura 5 A) e no aspecto microscópico foram observados fiálides longas e macroconídios e microconídios (Figura 5 B). Os macroconídios foram de aspecto típico do gênero *Fusarium*, formato de barca, com extremidades curvas e mais finas, com vários septos transversais (Figura 5 B), enquanto os microconídios foram predominantemente unicelulares, isto é, sem septos.

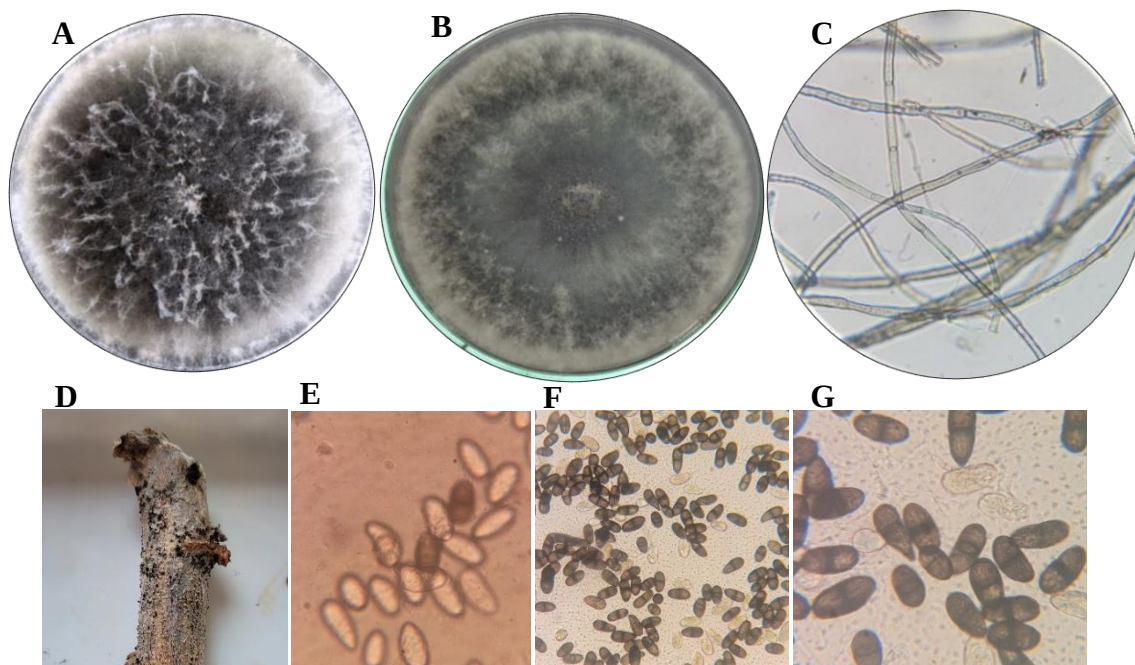
Figura 5: Aspecto cultural (A) e microscópico (B) do isolado LGI113-23, indicativo do gênero *Fusarium*.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

O gênero *Lasioidiplodia* foi o gênero mais frequente, sendo encontrado em 14 comunidades pertencentes aos 9 municípios da área de coleta. Foi possível, a partir dos aspectos culturais em meio BDA e no aspecto da podridão encontrado nas manivas o indicativo ao gênero *Lasioidiplodia* (Figura 6). Culturas de coloração branco-acinzentado (Figura 6 A) que se altera para um tom cinza a preto ao longo do tempo (Figura 6 B), com micélio abundante, de rápido crescimento. Microscopicamente não apresentou esporos em meio BDA, apenas hifas septadas, hialinas ou com diferentes níveis de melanização (Figura 6 C), sendo necessário a indução para a produção de esporos. No aspecto da podridão nas manivas, foi observado a olho nu, pontos escuros (Figura 6 D), que ao serem observados microscopicamente houve a presença de esporos ovais de coloração hialina sem septos e quando maduros, marrom escuro com septos (Figura 6 E-G), típico do gênero *Lasioidiplodia*.

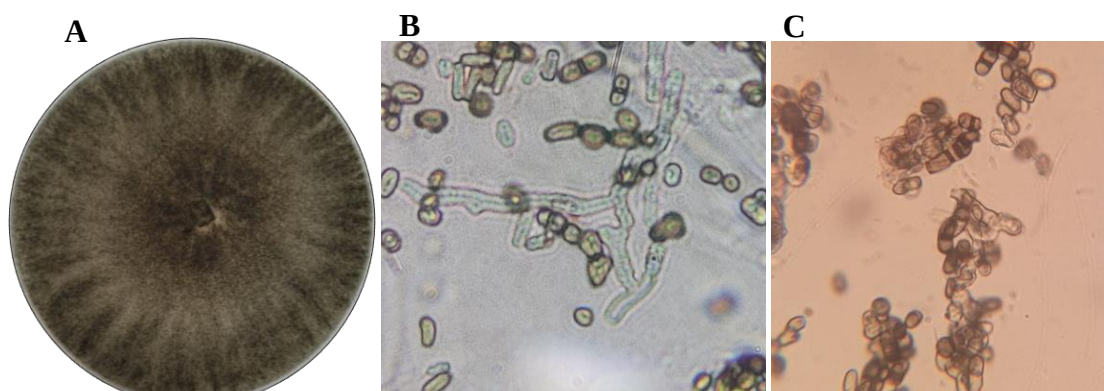
Figura 6: Estruturas culturais e microscópicas do isolado de *Lasioidiplodia*. (A) Coloração branco-acinzentado. (B) Coloração cinza a preto. (C) Hifas em meio BDA. (D) Estrutura da podridão na maniva. (E, F, G) Esporos observados nos pontos de podridão.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

O gênero *Scytalidium*/*Neoscytalidium* foi encontrado apenas em dois locais, com colônias de coloração preta, micélio aéreo de aspecto pulverulento, e crescimento rápido (Figura 7 A). Nas estruturas microscópicas foi observado hifas septadas, hialinas e quando melanizadas iniciando a ontogênese dos artrósporos que são esporos concatenados, cilíndricos e ovais, formados pela diferenciação das hifas e indicativo dos gêneros *Scytalidium* ou *Neoscytalidium* (Figura 7 B-C). Este tipo de artrósporos eram confundidos com *Lasioidiplodia* por alguns desses esporos melanizados possuírem um septo transversal (Figura 7 B), podendo ser diferenciados pela estrutura sexual ou pela identificação molecular, já que *Scytalidium* é da ordem Helotiales e *Neoscytalidium* da ordem Botryosphaerales e da família Botryosphaereaceae (INDEX FUNGORUM, 2024).

Figura 7: Estrutura cultural e microscópica do isolado LGI187-23 de *Scytalidium/Neoscytalidium*.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

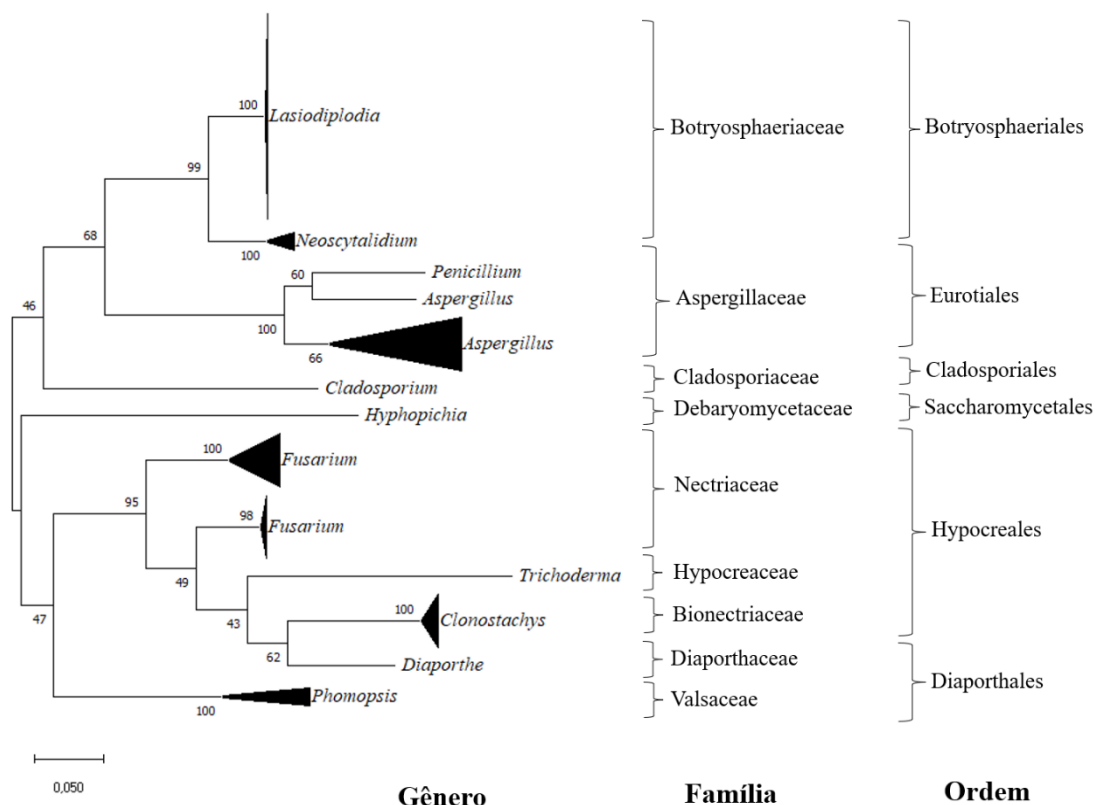
4.3 Identificação Molecular

4.3.1 Diversidade fúngica

Com a análise molecular da região espaçadora interna transcrita do DNA ribossomal (ITS) foi possível a identificação de 10 gêneros de ascomicetos isolados das manivas-semente de mandioca, não sendo detectados nem basidiomicetos nem oomicetos. Dos gêneros já descritos na literatura como associados a mandioca, detectamos a presença de *Fusarium*, *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium*, com maior frequência o gênero *Lasiodiplodia*, e por segundo o gênero *Fusarium*. Além disso, foi identificado a presença de outros gêneros associados, como, *Clonostachys*, *Diaporthe/Phomopsis*, *Cladosporium*, *Hyphopichia*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*.

Com as sequências da região ITS foi apresentado os gêneros agrupados em 9 famílias que são, Botryosphaeriaceae, Aspergillaceae, Cladosporiaceae, Debaryomycetaceae, Nectriaceae, Hypocreaceae, Bionectriaceae, Diaporthaceae e Valsaceae, pertencentes a 6 filos, Botryosphaeriales e Hypocreales, como os maiores grupos, e os grupos menores Eurotiales, Cladosporiales, Saccharomycetales e Diaporthales, a partir da árvore filogenética é demonstrado os grupos diversos encontrados em manivas (Figura 8).

Figura 8: Árvore filogenética dos grupos de gêneros gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança da região gênica ITS.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Em se tratando da distribuição geográfica, não houve homogeneidade dos gêneros em relação aos municípios de coleta da região Oeste do Pará. Em primeiro, de maior frequência, foi o *Lasiodiplodia* encontrado em todos os municípios de coleta, porém não em todas as comunidades, por exemplo, foi detectado nos municípios de Belterra, Curuá, Faro e Santarém, com exceção de uma das comunidades analisadas nestes municípios, já os demais municípios foram detectados a presença do gênero em todas as comunidades avaliadas. O gênero *Fusarium* foi identificado em 6 municípios, Belterra, Curuá, Juruti, Mojuí dos Campos, Prainha e Santarém, o segundo tipo de fungo mais encontrado em manivas, ou seja, os gêneros isolados com maior frequência foram fungos considerados patogênicos. O terceiro gênero de maior frequência, foi o *Clonostachys*, detectado em 4 municípios, Curuá, Mojuí dos Campos, Prainha e duas comunidades de Santarém. Outro ponto a se destacar, foi o grau de diversidade encontrado no município de Curuá, foi o local mais diverso em gêneros, sendo *Lasiodiplodia*, *Hyphopichia*, *Fusarium*, *Phomopsis*, *Cladosporium* e *Clonostachys*. A seguir a relação de cada um dos gêneros encontrados nos 17 locais de coleta (Quadro 1).

Quadro 1: Relação dos municípios, comunidades e gêneros encontrados em cada uma das localidades.

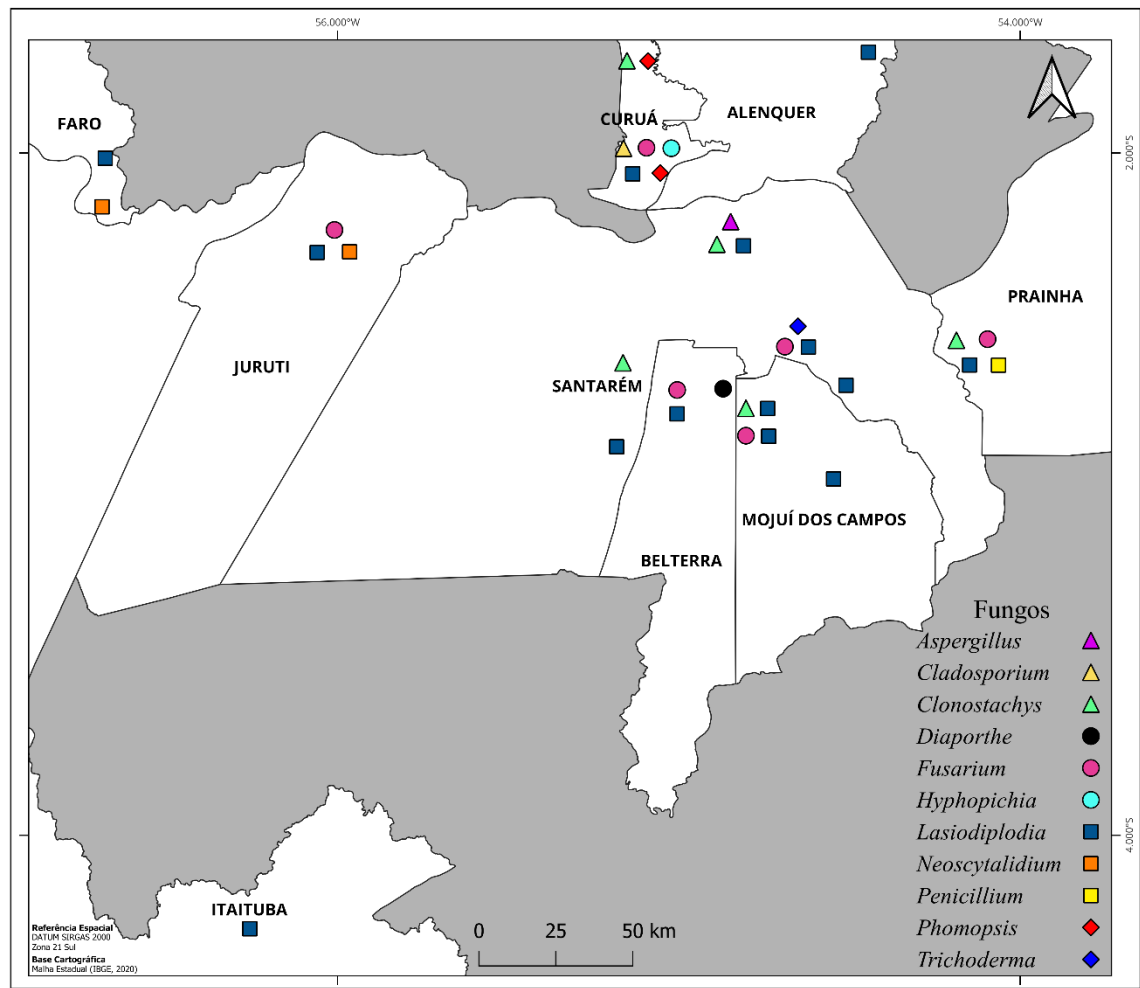
Município	Comunidade	Gênero
Alenquer	Santos	<i>Lasiodiplodia</i>
Belterra	São Pedro	<i>Fusarium</i>
		<i>Lasiodiplodia</i>
	São Francisco	<i>Diaporthe</i>
Curuá	Cá-Te-Espero	<i>Cladosporium</i>
		<i>Fusarium</i>
		<i>Hyphopichia</i>
		<i>Lasiodiplodia</i>
		<i>Phomopsis</i>
	Apolinário	<i>Clonostachys</i>
		<i>Phomopsis</i>
Faro	São José	<i>Fusarium</i>
		<i>Neoscytalidium</i>
	AIBI	<i>Lasiodiplodia</i>
Itaituba	Sonho Meu	<i>Lasiodiplodia</i>
Juruti	São Paulo	<i>Fusarium</i>
		<i>Lasiodiplodia</i>
		<i>Neoscytalidium</i>
Mojuí dos Campos	Vista Alegre do Rio Moju	<i>Lasiodiplodia</i>
	São Raimundo do Moju	<i>Fusarium</i>
		<i>Clonostachys</i>
		<i>Lasiodiplodia</i>
Prainha	Pacoval	<i>Clonostachys</i>
		<i>Fusarium</i>
		<i>Lasiodiplodia</i>
		<i>Penicillium</i>
Santarém	Arapixuna	<i>Aspergillus</i>
		<i>Clonostachys</i>
		<i>Lasiodiplodia</i>
	Perema	<i>Fusarium</i>

		<i>Lasiodiplodia</i>
		<i>Trichoderma</i>
	Fazenda UFOPA	<i>Lasiodiplodia</i>
	Parauá	<i>Lasiodiplodia</i>
	Surucua	<i>Clonostachys</i>

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

No mapa a seguir é possível analisar claramente o grau de distribuição ocorrido na região Oeste do Pará, em relação a diversidade fúngica em manivas-sementes (Figura 9).

Figura 9: Mapa de distribuição geográfica dos gêneros associados a manivas-sementes, na região Oeste do Pará.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

4.3.2 Filogenia de espécies de *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium*

Para uma possível identidade dos isolados de *Lasiodiplodia*, foram sequenciados regiões gênicas de ITS, do gene parcial do fator de alongação a tradução 1 alfa (*tef* 1 – α) e do gene parcial da RNA polimerase II (*rpb2*) para assim comparar com as sequências disponíveis no GenBank de diversas espécies de *Lasiodiplodia*, por meio de uma árvore filogenética.

A árvore filogenética da região ITS consistiu em 51 sequências de nucleotídeos, 21 das quais eram deste estudo, enraizada com *L. crassispora* e *L. pyriformis* (Figura 10). A região ITS não diferenciou a maioria das espécies de *Lasiodiplodia*, o que demonstra a menor sensibilidade na diferenciação de espécies quando utilizado apenas esta região, mas ela serve na determinação do gênero com precisão, quando mostra o gênero *Lasiodiplodia* monofilético (dados não mostrados). Entretanto, pelo uso da região ITS, foi observado que 17 sequências do trabalho foram agrupadas com 8 espécies (*L. pluvirova*, *L. theobromae*, *L. brasiliensis*, *caatinguensis*, *hormozganensis*, *L. laeliocattleyae*, *L. parva* e *L. euphorbiaceicola*); 1 sequência do isolado LGI001-22 com 6 espécies (*L. iraniensis*, *L. hyalina*, *L. thailandica*, *L. chinensis*, *L. pseudotheobromae* e *L. sterculiae*), o isolado LGI 119-23 se agrupou próximo com *L. pontae* e o isolado LGI 098-23 se agrupou com *L. gilanensis*, e uma sequência de LGI 109-23 não se agrupou com nenhuma espécie especificamente.

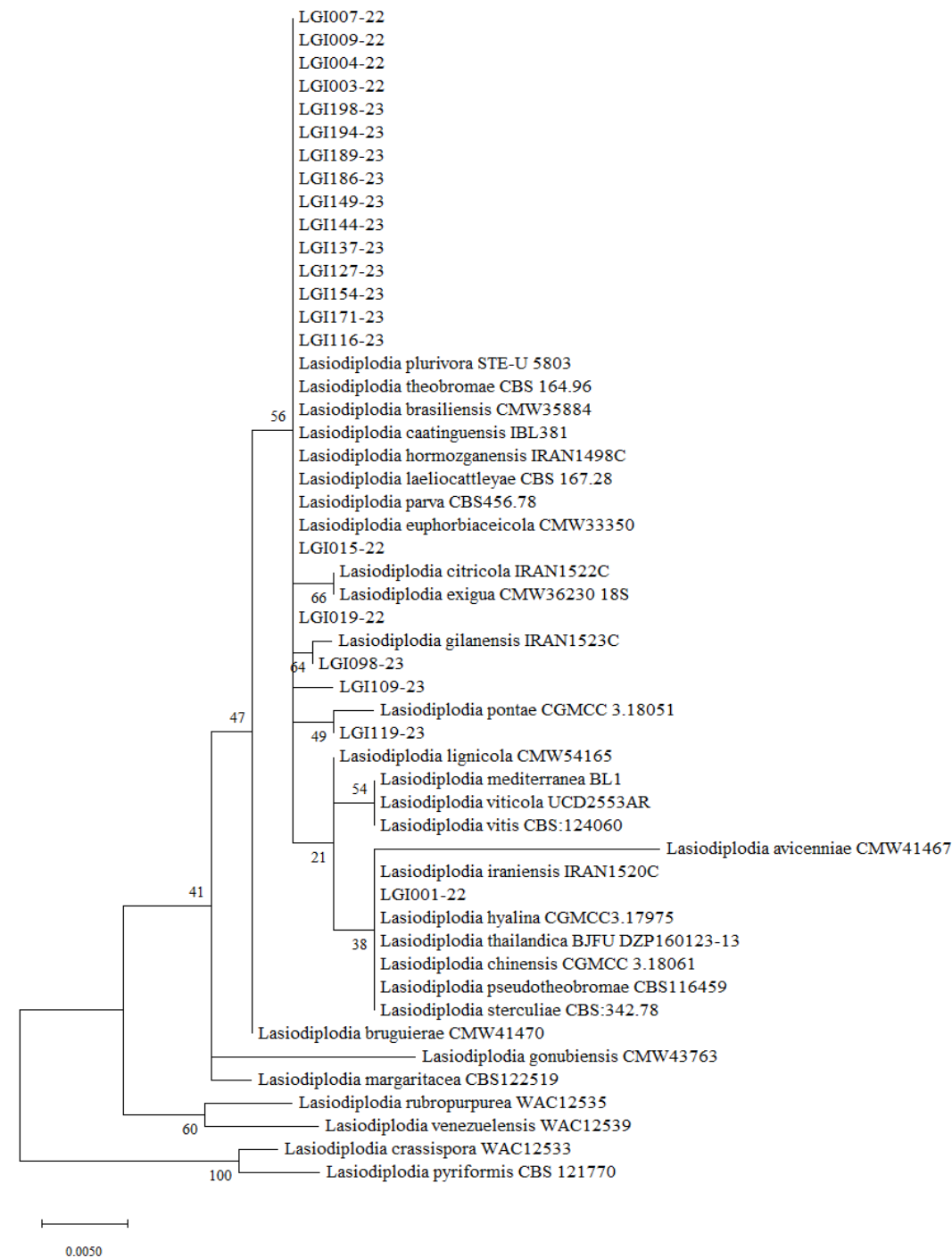
Na árvore filogenética da região *tef* 1 – α foi composto de 48 sequências de nucleotídeos, enraizados com *L. gonubiensis* e *L. rubropurpurea*, das quais 18 fazem parte deste estudo (Figura 11). Foi possível detectar uma maior distinção entre as espécies quando comparado com a região ITS, ainda assim não foi conclusivo a identificação para alguns isolados, em se tratando da região *tef* 1 – α . Seis isolados se agruparam com *Lasiodiplodia theobromae*, o isolado LGI098-23 se agrupou com *Lasiodiplodia euphorbiaceicola* e o isolado LGI001-22 se agrupou com *Lasiodiplodia pseudotheobromae*.

Para a região *rpb2* foram analisadas 34 sequências de nucleotídeos, enraizados com *L. crassispora* e *L. pyriformis* (Figura 12). A região gênica de *rpb2* deveria diferenciar entre a maioria das espécies de *Lasiodiplodia*, porém houve problemas de sequenciamento dos isolados para esta região, a maioria não sequenciou o DNA de interesse, provavelmente devido a ocorrência de dímeros de primer na reação de PCR. Apenas seis isolados de *Lasiodiplodia* sequenciaram, em que cinco isolados se agruparam com *L. theobromae* e *L. brasiliensis*, não ocorrendo a distinção entre as duas espécies, e um isolado se agrupou com *L. parva*, *L. euphorbiaceicola* e *L. citricola*.

A árvore concatenada das regiões ITS e *tef* 1 – α , gerada por Máxima Verossimilhança, envolveu 48 sequências de nucleotídeos, enraizados com *L. gonubensis* e *L. rubropurpurea* (Figura 13). O consenso das duas regiões gênicas diferenciou várias espécies, seis isolados se agruparam com *L. theobromae*, o isolado LGI149-23 com *L. brasiliensis*, o isolado LGI098-23 se agrupou com *L. euphorbiaceicola*, e o isolado LGI001-22 com *L. pseudotheobromae*. O que totalizou em seis espécies associadas com as manivas-sementes (*L. pontae*, *L. gilanensis*, *L. theobromae*, *L. brasiliensis*, *L. euphorbiaceicola* e *L. pseudotheobromae*) quando analisada a região ITS e *tef* 1 – α .

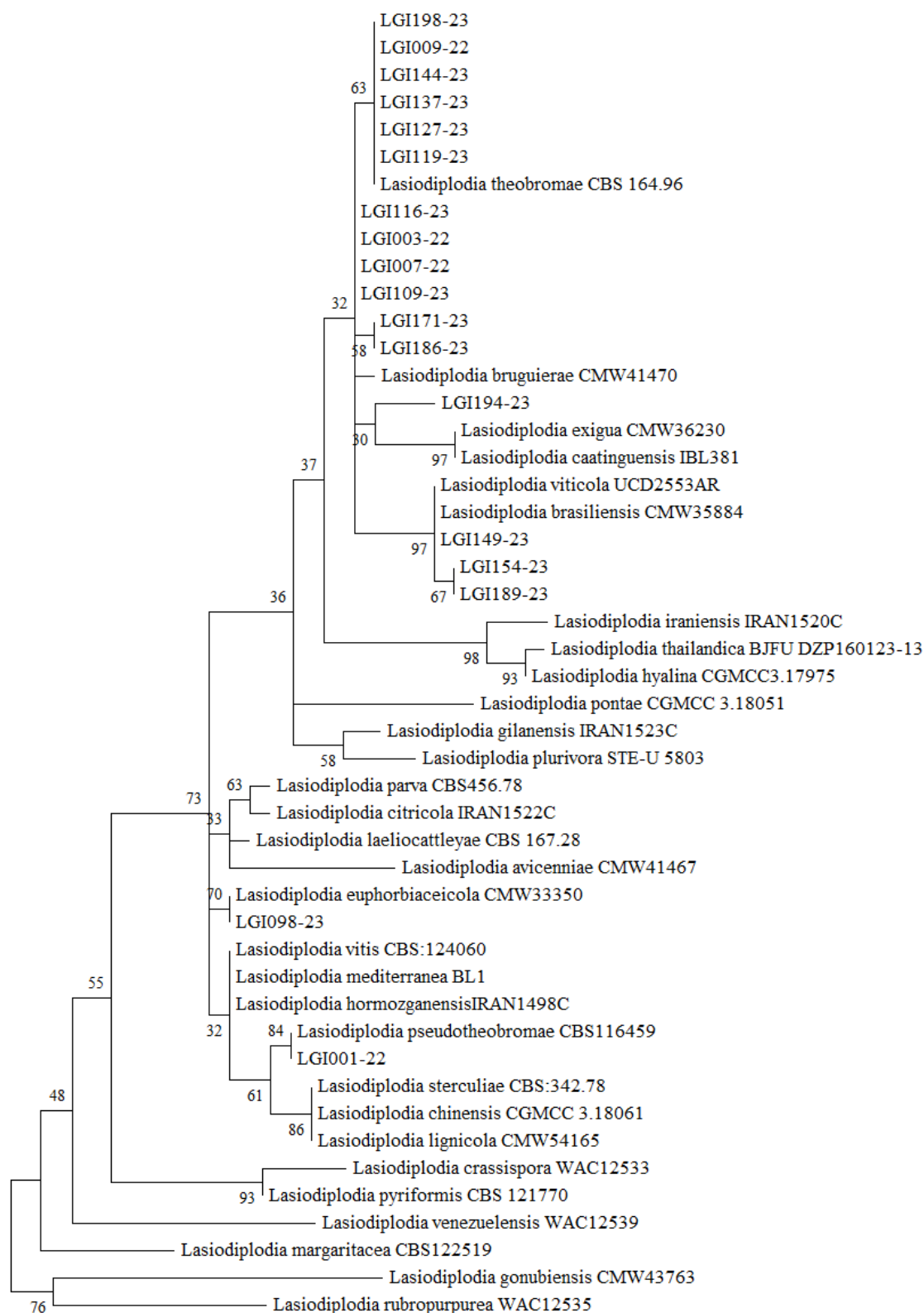
A árvore filogenética para *Neoscytalidium* consistiu na análise a partir da região ITS, com duas sequências de nucleotídeos, enraizada com *Botryosphaeria dothidea* e *Cophinforma atrovirens* (Figura 14). A região ITS demonstrou os isolados agrupados com *Neoscytalidium dimiditum*, confirmando pertencer a esta espécie, a partir da região ITS.

Figura 10: Árvore filogenética de *Lasiodiplodia*, gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança da região gênica ITS, bootstrap 500. Árvore enraizada com *Lasiodiplodia crassispora* e *Lasiodiplodia pyriformis*. Os isolados deste estudo estão identificados como LGI.



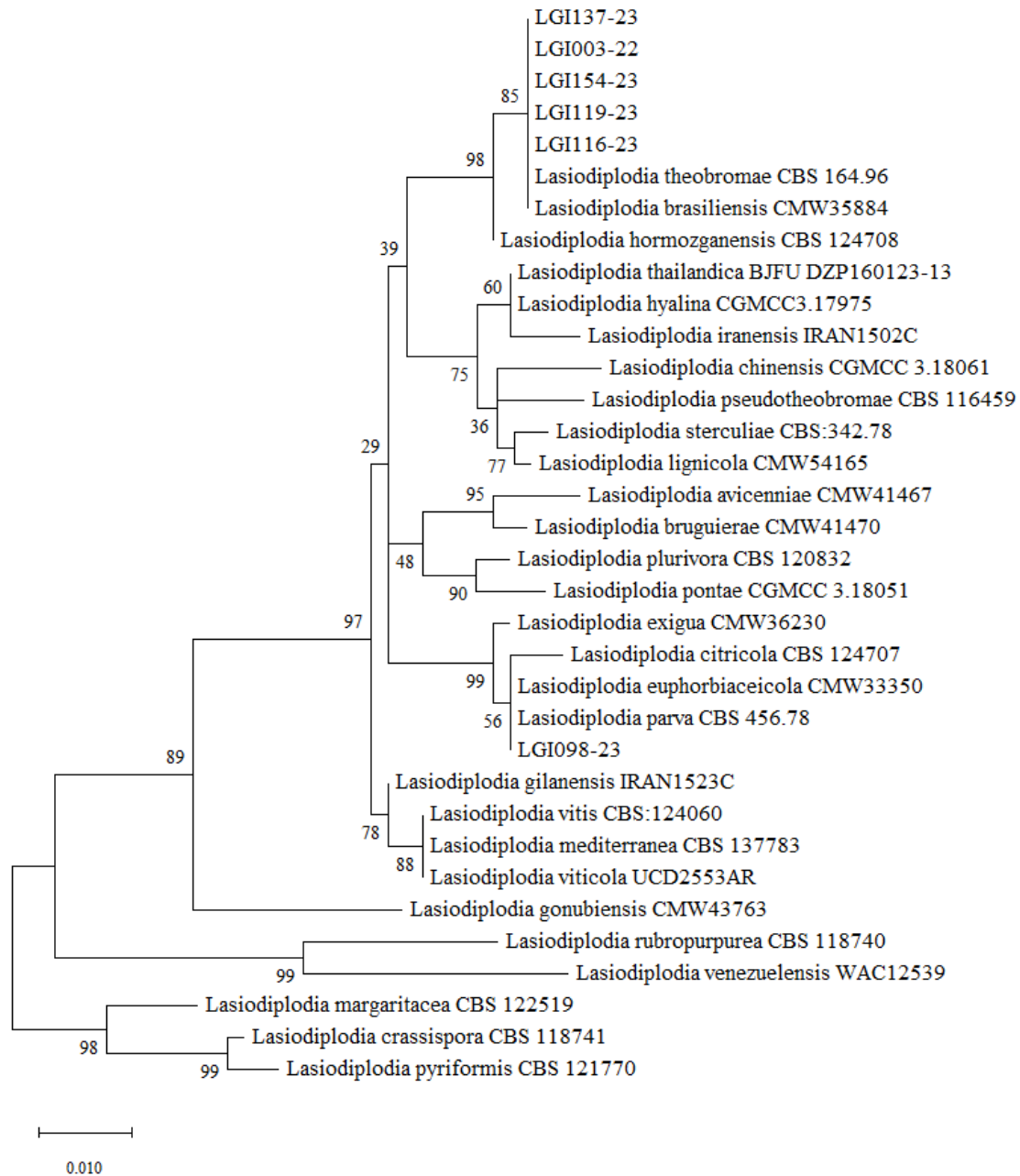
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 11: Árvore filogenética de *Lasiodiplodia*, gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança da região gênica TEF 1 – α , bootstrap 500. Árvore enraizada com *Lasiodiplodia gonubiensis* e *Lasiodiplodia rubropurpurea*. Isolados identificados como LGI.



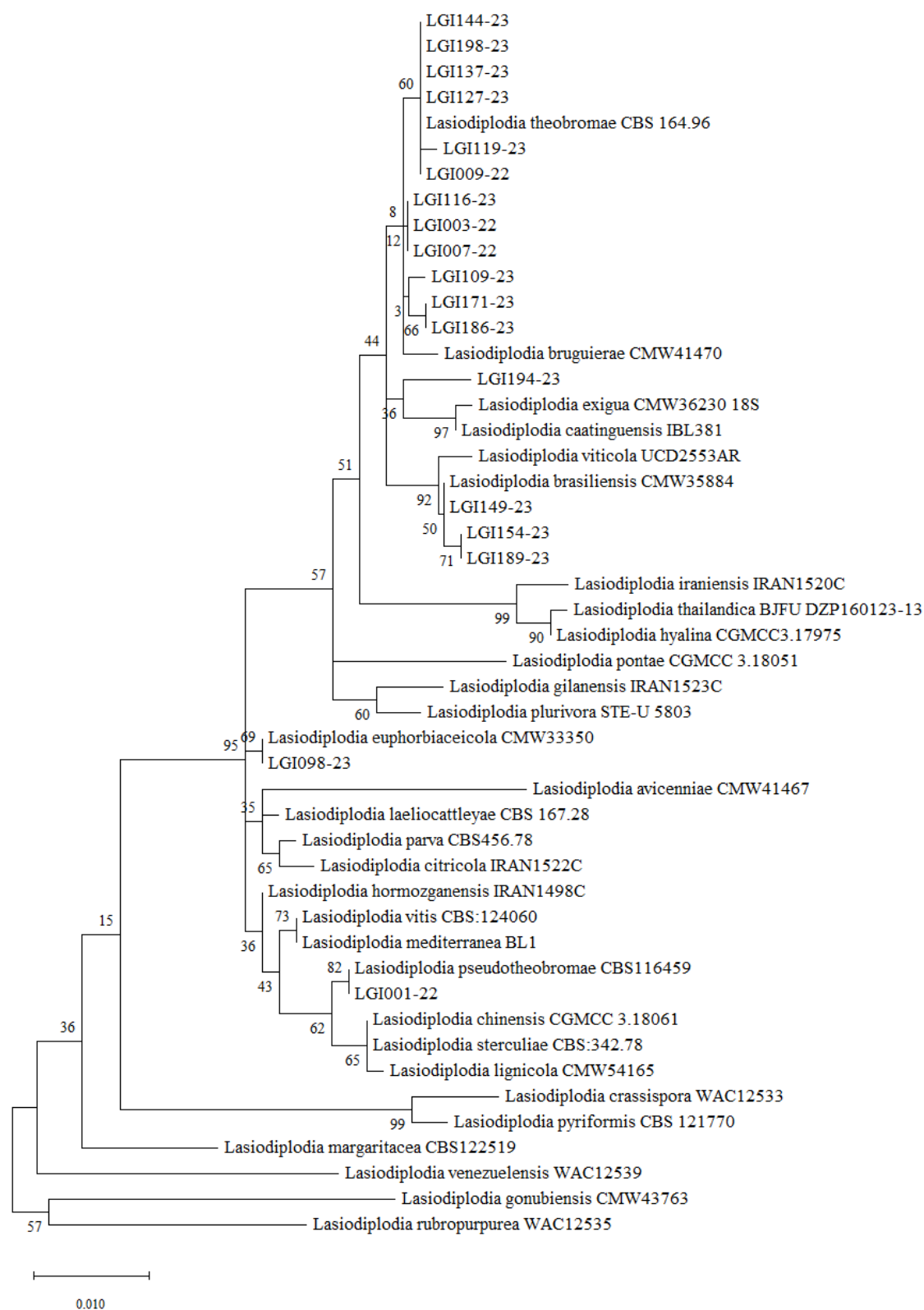
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 12: Árvore filogenética de *Lasiodiplodia*, gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança da região gênica rpb2, bootstrap 500. Árvore enraizada com *Lasiodiplodia crassispota* e *Lasiodiplodia pyriformis*. Isolados identificados como LGI.



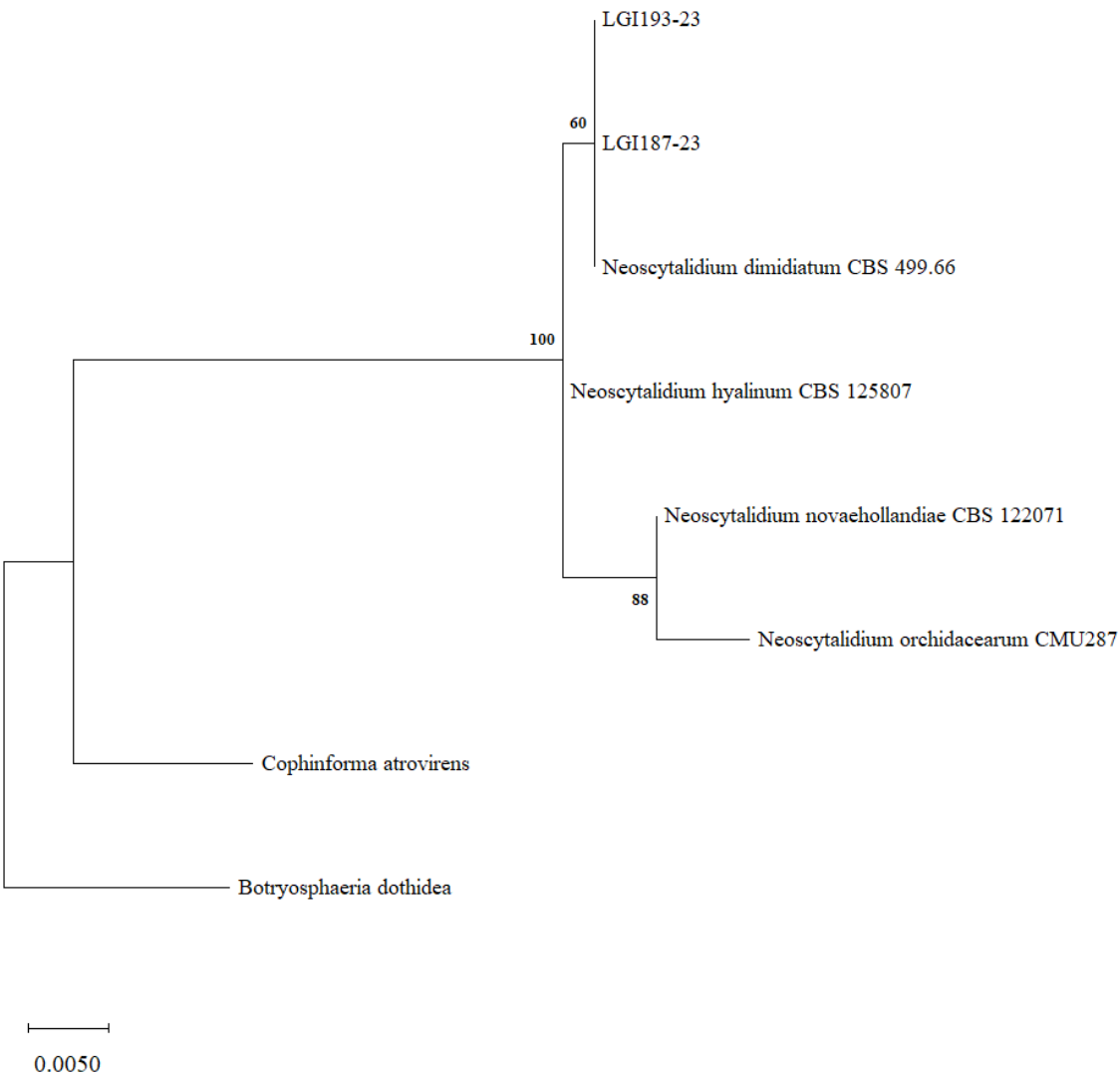
Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 13: Árvore filogenética de *Lasiodiplodia*, gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança das regiões combinadas ITS e TEF 1 – α , bootstratp 500. Árvore enraizada com *Lasiodiplodia gonubiensis* e *Lasiodiplodia rubropurpurea*.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

Figura 14: Árvore filogenética de *Neoscytalidium*, gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança da região gênica ITS, bootstratp 500. Árvore enraizada com *Botryosphaeria dothidea* e *Cophinforma atrovirens*.

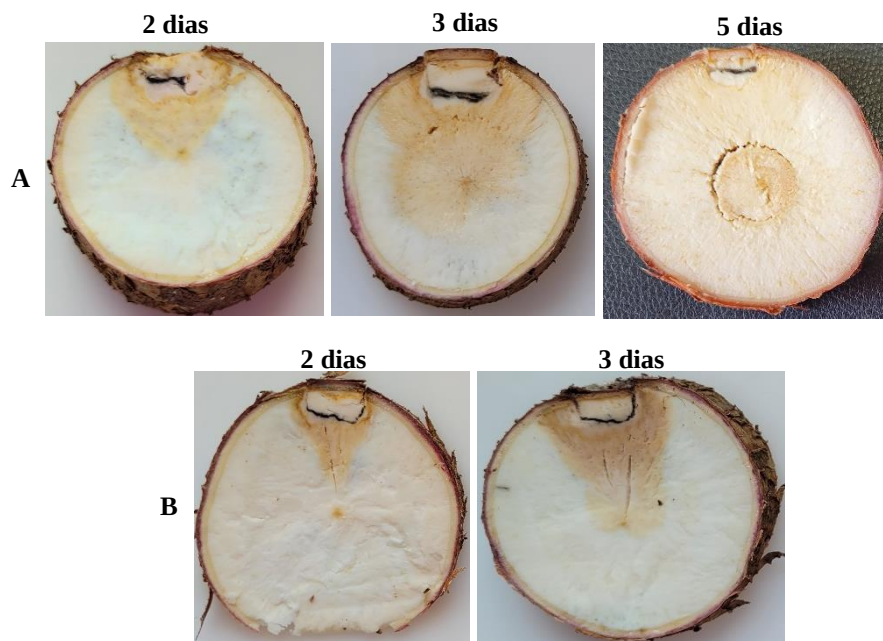


Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

4.4 Teste de patogenicidade

O teste de patogenicidade com os isolados identificados como *Lasioidiplodia* e *Neoscytalidium*, confirmou a patogenicidade em todas as espécies dos gêneros, em raízes de macaxeira. Entre 2 a 5 dias, as raízes mostraram sinais de lesões, com 5 dias as raízes já estavam quase que completamente cobertas com a lesão, isso demonstrou o rápido desenvolvimento do fungo, e foi possível fazer o reisolamento com a região de transição das lesões, concluindo o postulado de Koch (Figura 14). As lesões em dois e três dias foram lesões que não atingiam todo o diâmetro da polpa das raízes e permitia evitar as infecções de campo, para maior segurança na confirmação da patogenicidade dos isolados.

Figura 15: Teste de patogenicidade em raízes. (A) Isolados de *Lasioidiplodia* sp. com 2 a 5 dias de inoculação. (B) Isolados de *Neoscytalidium* com 2 e 3 dias de inoculação.



Fonte: Elaborado pelo próprio Autor.

5. DISCUSSÃO

Não há relatos sobre a diversidade fúngica encontrada em manivas-sementes, se tornando essencial a identificação, para assim direcionar trabalhos futuros de manejo em relação a um dos meios de propagação da cultura da mandioca. Foi demonstrado que a seleção somente pelo aspecto visual das manivas-sementes e a desinfecção superficial não é eficiente para eliminar os fungos patogênicos, podendo acarretar contaminações e disseminação no campo. E mesmo havendo uma riqueza de gêneros associados as manivas, neste estudo, os fungos frequentemente isolados foram patogênicos em todos os locais de coleta.

Com relação a diversidade fúngica associada a mandioca, em um levantamento realizado em cinco estados brasileiros, foram detectados os gêneros *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Neoscytalidium*, o complexo *Diaporthe/Phomopsis*, *Phytophthora* e *Corallomycetella* (VILAS BOAS et al., 2017), apesar de serem isolados de raízes, houve semelhanças no que foi detectado em manivas-sementes, neste trabalho, com exceção de *Phytophthora* e *Corallomycetella*, e além dos citados, também foram detectados *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Hyphopichia*, *Trichoderma* e *Clonostachys*.

Em outro estudo com a mandioca, foram detectados fungos endofíticos dos gêneros *Penicillium*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Guignardia*, *Acremonium*, *Colletotrichum*, e *Phoma*, em plantações cultivada no estado do Acre, Brasil, sendo o *Phomopsis* o mais frequente isolado do caule da mandioca (PEREIRA et al., 2022). *Phomopsis*, *Penicillium* e *Aspergillus* foram detectados nas manivas-sementes em quatro locais de coleta, confirmando a associação destes como já relatado em estudos anteriores.

O *Cladosporium*, apesar de poucos relatos, ele foi detectado como um dos agentes causais da mancha parda da mandioca, no Quênia, além de relatos como causador de manchas em outras plantas, como espinafre, nozes, pepino e pêssego (BENSCH et al., 2012; NG'ANG'A et al., 2019).

O fungo *Trichoderma* é muito utilizado como controle biológico de doenças causadas por fitopatógenos, já foram relatados sua ação efetiva em controles de *Fusarium*, *Rhizoctonia solani* e *Aspergillus niger*. (SHAH et al., 2020; CHEN et al., 2021; EL-KAZZAZ et al., 2022) Na cultura da mandioca foi relatado a ação do *Trichoderma* contra a podridão radicular causada por *Fusarium solani* no estado do Pernambuco, Brasil (SILVA et al., 2016). Foi também detectado um papel fundamental no biocontrole contra *Lasiodiplodia theobromae* causando

podridões em algumas culturas como macadâmia, manga, abacate e citrus (WANJIKU et al., 2021; LI et al., 2022; KHUONG et al., 2023; ZHAN et al., 2023).

O gênero *Clonostachys*, foi detectado em cinco locais, o terceiro mais frequente, há poucos relatos quanto a sua associação a mandioca, com exceção da espécie *Clonostachys chloroleuca*, relatado pela primeira vez como suposto agente causal da podridão da raiz da mandioca na província subtropical de Misiones, na Argentina, isolados de raízes de mandioca em armazenamento, se confirmou se tratar desta espécie, a partir de análises moleculares das regiões ITS e TEF 1 – α , além do primeiro relato, de *C. chloroleuca* como causador da murcha do grão de bico no México (COTA-BARRERAS et al., 2022; MADRASSI et al., 2023).

O gênero *Fusarium*, o segundo isolado mais frequente neste estudo, já era esperado sua detecção devido a sua associação a mandioca, frequentemente relatado como um dos causadores de podridões radiculares, mais específico a podridão seca. O complexo de espécies *Fusarium solani* e o complexo de espécies *F. oxysporum* foram os mais prevalentes, seguidos de espécies dos complexos *F. incarnatum-equiseti*, *F. chlamydosporum*, *F. graminearum*, e *F. fujikuroi* causando podridões radiculares em mandioca no Brasil (VILAS BOAS et al., 2017). Na mandioca, é constantemente associado as podridões, com perdas elevadas a um equivalente de 15 a 20% do rendimento da cultura, em Camarões 30% das raízes podres estavam infectadas por *Fusarium* (BANDYOPADHYAY et al., 2006). Espécies do gênero *Fusarium*, são considerados patógenos de plantas, podendo causar podridões de raízes, caule, frutos e murcha vascular em importantes culturas (NGANJE et al., 2004; XIA et al., 2020).

O gênero frequentemente isolado foi o *Lasiodiplodia*, em estudos realizados no Brasil, com manivas já doentes, relatado como podridão seca das manivas, foram identificados fungos da família Botryosphaeriaceae, principalmente espécies do gênero *Lasiodiplodia*, nove espécies foram encontradas causando a doença, *Lasiodiplodia euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. parva*, *L. theobromae*, *L. brasiliense*, *L. caatinguensis*, *L. iraniensis*, *L. laeliocattleyae* e *L. pseudotheobromae*, além do gênero *Neoscytalidium*, uma única espécie *Neoscytalidium dimidiatum*, citado como menor frequência nas manivas (BRITO et al., 2020).

Lasiodiplodia e *Neoscytalidium* já foram relatados anteriormente como fungos patogênicos em culturas da mandioca, no Brasil, como causadores da podridão negra em raízes (VILAS BOAS et al., 2017). Também já foram encontrados na Tailândia, causadores da doença da podridão negra do caule e da raiz em mandioca, as espécies fúngicas *Lasiodiplodia theobromae*, *L. euphorbiaceicola* e *Neoscytalidium dimidiatum* (SANGPUEAK et al., 2023). Neste estudo foram detectados ocorrências semelhantes, em que o gênero *Lasiodiplodia* foi o

mais frequentemente isolado em manivas-sementes, bem como o *Neoscytalidium dimidiatum*, com menor frequência. Espécies do gênero *Lasiodiplodia* já foram detectados como causadores de doenças não somente em mandioca, mas também como causadores de morte, cancro, apodrecimento em diversos hospedeiros, como citrus, cacau, manga, coco entre outros. (ROSADO et al., 2016; MUNIRAH et al., 2017; BERRAF-TEBBAL et al., 2020; HUDA-SHAKIRAH et al., 2022).

Para a identificação das espécies de *Lasiodiplodia* é necessária uma análise molecular com regiões específicas, como ITS, TEF 1 – α e RNA polimesare II (rpb2) para assim concluir qual a espécie detectada nas manivas. No estudo da região ITS, comparado com as sequências depositadas no GenBank, não foi possível identificar a maioria dos nossos isolados, por meio da análise evolutiva de Máxima Verossimilhança, uma boa parte das espécies não se distinguiram entre si, demonstrando que a utilização da região ITS é inadequado na identificação de espécies deste gênero. Com base no conjunto de dados da região ITS, ficou aparentemente uma ineficiência para espécies de *Lasiodiplodia* isolados de manivas e raízes com podridão na Tailândia, demonstrando todos os isolados como *Lasiodiplodia theobromae*, da mesma forma em estudos com baobás na África, em que a região ITS demonstrou que *L. theobromae* era idêntico a *L. laeliocattleyae*, *L. brasiliensis*, *L. hormozganensis* (CRUYWAGEN et al., 2016; SANGPUEAK et al., 2023), resultados estes semelhantes com o nosso estudo. Entretanto, somente foi possível a diferenciação do nosso isolado com *L. brasiliense*, quando associado ITS + TEF; além do que no nosso estudo houve dois isolados que tiveram sequencias diferentes pelo ITS, LGI 098-23 e LGI 119-23, aproximando-os de outras duas espécies não associadas a mandioca, mas não acontecendo isso com o TEF, podendo ser indicativo de uma espécie, pelo qual é importante a manutenção do ITS, já que as diferenças do TEF e do RPB2 não são correlacionadas, isto é, agrupam e diferenciam espécies que estão em clados diferentes.

Na análise da região TEF 1 – α , demonstrou que os resultados são mais confiáveis quando comparado com o ITS para a identificação das espécies, havendo uma maior distinção dentro do gênero e concluindo as espécies *L. theobromae*, *L. euphorbiaceicola* e *L. pseudotheobromae* dentre os nossos isolados. As análises de TEF 1 – α já foram relatadas como eficientes e mais confiáveis quando comparadas com ITS para a determinação e filogenia de espécies de *Lasiodiplodia* (ROSADO et al., 2016; BERRAF-TEBBAL et al., 2020). Ainda assim, para algumas espécies não foi possível a distinção, como exemplo, *L. viticola* e *L. brasiliensis*, que se agrupou com um dos nossos isolados, não ficando claro sua identificação,

semelhante aos resultados de Cruywagen e colaboradores (2016), que além destes também não distinguiu entre *L. iraniensis* e *L. jatrofola*. Entretanto, com o uso concomitante de ITS e TEF 1 – α , consegue se diferenciar *L. brasiliensis*, como discutido anteriormente.

Para a região rpb2, apesar de não ter sequenciado todos os nossos isolados, se mostrou ineficaz na distinção entre *L. theobromae* e *L. brasiliensis*, e *L. parva*, *L. euphorbiaceicola* e *L. citricola*, resultados estes semelhantes com Cruywagen e colaboradores (2016). E segundo as análises com *Lasiodiplodia*, isolados de cacau na Malásia, foi inferido que a filogenia de gene único para ITS, tub2 e rpb2 são incapazes de resolver a identificação para espécies de *Lasiodiplodia* (HUDA-SHAKIRAH et al., 2022).

Da combinação de ITS com TEF 1 – α , foi possível concluir a identificação de quatro espécies, *Lasiodiplodia theobromae*, *L. brasiliensis*, *L. euphorbiaceicola* e *L. pseudotheobromae*. As análises com um único gene não se mostram eficaz para distinguir espécies de *Lasiodiplodia*, sendo necessário um estudo filogenético baseado em multigene para fornecer uma identificação confiável (CRUYWAGEN et al., 2016; HUDA-SHAKIRAH et al., 2022).

Lasiodiplodia theobromae, *L. brasiliensis*, *L. euphorbiaceicola* e *L. pseudotheobromae* já foram detectadas em podridões de manivas e raízes de mandioca em estudos no Brasil e Tailândia (VILAS BOAS et al., 2017; BRITO et al., 2020; SANGPUEAK et al., 2023), entretanto, é a primeira vez da sua associação de manivas com aspecto sadio na região oeste do Pará e confirmando a associação frequente deste gênero com a cultura.

O teste de patogenicidade mostrou que todos os isolados de *Lasiodiplodia* e também os dois únicos isolados de *Neoscytalidium*, foram capazes de causar podridão em raízes de macaxeira, bem como a comprovação com o reisolamento fechando assim o postulado de Koch. Espécies de *Lasiodiplodia* são agressivas em raízes de forma rápida, chegando a iniciar lesões com apenas 2 dias, e completamente cobertas com a lesão em 5 dias de experimento. Em testes de patogenicidade com espécies de *Lasiodiplodia* isolados de mandioca, baobás, citrus, cacau e manga, se confirmou a patogenicidade, comprovando este fungo como um patógeno em diversas culturas. (CRUYWAGEN et al., 2016; MUNIRAH et al., 2017; BERRAF-TEBBAL et al., 2020; BRITO et al., 2020; HUDA-SHAKIRAH et al., 2022; SANGPUEAK et al., 2023).

As informações deste trabalho são importantes para detectar a comunidade fúngica presente em manivas-semente de mandioca, e assim analisar o que está sendo levado para o campo em culturas de mandioca, é essencial a seleção de material propagativo de boa qualidade e a partir desses resultados buscar melhorias no manejo e controle de fitopatogênicos. Além de

técnicas de micropropagação, não somente para limpeza de vírus ou bactérias, mas também de fungos fitopatogênicos, principalmente os associados a podridões de raízes que estão limitando a produção de mandioca, não somente na região oeste do Pará.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi relatado pela primeira vez a diversidade fúngica encontrada nas manivas-sementes de mandioca, como forma de detectar o que há nos caules com aspecto sadio como infecção latente ou endofítica, e sendo disseminado no campo.

Foram detectados 10 gêneros em manivas-sementes, *Lasiodiplodia*, *Fusarium*, *Neoscytalidium*, *Clonostachys*, *Diaporthe/Phomopsis*, *Cladosporium*, *Hyphopichia*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*, destes gêneros, *Hyphopichia* foi relatado pela primeira vez associado a mandioca, na região Oeste do Pará.

Dentre os fungos da família Botryosphaeriaceae, foram isoladas espécies dos gêneros *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium*, se confirmando o que era esperado, baseado na literatura, principalmente no que se refere a alta frequência de *Lasiodiplodia* em relação a *Neoscytalidium* em caules de mandioca.

Na identificação filogenética de espécies de *Lasiodiplodia*, foi verificado a ineficiência de análise de um único gene, principalmente o ITS, não diferenciando as espécies entre si, sendo essencial uma análise completa em conjunto com mais de um gene.

Análises da região TEF 1 – α teve maior capacidade de distinção de espécies de *Lasiodiplodia*, facilitando a detecção molecular das espécies encontradas.

A partir do consenso entre ITS e TEF 1 – α , foi possível identificar quatro espécies fúngicas associadas as manivas-semente, como *Lasiodiplodia theobromae*, *L. brasiliensis*, *L. euphorbiaceicola* e *L. pseudotheobromae*, e quatro outros táxons precisam ser definidos com outros genes para uma identificação molecular mais precisa. E também foi identificado a espécie *Neoscytalidium dimiditum*, a partir da região ITS.

No teste de patogenicidade realizado com os isolados de *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium*, todos se mostraram capazes de causar lesões em raízes de macaxeira, considerados fungos patogênicos, e assim obter melhorias no material de propagação da cultura.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A. S. Mandioca para farinha: aspectos históricos, etimológicos e morfoanatômicos. **Embrapa Amazônia Oriental**. Belém. 1. ed. 2008.
- ALLEM, A. C. The origins and taxonomy of cassava. In: Hillocks, R. J., Tresh, J. M., Bellotti, A. C. (Eds.), *Cassava: Biology, Production and Utilization*. **CABI Publishing** Oxon, UK and New York, USA, p. 1-16. 2002.
- ALMEIDA, C. O. et al. Estudo prospectivo - produção de mandioca no Brasil: o desafio do incremento de produtividade com preservação de solos. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Bahia. 1. ed. ISSN 1809-4996 Documentos 224. 2018.
- ALVES, R. N. B. et al. Podridões em raízes de mandioca: problemas e soluções para o seu controle. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos** (INFOTECA-E), 2020.
- ALVES, R. N. B.; JUNIOR, M. S. M. Potencialidades da cultura da mandioca no estado do Pará. **Embrapa Amazônia Oriental**. Belém, PA. 2022.
- BAKHSHIZADEH, M. et al. First report of rhinosinusitis caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Iran. **J Med Microbiol** 63:1017–1019. 2014.
- BANDYOPADHYAY, R. et al. *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. **The American Phytopathological Society**. v. 96, n. 6, 2006.
- BARNETT, H. L., e HUNTER, B. Illustrated genera of imperfect fungi. **American Phytopathological Society** (APS Press), 1998.
- BENSCH, K. et al. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology** 72: 1–401. 2012.
- BERRAF-TEBBAL, A. et al. *Lasiodiplodia mitidjana* sp. nov. and other Botryosphaeriaceae species causing branch canker and dieback of *Citrus sinensis* in Algeria. **Plos One** 15(5). 2020.
- BRITO, A. C. Q. et al. Diversity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with black root rot and stem cutting dry rot in *Manihot esculenta* in Brazil. **Eur J Plant Pathol**. 2020.
- CALVERT, L.A.; THRESH, J.M. The viruses and virus diseases of cassava. In: A.C. Bellotti, R.J. Hillocks and J.M. Thresh (Eds.), *Cassava: Biology, Production and Utilization*, **CABI**, Wallingford, UK, 332 pp. 2002.
- CALVERT, L. A. et al. Identification of three strains of a virus associated with cassava plants affected by disease. **Journal Phytopathology**. v. 156, p. 647-673. CIAT, Berlin, 2008.
- CARVALHO, J. E. B. et al. Fileira dupla em mandioca – Tecnologia de cultivo conservadora de solo. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Bahia. 1 ed. ISSN 1809-5011 Circular técnica 132. 2022.

CARVALHO, P. C. L. Classificação botânica. In: Mattos, P. L. P., Farias, A. R. N., Filho, J. R. F. (org.). Mandioca: o produtor pergunta, a Embrapa responde. **Embrapa Informação Tecnológica**. Brasília. 1. ed. p. 16 – 23, 2006.

CHEN, J. et al. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* in rhizosphere of *Radix pseudostellariae* triggers the expression of host defense genes and improves its growth under long-term monoculture system. **Front. Microbiol.** 12, 579920, 2021

CHUANG, M. F. et al. First report of stem canker disease of pitaya (*Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. **Plant Dis** 96(6):906. 2012.

CORREIA, K. C. et al. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. **Plant Pathology**, Londres, v. 65, n.1, p.92–103. Janeiro 2016.

COSTA, V. S. O. et al. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 127, n. 4, p. 509–519, 2010.

COTA-BARRERAS, C.I. et al. First report of *Clonostachys chloroleuca* causing chickpea wilt in Mexico. **New Disease Reports**, 46, e12123, 2022.

CRUYWAGEN, E. M. et al. Phylogenetic species recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: a case study on species from baobabs. **Fungal Biology**, Manchester, v. 121, n. 4, p. 420-436, 2017.

CUNHA, E. F. M.; NETO, J. T. F. Melhoramento genético da mandioca para o estado do Pará. In: Modesto Júnior, M. S.; Alves, R. N. B. (org.). Cultura da mandioca: aspectos socioeconômicos, melhoramento genético, sistemas de cultivo, manejo de pragas e doenças e agroindústria. **Embrapa**. Brasília. p.70 – 71, 2016.

CURSI, I. B. et al. Onicomiose por *Scytalidium* spp.: estudo clínico epidemiológico em um hospital universitário do Rio de Janeiro, Brasil. **An Bras Dermatol.** 86 (4): 689-93, 2011.

DISSANAYAKE, A. J. et al. Occurrence and Morpho-Molecular Identification of Botryosphaeriales Species from Guizhou Province, China. **J. Fungi**, 7, 893. 2021.

EL-KAZZAZ, M. K. et al. Suppression of pepper root rot and wilt diseases caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. **Life** 12, 587, 2022.

EL-SHARKAWY, M. A. Global warming: causes and impacts on agro-ecosystems productivity and food security with emphasis on cassava comparative advantage in the tropics/subtropics. **Photosynthetica** 52, 161–178. 2014.

FÉLIX, R. J. S. et al. Desenvolvimento vegetativo de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivada com diferentes comprimentos de manivas-semente. **Essentia**, v. 21, n. 1, p. 68-74, 2020.

FERNÁNDEZ-HERRERA et al. *Neoscytalidium dimidiatum*: causal agent of dieback in *Ficus benjamina* L. in Mexico. **Revista Chapingo**. vol. XXIII, n. 3, 2017.

FILHO, W. P.; SILVEIRA, G. S. R. Cultura da mandioca (*Manihot esculenta* subsp *esculenta*). **Ficha técnica EMATER** – MG, 2012.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAOSTAT database - Crops and livestock products. Brasil, 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em 07 de janeiro de 2023.

FUKUDA, W. M. G.; CARVALHO, H. W. L. Propagação Rápida de Mandioca no Nordeste Brasileiro. Circular técnico, **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, Aracaju, 2006.

GARCIA, J. F. et al. Phylogenomics of Plant-Associated Botryosphaeriaceae Species. **Frontiers in Microbiology**. 12:652802. 2021.

HILLOCKS, R. J.; WYDRA, K. Bacterial, Fungal and Nematode Diseases. In: A.C. Bellotti, R.J. Hillocks and J.M. Thresh (Eds.), Cassava: Biology, Production and Utilization, **CABI**, Wallingford, UK, 332 pp. 2002.

HOHENFELD, C. S. et al. Modelling growth characteristics and aggressiveness of *Neoscytalidium hyalinum* and *Fusarium solani* associated with black and dry root rot diseases on cassava. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 5, p. 422-432, 2018.

HRYCAN, J. et al. Grapevine trunk disease fungi: their roles as latent pathogens and stress factors that favour disease development and symptom expression. **Phytopathologia Mediterranea**. 59, 395–424. 2020.

HUDA-SHAKIRAH, A. R. et al. *Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. **Scientific Reports** 12:8966. 2022.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Sistema IBGE de recuperação automática - SIDRA. Levantamento sistemático da produção agrícola. Ano de 2022. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588>. Acesso em 30 de janeiro de 2024.

JACOBS, K. et al. *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. **Mycological Research**, Amsterdã, v.108, p.411–418, Abril 2004.

KHUONG, N. Q. et al. Using *Trichoderma asperellum* to antagonize *Lasiodiplodia theobromae* causing stem-end rot disease on Pomelo (*Citrus maxima*). **J. Fungi** 9, 981, 2023.

LI, X. et al. Efficacy of the biocontrol agent *Trichoderma hamatum* against *Lasiodiplodia theobromae* on macadamia. **Front. Microbiol.** 13, 994422, 2022.

LIN, C. H. et al. First report of *Dioscorea esculenta* dieback caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in China. **Plant Dis** 101(7):1320. 2017.

LINS, S. R. O.; ALVES, E.; OLIVEIRA, S. M. A. Estudos da interação *Lasiodiplodia theobromae* x mangueira e caracterização morfológica de isolados do patógeno. **Acta Microscopica**, Oxford, v. 19, p. 221–231, 2010.

- LUO, Y. et al. Understanding the process of latente infection of canker-causing pathogens in stone fruit and nut crops in California. **Plant Dis.** 103, 2374–2384. 2019.
- MACHADO, A. R. et al. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.39, n.6, p.464–470. Dezembro 2014a.
- MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, Alemanha, v.67, n.1, p.231–247, julho 2014b.
- MADRASSI, L. M. et al. *Clonostachys chloroleuca*: a novel pathogen causing cassava root rot disease in Misiones Province, Argentina. **New Dis Rep.** 48:e12229, 2023.
- MADRIDA, H. et al. Genotyping and in vitro antifungal susceptibility of *Neoscytalidium dimidiatum* isolates from different origins. **Int J Antimicrob Agents.** 34:351–4. 2009.
- MARQUES, M. W. et al. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, Alemanha, v.61, n. 1, p.181–193, julho 2013a.
- MARQUES, M. W. et al. Botryosphaeria, Neofusicoccum, Neoscytalidium and Pseudofusicoccum species associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, Alemanha, v.61, n.1, p.195–208, julho 2013b.
- MARQUES, M. W. et al. First report of mango dieback caused by *Pseudofusicoccum stromaticum* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 1, p. 144–145, 2012.
- MASSOLA Jr, N. S.; BEDENDO, I. P. Doenças da Mandioca. In. KIMATI, et al. Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, V.2. 663p. 2005.
- MASSOLA, Jr., N. S.; BEDENDO, I. P.; OLIVEIRA, S. A. S. Doenças da mandioca. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Filho, A. B.; Camargo, L. E. A. (org.). Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas. 5. ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, p.515–522. 2016.
- MATTOS, P. L. P. Processamento e utilização. In: Mattos, P. L. P.; Farias, A. R. N.; Filho, J. R. F. (org.). Mandioca: o produtor pergunta, a Embrapa responde. **Embrapa Informação Tecnológica**. Brasília. 1. ed. p. 160 -168. 2006.
- MATTOS, P. L. P.; CARDOSO, E. M. R. Cultivo da Mandioca para o Estado do Pará. **Embrapa Mandioca e Fruticultura. Embrapa Amazônia Oriental**. Sistemas de Produção, 13. ISSN 1678-8796 Versão eletrônica, 2003.
- MAXMEN, A. How African scientists are improving cassava to help feed the world. **Nature**. v. 565, p. 144–146, 2019.
- MINNIS, A. M. et al. Phylogeny and taxonomic revision of the Planistromellaceae including its coelomycetous anamorphs: contributions towards a monograph of the genus *Kellermania*. **Persoonia** 29: 11–28, 2012.

MUNIRAH, M. S. et al. Characterization of *Lasiodyplodia theobromae* and *L. pseudotheobromae* causing fruit rot on pre-harvest mango in Malaysia. **Plant Pathology & Quarantine** 7(2), 202–213. 2017.

MUNIZ, M. F. S. et al. Caracterização de isolados de *Phytophthora drechsleri*, agente causal da podridão mole de raízes de mandioca. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 195-198, 2006.

NASS, L. L. et al. Recursos Genéticos & Melhoramento – Plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 1183p. 2001.

NASSAR, Nagib MA; HASHIMOTO, D. Y. C.; FERNANDES, S. D. C. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 1, p. 16-28, 2008.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine (2023). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=3983&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. Acesso em 16 de janeiro de 2023.

NG'ANG'A, P. W. et al. Identification and characterization of causative agents of brown leaf spot disease of cassava in Kenya. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**. 7(06):1-7, 2019.

NGANJE, W.E. et al. Regional economic impacts of *Fusarium* head blight in wheat and Barley. **Appl. Econ. Perspect. Policy** 26, 332–347, 2004.

NETTO, M. S. B. et al. Species of *Lasiodyplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, Alemanha, v.67, n.1, p.127–141. Julho 2014.

NOGUEIRA, E. M. C.; FERRARI, J. T.; LOUZEIRO, I. M. Ocorrência de *Lasiodyplodia theobromae* causando perdas severas de frutos em mangueira no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, p. 53, 2001.

NOTARO, K. A. et al. Prospecção de fitopatógenos associados a podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 6, 2013.

NURUL NADIAH, M. A. et al. First report of leaf blight on white spider lily caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Malaysia. **New Dis Rep** 35:16. 2017.

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, n.3, p.461-467, 2005.

PAVLIC, D. et al. Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and Other native trees in Western Australia. **Mycologia**. 100:851-66. 2008.

PEREIRA, V. M. et al. Community of cultivable endophytic fungi of cassava *Manihot esculenta* Crantz. **Revista Desafios**. v.09, n.1, 2022.

- PETRINI, O.; FISHER, P. J. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 91, 233–238. 1988.
- PHILLIPS, A. J. L. et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, Amsterdã, v.76, p.51– 67, Setembro 2013.
- PHILLIPS, A. J. L. et al. Families in Botryosphaeriales: a phylogenetic, morphological and evolutionary perspective. **Fungal Diversity** 94: 1–22, 2019.
- POLIZZI, G. et al. First report of shoot blight, canker, and gummosis caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on citrus in Italy. **Plant Dis** 93:1215. 2009.
- ROSADO, A. W. C. et al. Phylogeny, identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with Postharvest stem-end rot of coconut in Brazil. **Plant Disease** 100:561-568. 2016.
- SANAHUJA, G.; LOPEZ, P.; PALMATEER, A. J. First report of *Neoscytalidium dimidiatum* causing stem and fruit canker of *Hylocereus undatus* in Florida. **Plant Dis** 100(7):1499. 2016.
- SANGPUEAK, R. et al. Identification of cassava black stem and root rot agentes in Thailand. **Chilean Journal of Agricultural Research** 83(1). 2023.
- SANTOS, V. S. et al. Multiplicação rápida, método simples de baixo custo na produção de material propagativo de mandioca. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Bahia. 1. ed. ISSN 1809-5003 Boletim de pesquisa e desenvolvimento 44. 2009.
- SCHOCH, C. L. et al. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, 98 (6), pp. 1041-1052, 2006.
- SHAH, P. et al. Screening of *Trichoderma viride* as a bio-control agent against different soil-borne infectious and phytopathogenic fungi. **Int. J. Biol. Biotech.** 17, 405–410, 2020.
- SILVA, J. A. T. et al. *Trichoderma aureoviride* URM 5158 and *Trichoderma hamatum* URM 6656 are biocontrol agents that act against cassava root rot through different mechanisms. **Journal of Phytopathology**. 2016.
- SILVA, R. M. et al. Biologia Reprodutiva de Etnovariedades de Mandioca. **Scientia agricola**, v. 58, n.1, p.101-107, 2001.
- SLIPPERS, B. et al. Diversity in the Botryosphaeriales: Looking back, Looking forward. **Fungal Biology**, Manchester, v. 121, p. 307-231, 2017.
- SLIPPERS, B. et al. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriales: a systematic and evolutionary framework. **Studies in Mycology** 76: 31–49, 2013.
- SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology**. Rev. 21, 90–106. 2007.

TAVARES, S. C. C. H. Perigo ronda as frutas. **Cultivar - Hortalças e Frutas**, Pelotas, v. 4, n. 20, p. 18-23, 2003.

TAVARES, S. C. C. H.; MENEZES, M.; CHOUDHURY, M. M. Infecção da mangueira por *Botryodiplodia theobromae* Lat. na região Semi-Árida de Pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 13, n. 4, p. 163–166, 1991.

THEISSEN, F.; SYDOW, H. Vorentwürfe zu den Pseudosphaeriales. **Annales Mycologici** 16: 1–34. 1918.

VILAS BOAS, Sandielle Araújo et al. Sources of resistance to cassava root rot caused by *Fusarium* spp.: a genotypic approach. **Euphytica**, v. 209, n. 1, p. 237-251, 2016.

VILAS BOAS, S. A. et al. Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 74, n. 1, p. 60-67, 2017.

WANJIKU, E. K.; WACEKE, J. W.; MBAKA, J. N. Suppression of stem-end rot on avocado fruit using *Trichoderma* spp. in the central highlands of Kenya. **Adv. Agric.** 2021, 1–6, 2021.

WIKKE, S. et al. A phylogenetic re-evaluation of Phyllosticta (Botryosphaeriales). **Studies in Mycology** 76: 1–29, 2013.

WU, N. et al. <https://botryosphaeriales.org/>, an online platform for up-to-date classification and account of taxa of Botryosphaeriales. **Database**, 2021 (0) 1-9.

WYKA, S. A.; BRODERS, K. D. The new family Septorioideaceae, within the Botryosphaeriales and *Septorioides strobil* as a new species associated with needle defoliation of *Pinus strobus* in the United States. **Fungal Biology** 120: 1030–1040, 2016.

XIA, R. et al. Impact of the improvements in *Fusarium* head blight and agronomic management on economics of winter wheat. **World Mycotoxin J.** 1–18, 2020.

YANG, T. et al. Families, genera, and species of Botryosphaeriales. **Fungal Biology** 121: 322–346, 2017.

ZHAN, X. et al. Control of postharvest stem-end rot on mango by antifungal metabolites of *Trichoderma pinnatum* LS029-3. **Sci. Hortic.** 310, 111696, 2023.

ZHANG, W. et al. Evaluating species in Botryosphaeriales. **Persoonia**, 46: 63-115, 2021.