



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE ENGENHARIA E GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA
AMAZÔNIA**

FERNANDA CRISTINA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE DIAGNÓSTICOS MOLECULARES PARA OS
AGENTES ETIOLÓGICOS DAS PODRIDÕES DE RAÍZES DE MANDIOCA
NA REGIÃO DO OESTE DO PARÁ**

**SANTARÉM-PA
2022**

FERNANDA CRISTINA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE DIAGNÓSTICOS MOLECULARES
PARA OS AGENTES ETIOLÓGICOS DAS PODRIDÕES DE
RAÍZES DE MANDIOCA NA REGIÃO DO OESTE DO PARÁ**

Dissertação apresentado à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, junto ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia como requisito parcial de aprovação para obtenção do título de mestre na área de Ciências Ambientais na área de concentração em estudos e manejos de ecossistemas amazônicos.
Orientador: Dr. Carlos Ivan Aguilar-Vildoso

**SANTARÉM-PA
2022**

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

- S237d Santos, Fernanda Cristina dos
Desenvolvimento de diagnósticos moleculares para os agentes etiológicos das podridões de raízes de mandioca na região Oeste do Pará. / Fernanda Cristina dos Santos. – Santarém, 2022.
21 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 Recursos Naturais da Amazônia.
1. *Manihot esculenta*. 2. Diagnóstico molecular. 3. Etiologia. I. Aguilar - Vildoso, Carlos Ivan, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 633.682098115

FERNANDA CRISTINA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE DIAGNÓSTICOS MOLECULARES
PARA OS AGENTES ETIOLÓGICOS DAS PODRIDÕES DE
RAÍZES DE MANDIOCA NA REGIÃO DO OESTE DO PARÁ**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia como requisito para obtenção do título de mestre de Ciências Ambientais na área de concentração em estudos e manejos de ecossistemas amazônicos.

Conceito: Aprovado

Data de aprovação: 25/10/2022

Banca Examinadora



Dr. Carlos Ivan Aguilar-Vildoso - Orientador
Universidade Federal do Oeste do Pará



Dra. Alessandra Keiko Nakasone
Embrapa Amazônia Oriental



Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira
Embrapa Mandioca e Fruticultura



Dr. Wellington Luiz de Araújo
Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha família e amigos que me incentivaram de forma que fosse possível a concretização deste.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus.

A Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA

A minha família pelo apoio incondicional, mãe Sandra, minha irmã Thayná e meus avós Josefa e Genésio. Obrigada por sempre estarem disponíveis quando precisei e por toda ajuda necessária a realização deste trabalho e paciência.

Aos meus colegas de laboratório pela experiência, companhia e momentos passados lado a lado, mesmo em tempos conturbados não perdemos a esperança.

A professora Eliandra Sia por sempre aconselhar, estar presente e levantar a minha autoestima. A vocês eu só tenho a agradecer por tudo.

Ao meu orientador Carlos Ivan Aguilar Vildoso pelas palavras de experiência, orientação, estímulo, por ser um exemplo de profissional. Foi um dos meus professores que sempre acreditou em mim, obrigada pela confiança.

A todos os professores da UFOPA, a coordenação de pós-graduação que tornaram possível a conclusão desse título durante esses anos de dificuldades para todos em razão da pandemia.

Especial agradecimento à Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA) pela concessão de bolsa de pesquisa, sem esta não seria possível a conclusão deste trabalho.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

EPÍGRAFE

“Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então, com todo o coração, dedicar-se a ele.” (*Buda*)

RESUMO

As podridões radiculares são doenças causadas por um complexo de fungos e oomicetos, que na cultura da mandioca apresentam um efeito contínuo e significativo na produção e consequentemente danos socioeconômicos aos países produtores. Para o controle das doenças o diagnóstico correto do patógeno é essencial. Assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver uma ferramenta molecular para a diferenciação dos agentes causais das podridões radiculares de mandioca por ITS-RFLP dos principais agentes causais conhecidos no Brasil (*Neoscytalidium dimidiatum*, *Phytophthora melonis*, *Phytophthora* sp. e complexos *Fusarium solani* e *Lasiodiplodia theobromae*) digeridos por enzimas selecionadas in silico (EcoRI, BmgBI, HaeIII, SmaI e XhoI). Foi possível constatar a diferenciação dos fitopatógenos em dois grupos (ascomicetos e oomicetos), apenas pelo polimorfismo do tamanho do fragmento da região ITS. Além disso, foi possível diferenciar a podridão seca da podridão negra (*Neoscytalidium dimidiatum* e complexos *Fusarium solani* e *Lasiodiplodia theobromae*) com as enzimas HaeIII, SmaI e EcoRI, bem como dentro dos oomicetos diferenciar as espécies (*P. melonis*, *Phytophthora* sp.) através das enzimas BmgBI e XhoI. Portanto, o ITS-RFLP pode ser uma nova ferramenta molecular para o diagnóstico rápido e eficiente dos agentes causais das podridões de raízes de mandioca nas principais regiões produtoras.

Palavras-chave: *Manihot esculenta*. Diagnóstico molecular. Etiologia. Diversidade.

ABSTRACT

Root rots are diseases caused by a complex of fungi and oomycetes, which in cassava have a continuous and significant impact on production and consequently cause socioeconomic damage to producing countries. For disease control, the correct diagnosis of the pathogen is essential. Thus, the objective of this work was to develop a molecular tool to differentiate the causal agents of cassava root rots through the ITS-RFLP of the main causal agents known in Brazil (, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Phytophthora melonis*, *Phytophthora* sp., complexes *Fusarium solani* and *Lasiodiplodia theobromae*) digested by selected enzymes in silico (EcoRI, BmgBI, HaeIII, SmaI and XhoI). It was possible to verify the differentiation of the phytopathogens in two groups (ascomycetes and oomycetes), only by the polymorphism of the fragment size of the ITS region. Furthermore, it was possible to differentiate dry rot from black rot (*Neoscytalidium dimidiatum*, complexes *Fusarium solani*, e *Lasiodiplodia theobromae*) using the enzymes HaeIII, SmaI and EcoRI, as well as, within the oomycetes, to differentiate the species (*P. melonis*, *Phytophthora* sp.) through the enzymes BmgBI and XhoI. Therefore, the ITS-RFLP can be a new molecular tool for the rapid and efficient diagnosis of the causal agents of cassava root rot in the main producing regions.

Keywords: *Manihot esculenta*. Molecular diagnosis. Etiology. Diversity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Aspectos cultural de diferentes isolados fúngicos, agentes causais de podridões de raiz de mandioca. (a) complexo *L. theobromae*-BDA; (b) *N. dimidiatum*-BDA; (c) complexo *F. solani*-BDA; (d) *P. melonis*-CA; (e) *Phytophthium* sp.-CA..... 14

Figura 2 Gel dos amplicons esperados da região ITS e com clivagem pelas enzimas de restrição dos agentes causais das podridões de raízes de mandioca. Representação: (a) restrição BmgBI (AjiI); (b) restrição EcoRI (c) restrição SmaI. PM= pb peso molecular 17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Informações dos isolados fúngicos quanto à espécie, local de origem no Estado do Pará-Brasil, tipo de podridão associada às raízes de mandioca, códigos na coleção e das sequencias no GenBank 14

Tabela 2 Enzimas de restrição com clivagem única na região ITS das espécies associadas às podridões radiculares..... 16

Tabela 3 Relação espécies associadas às podridões radiculares com as clivagens esperadas da região ITS pelas enzimas de restrição.....17

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
MATERIAIS E MÉTODOS	14
Material biológico	14
Extração de DNA e Amplificação PCR	15
Sequenciamento	15
ITS-RFLP in silico	16
ITS-RFLP para Validação	16
RESULTADOS	16
Análises in silico	16
Validação em gel	17
DISCUSSÃO	18
REFERÊNCIAS	19

1 Artigo

2 **¹Diferenciação de espécies associadas às podridões de raízes de mandioca por ITS-RFLP**

3 **Fernanda C. dos Santos • Bruno Froes Campos • Leandro Silva de Sousa • Carlos Ivan Aguilar-Vildoso**

4 F. C. Santos • B. F. Campos • L. S. Sousa
5 Universidade Federal do Oeste do Pará,
6 Santarém, CEP 68040-255, Brasil
7 e-mail: nanda.soda@gmail.com

8
9 C.I. Aguilar-Vildoso
10 Instituto de Biodiversidade e Florestas
11 Universidade Federal do Oeste do Pará,
12 Santarém, CEP 68040-255, Brasil
13 e-mail: vildoso@hotmail.com

14 **RESUMO:** As podridões radiculares são doenças causadas por um complexo de fungos e oomicetos, que na cultura da
15 mandioca apresentam um efeito contínuo e significativo na produção e consequentemente danos socioeconômicos aos
16 países produtores. Para o controle das doenças o diagnóstico correto do patógeno é essencial. Assim, o objetivo desse
17 trabalho foi desenvolver uma ferramenta molecular para a diferenciação dos agentes causais das podridões radiculares
18 de mandioca por ITS-RFLP dos principais agentes causais conhecidos no Brasil (*Neoscytalidium dimidiatum*,
19 *Phytophthora melonis*, *Phytophthora* sp. e complexos *Fusarium solani* e *Lasiodiplodia theobromae*) digeridos por
20 enzimas selecionadas in silico (EcoRI, BmgBI, HaeIII, SmaI e XhoI). Foi possível constatar a diferenciação dos
21 fitopatógenos em dois grupos (ascomicetos e oomicetos), apenas pelo polimorfismo do tamanho do fragmento da região
22 ITS. Além disso, foi possível diferenciar a podridão seca (complexo *Fusarium solani*) da podridão negra
23 (*Neoscytalidium dimidiatum* e complexo *Lasiodiplodia theobromae*) com as enzimas HaeIII, SmaI e EcoRI, bem como
24 dentro dos oomicetos diferenciar as espécies (*P. melonis*, *Phytophthora* sp.) através das enzimas BmgBI e XhoI.
25 Portanto, o ITS-RFLP pode ser uma nova ferramenta molecular para o diagnóstico rápido e eficiente dos agentes causais
26 das podridões de raízes de mandioca nas principais regiões produtoras.

27 **Palavra-chave:** *Manihot esculenta*; Diagnóstico molecular; Etiologia; Diversidade.

28 **INTRODUÇÃO**

29 No mundo, o agronegócio é responsável pela maior parte do suprimento de alimentos, enquanto as pequenas
30 propriedades protegem a biodiversidade, com bons rendimentos e menor agressão ao meio ambiente (Ricciardi et al.,
31 2021). A mandiocultura fornece segurança alimentar por oferecer alimentos e renda para 800 milhões de pessoas pelo
32 mundo (Maxmen, 2019), entretanto, sofre oscilações de produção devido problemas ambientais (secas e alagamentos),
33 sociais (êxodo rural, mão de obra e preço) e fitossanitários (pragas e doenças), principalmente na agricultura familiar.
34 Entre as doenças podemos destacar os mosaicos, a bacteriose (Abdulai et al., 2018) e as podridões radiculares. A exata
35 etiologia das doenças é de grande importância para um adequado direcionamento do manejo e do melhoramento das
36 culturas (Boas et al., 2017).

37 O centro de origem de muitas espécies do gênero *Manihot* ocorreu em diferentes biomas do Brasil, esperando-
38 se uma coevolução patógeno-hospedeiro, que pode ter reflexo sobre a mandiocultura atual (Duputié et al., 2011; Olsen
39 & Schaal, 2001). Entre as doenças que podem acometer a essa cultura e diminuir a produção, as podridões radiculares
40 (podridão seca, podridão mole e podridão negra) podem chegar a aproximadamente 80% em perdas (Boas et al., 2017;
41 Machado et al., 2014). Estudos sobre as podridões radiculares em mandioca (*Manihot esculenta*) foram realizados em
42 diferentes regiões no Brasil e diversos fungos fitopatógenos foram considerados causadores da doença, alguns até em
43 complexos de espécies (Machado et al., 2018).

44 Os agentes causais das podridões radiculares são variados, algumas das mais recorrentes espécies apontadas
45 encontrados no grupo dos oomicetos (*Phytophthora* e *Phytophthora*) e ascomicetos (*Neoscytalidium*, *Lasiodiplodia* e

¹ O artigo apresentado foi redigido conforme as diretrizes de submissão da revista European Journal of Plant Pathology. As normas indicadas para a redação de artigos pela revista estão disponíveis no link: <https://www.springer.com/journal/10658/submission-guidelines>.

46 *Fusarium*) (Aigbe & Remison, 2010; Bandyopadhyay et al., 2006; Boari et al., 2018; Boas, 2016; Notaro et al., 2013).
47 Mais de 20 fitopatógenos já foram descritos na literatura, dentre eles estão os gêneros *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*,
48 *Phytopyhtium*, *Neoscytalidium*, *Lasiodiplodia*, *Rosellinia*, *Corallomycetella*, *Diaporthe* e *Sclerotium* (Boas et al., 2017;
49 Bua & Okello, 2011; Machado, Pinho, de Oliveira, et al., 2014; Zinsou et al., 2017).

50 As podridões radiculares de forma geral apresentam visualmente na parte aérea sintomas semelhantes, como
51 murcha, amarelecimento, queda das folhas, morte de ponteiros e morte das plantas. A diferenciação ocorre no aspecto
52 nas raízes, no caso da podridão mole as raízes e os tecidos afetados tornam-se moles, com exsudação de um líquido com
53 mal odor característico, a podridão seca apresenta lesões marrom-escuros nas raízes, sem cheiro característico e tecidos
54 relativamente firmes, já a podridão negra é caracterizada por apresentar lesões secas, negras, sem exalar o mau cheiro
55 (Boas et al., 2017; Lima et al., 2018).

56 De maneira geral, a identificação clássica de fungos é realizada através de suas características morfológicas,
57 porém existem espécies que não podem ser identificadas apenas pela morfologia. As podridões radiculares por exemplo,
58 são causadas por espécies que podem formar complexos, a exemplo de *F. solani* e *L. theobromae* (Boas et al., 2017;
59 Coutinho et al., 2017). Além disso, os fungos da família Botryosphaeriaceae causadoras de podridão negra, apresentam
60 alta diversidade de espécies e muita semelhança entre os caracteres morfológicos dificultando assim a identificação
61 (Abdollahzadeh et al., 2010; Brito et al., 2020; Machado, Pinho, de Oliveira, et al., 2014), sendo que dentro do grupo da
62 podridão negra a espécie *Scytalidium lignicola* era considerada o agente causal e atualmente foram reclassificados por
63 estudos moleculares como pertencendo a *Neoscytalidium dimidiatum* (= *N. hialinum*), de classes diferente, de
64 Leotiomycetes para Dothideomycetes (Machado, Pinho, de Oliveira, et al., 2014).

65 Uma dificuldade a mais, é a ocorrência de mais de um patógeno numa área produtiva ou na mesma raiz, como
66 foi detectada no Brasil (Notaro et al., 2013) e no continente africano (Aigbe & Remison, 2010; Zinsou et al., 2017). Por
67 isso, a identificação e caracterização das espécies dos fungos e oomicetos fitopatógenos das podridões radiculares é de
68 extrema importância no manejo e melhoramento, aperfeiçoando a qualidade e produtividade da mandioca, com reflexo
69 na agricultura familiar, devido ser uma cultura de subsistência e evitar o êxodo rural (Boas, 2016; Brito et al., 2020;
70 Maxmen A, 2019).

71 Dentre as técnicas moleculares utilizadas para identificação de espécies damos destaque neste estudo ao ITS-
72 RFLP que utiliza enzimas de restrição para clivagem sítio específicos através da região espaçadora transcrita interna
73 (ITS) dos genes do RNA ribossômico associada à técnica Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). O RFLP
74 apresenta várias vantagens para uso em diagnostico pois é uma metodologia fácil, rápida e especifica para identificação
75 e diferenciação dos diferentes espécies de eucariotos incluindo as fúngicas (Judova et al., 2012). Assim sendo, o objetivo
76 deste trabalho é realizar um mapa de restrição para algumas das principais espécies associadas à podridão de raízes de
77 mandioca empregando a região ITS dos genes do RNA ribossômico, bem como validar quais enzimas diferenciam
78 espécies causais das podridões radiculares na região do Oeste do Pará.

79 MATERIAIS E MÉTODOS

80 *Material biológico*

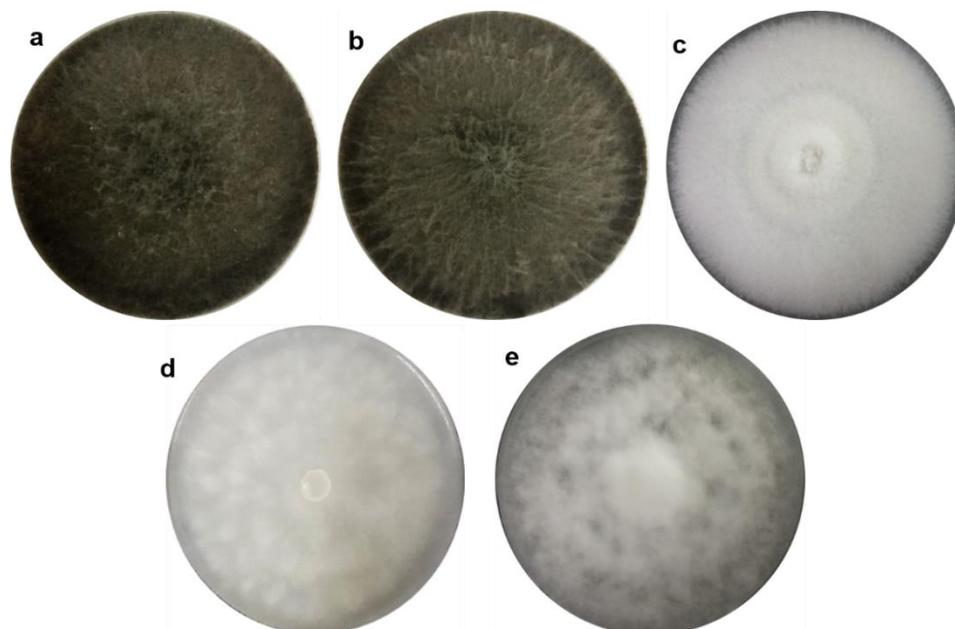
81 Foram utilizados fungos da coleção do Laboratório Genética da Interação - LGI, da Universidade Federal do Oeste do
82 Pará (UFOPA), originário de raízes mandioca com diferentes tipos de podridões (tabela 1 e figura 1), os quais foram
83 mantidos em meio batata dextrose ágar (BDA) para os ascomicetos e cenoura ágar (CA) para os oomicetos.

84 **Tabela 1** Informações dos isolados fúngicos quanto à espécie, local de origem no Estado do Pará-Brasil, tipo de podridão associada
85 às raízes de mandioca, códigos na coleção e das sequencias no GenBank

Espécie	Local	Coordenadas geográficas	Tipo	Código	GenBank
---------	-------	-------------------------	------	--------	---------

Complexo <i>Fusarium solani</i>	Santarém	2.330279S 54.436578W	Podridão seca	LGI011	ON899848
<i>Phytophthora melonis</i>	Belterra	2.74092S 54.52556W	Podridão mole	LGI012	ON872369
<i>Phytopythium sp.</i>	Castanhal	1.29104S 47.92147W	Podridão mole	LGI013	ON899849
Complexo <i>Lasioidiplodia theobromae</i>	Juruti	2.229668S 56.060221W	Podridão negra	LGI077	ON899850
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Juruti	2.229668S 56.060221W	Podridão negra	LGI080	ON899851

86



87

88
89

Fig 1 Aspectos culturais de diferentes isolados fúngicos, agentes causais de podridões de raiz de mandioca. (a) Complexo *L. theobromae*-BDA; (b) *N. dimidiatum*-BDA; (c) Complexo *F. solani*-BDA; (d) *P. melonis*-CA; (e) *Phytopythium sp.*-CA

90 *Extração de DNA e Amplificação PCR*

91 A extração de DNA foi realizada por maceração com nitrogênio líquido e pelo kit Wizard® Genomic DNA Purification
 92 (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. Após essa etapa, a avaliação de pureza do DNA extraído foi feita
 93 mediante eletroforese em gel de agarose a 1,0% a 120V por 90 minutos. A reação de amplificação foi realizada a partir
 94 do DNA extraído dos isolados utilizando iniciadores específicos para as regiões de ITS1-5,8-ITS2 com os primers
 95 universais ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). As PCRs foram realizadas usando a Taq Pol (Cellco Biotec do Brasil Ltda)
 96 nas seguintes concentrações de reagentes: 3,0 µl MgCl₂ (25mM), tampão 10x 5,0 µl, 3,0 µl mistura dNTP (20 mM cada),
 97 3,0 µl primers diretos e reversos (10 mM cada), Taq DNA polimerase 0,4 µl (5U/µl), 1µl de DNA molde e o volume
 98 total da PCR ajustado para 50 µl com água ultrapura estéril. As condições para a amplificação utilizadas foram 95°C por
 99 4 minutos e 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, 52°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por
 100 5 minutos em termociclador ProFlex™ 3x32-Well PCR System (Thermo Fisher Scientific). Os amplicons visualizados
 101 em gel de agarose a 1,0% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0) a 60V por 60 minutos,
 102 evidenciados com corante *Blue Green* e visualizados em transluminador de luz azul LT BLUE (Loccus).

103 *Sequenciamento*

104 Os produtos do PCR para sequenciamento foram secos em estufa a 60°C com o objetivo de envio para sequenciamento
 105 pelo método Sanger pela ACTgene (<https://actgene.com.br/>). As sequencias obtidas forward e reverse foram editadas
 106 manualmente com o DNA Dragon (*DNA Dragon: DNA Sequence Contig Assembly Software*, 2012), em seguida

107 submetidas no GenBank sob os códigos conforme a tabela 1. Para estimar o tamanho total da região ITS foram usados
 108 os primers e as sequencias, obtidas neste trabalho e do GenBank (GU111616.1 (*P. melonis*) e MH243441 (*Phytophthium*
 109 *sp.*), com o auxílio do programa MEGA X (Kumar et al., 2018).

110 *ITS-RFLP in silico*

111 As sequencias obtidas da região ITS das espécies selecionadas foram utilizados para a predição de enzimas de restrição
 112 com o auxílio da ferramenta NEBcutter online (Vincze et al., 2003), foram comparados e realizada a escolha das enzimas
 113 comerciais adequadas para a identificação dos patógenos testados.

114 *ITS-RFLP para Validação*

115 Para validar as enzimas de restrição foram amplificadas a região ITS como descrito anteriormente (95°C por 4 min e 35
 116 ciclos a 95°C por 1 min, 52°C por 30s, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 5 min). Os produtos só foram
 117 possíveis de serem restritos quando apresentavam bandas bem fortes. As reações fracas foram realizadas várias vezes, e
 118 todas purificadas e concentradas pela precipitação com isopropanol gelado 1.000 µl seguido de duas lavagens em álcool
 119 etílico 80% gelado a 10.000 rpm por 10 minutos a cada centrifugação, deixado secar e ressuspendidos em água ultra
 120 pura (adaptado Vildoso, 2009). Alíquotas dos produtos da PCR foram digeridos de acordo com as instruções dos
 121 fabricantes de cada enzimas de restrição previamente selecionadas (EcoRI, BmgBI, HaeIII, SmaI e XhoI), os fragmentos
 122 obtidos foram analisados em gel de agarose a 3% em tampão TAE por 360 minutos a 40V, os tamanhos foram estimados
 123 e comparando com bandas padrão de DNA.

124 RESULTADOS

125 *Análises in silico*

126 A diferenciação espécie-específica dos agentes causais das podridões radiculares de mandioca, inicialmente foram
 127 obtidas in silico com a clivagem da região ITS um total 53 enzimas de restrição comerciais (Tabela 2), deste total 5
 128 enzimas de restrição foram escolhidas para a análise, por se adequarem aos critérios: possuir melhor disponibilidade,
 129 não ser sensíveis a metilação e reconhecer sequencias específicas. Desse modo, resultando na seleção das seguintes
 130 enzimas para cada espécie: *N. dimidiatum* (EcoRI; XhoI), complexo *L. theobromae* (EcoRI; HaeIII), complexo *F. solani*
 131 (EcoRI; SmaI), *P. melonis* (BmgBI) e *Phytophthium sp.* (XhoI) (Tabela 3).

132 **Tabela 2** Enzimas de restrição com clivagem única na região ITS das espécies associadas às podridões radiculares

<i>Phytophthium sp.</i>	<i>P. melonis</i>	Complexo <i>F. solani</i>	Complexo <i>L. theobromae</i>	<i>N. dimidiatum</i>
AflII	AflII	AcII	AatII	AcII
BspDI	AluI	AflIII	AflIII	AflIII
BstUI	BmgBI	BspDI	BspDI	AluI
BstZ17I	BmtI	BsrBI	BsrBI	BspDI
ClaI	BspDI	BstUI	BsrI	BssHII
CviQI	BspHI	ClaI	BstUI	ClaI
EcoRV	BssSI	CviAII	ClaI	CviAII
FspI	ClaI	EcoRI	CviAII	CviQI

MfeI	DraI	FatI	CviQI	EagI
MluI	EcoRV	HpaII	EagI	EcoRI
PmlI	MfeI	HpyCH4IV	Eco53kI	FatI
RsaI	MscI	HpyCH4V	EcoRI	HpyCH4IV
SalI	NheI	MspI	FatI	HpyCH4V
SnaBI	PmlI		HaeIII	KasI
XhoI	SnaBI		HpyCH4V	MscI
			NlaIII	MseI
			RsaI	NlaIII
			SacI	NotI
			SphI	PaeR7I
			ZraI	PluTI
				SfoI
				SphI
				XhoI

133 Em relação ao tamanho da região ITS estimada é possível separar em dois grupos facilmente distinguíveis em
 134 gel de agarose, os ascomicetos (podridão seca e negra) variando de 542 a 579 pb e os oomicetos (podridão mole) de 904
 135 a 914 (Tabela 3).

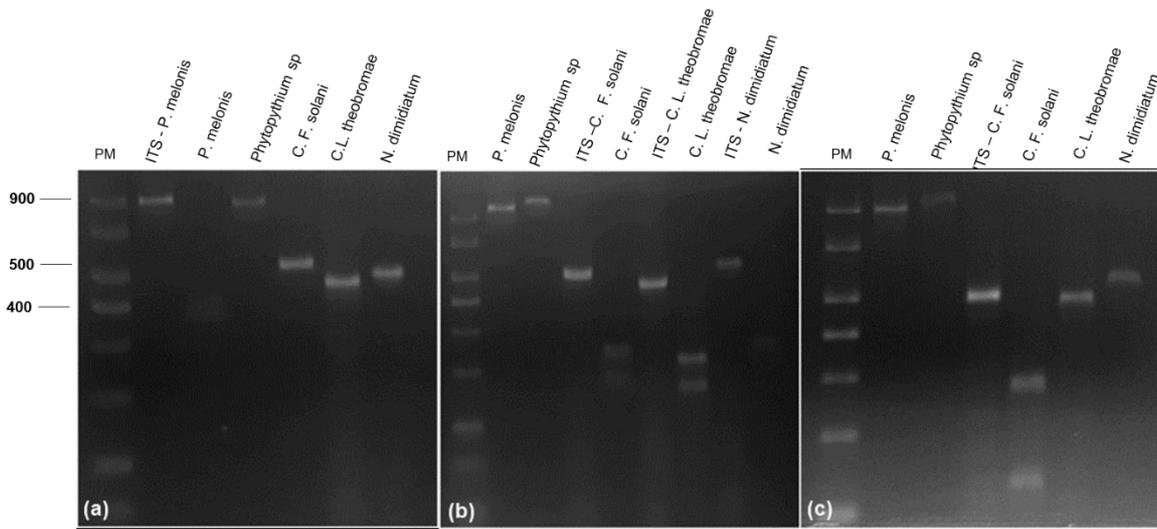
136 **Tabela 3** Relação espécies associadas às podridões radiculares com as clivagens esperadas da região ITS pelas enzimas de
 137 restrição

Espécies associadas as podridões radiculares	PCR produto (pb)	Fragmentos de restrição (pb)				
		EcoRI	BmgBI	HaeIII	SmaI	XhoI
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	579	291	579	579	579	447
		288				132
Complexo <i>Lasioidiplodia theobromae</i>	542	296	542	441	542	542
		246		101		
Complexo <i>Fusarium solani</i>	569	308	569	569	355	569
		261			214	
<i>Phytophthora sp.</i>	904	904	904	904	904	759
						145
<i>Phytophthora melonis</i>	914	914	474	914	914	914
			440			

138
 139 *Validação em gel*

140 Os padrões de restrição obtidos no gel foram comparados com a restrição prevista para as sequências ITS das espécies
 141 selecionadas gerando os seguintes padrões visualizados na figura 2. A validação da análise in silico e predição foram

142 testados e confirmado, uma vez que os isolados sequenciados tinham padrões de clivagens semelhantes aos preditos.



143

144 **Fig 2** Gel dos amplicons esperados da região ITS e com clivagem pelas enzimas de restrição dos agentes causais das podridões de raízes de mandioca. Representação: (a)
145 restrição BmgBI (AjiI); (b) restrição EcoRI (c) restrição SmaI. PM= pb peso molecular

146 DISCUSSÃO

147 Na cultura da mandioca as podridões radiculares causam grande impacto contínuo na produção e consequentemente
148 causa danos socioeconômicos aos países produtores (Notaro et al., 2013). O diagnóstico correto de forma eficiente do
149 patógeno é essencial para desenvolver estratégias de manejo e controle destas doenças, entretanto, mesmo após
150 isolamento dos micro-organismos associados, a produção de estruturas pode demorar, necessidade de meios de cultura,
151 condições específicas para indução, necessidade de especialistas e difícil diferenciação morfológica em alguns táxons,
152 como é o caso dos principais causadores das podridões de raízes de mandioca (Leslie & Summerell, 2006).

153 A identificação molecular dos patógenos é atualmente de grande importância por complementar as
154 identificações morfológicas e conseguir diferenciar espécies de complexos, entretanto, muitas vezes com o auxílio do
155 sequenciamento, mas não facilmente disponível para todos (Cai et al., 2011; Hongsanan et al., 2018; Machado, Pinho,
156 & Pereira, 2014). Dentro do grupo dos fungos para identificação é largamente utilizada a região ITS (Schoch et al.,
157 2012). Apesar de ser muito eficiente, a identificação por sequências ITS nem sempre é precisa ao nível específico, pois
158 não há variação de sequência entre espécies inter-relacionadas ou espécies crípticas. De acordo com Hongsanan et al.
159 (2018) sequências ITS podem apresentar similaridade de 99% entre certas espécies dependendo do grupo taxonômico,
160 assim a identificação por ITS pode ser insuficiente em alguns casos. Neste trabalho foi possível separar em dois grupos
161 os ascomicetos (podridão seca e podridão negra) e os oomicetos (podridão mole), apenas pelo o tamanho da região ITS
162 de cada espécie. Entretanto, não é possível a diferenciação a nível das espécies dentro destes grupos, sendo necessário
163 utilizar outras ferramentas moleculares como as enzimas de restrição.

164 O PCR-RFLP é um marcador informativo que realiza cortes no DNA alvo gerando fragmentos de diferentes
165 tamanhos por meio de enzimas de restrição. A região ITS é comumente utilizada como a sequência alvo a ser
166 amplificada por PCR e clivada (ITS-RFLP) com grande sucesso, como na diferenciação de *Colletotrichum* (Maharaj &
167 Rampersad, 2012; Silva et al., 2018), *Fusarium graminearum* (Hafez et al., 2020), *N. dimidiatum* (Leeyaphan et al.,
168 2018), *Fomes fomentarius* (Judova et al., 2012).

169 No presente trabalho os padrões de banda in silico esperados para os cinco isolados e a análise em gel com base
170 na amplificação da região ITS, seguido de digestão com as enzimas foram semelhantes ao resultado observado nos géis,
171 atestando a sensibilidade e reprodutibilidade desta abordagem, da mesma forma que em Silva et al. (2018) realizou,
172 porém com a antracnose da mandioca. Foi possível através da análise com as enzimas identificar dentro do grupo dos

oomicetos, responsáveis pela podridão mole, *P. melonis* (BmgBI) e *Phytophthium* sp. (XhoI). No grupo dos ascomicetos de podridão seca e podridão negra as enzimas HaeIII (complexo *L. theobromae*), SmaI (complexo *F. solani*) e EcoRI (*N. dimidiatum* e complexos *F. solani* e *L. theobromae*) puderam diferenciar as principais espécies.

Esta diferenciação de patógenos vem a ter utilidade nas estratégias de manejo e melhoramento, visando a resistência do cultivar sendo essencial para que se realize o plantio de maneira eficiente (Hohenfeld et al., 2018), como também na seleção prévia ao sequenciamento para estudos de genética de populações, epidemiologia ou mesmo filogenia (Silva et al., 2018). Por isso, a combinação de técnicas, usando características morfológicas e genes como marcadores têm sido empregues em estudos taxonômicos de fitopatógenos em casos de difícil identificação como o trabalho de Brito et al. (2020) que faz um estudo sobre a diversidade e patogenicidade de espécies da família Botryosphaeriaceae associada à podridão negra da raiz e podridão seca em mandioca.

Nesta pesquisa foi confirmado a viabilidade do uso do PCR-RFLP para algumas das principais espécies associadas as podridões de raízes de mandioca, por meio das enzimas EcoRI, BmgBI, HaeIII, SmaI e XhoI diferenciando, *P. melonis*, *Phytophthium* sp., *N. dimidiatum* e complexos *L. theobromae* e *F. solani*. Dessa forma, este estudo pode contribuir tanto nos programas de melhoramento nas regiões produtoras, para levantamento da ocorrência das espécies associadas à podridão radicular, bem como o manejo/controle específico pra cada espécie que ocorra nas diferentes regiões na Amazônia, como em outras regiões produtoras de mandioca.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESPA pela concessão de bolsa de pesquisa e à Cargill SA pelo apoio financeiro.

Conformidade com os padrões éticos

Este manuscrito é original e está de acordo com as normas éticas aplicáveis a esta revista.

Conflito de interesses

Os autores não apresentam nenhum conflito de interesses real ou potencial.

REFERÊNCIAS

- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Goltapeh, E. M., Zare, R., & Phillips, A. J. L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 25(1), 1–10. <https://doi.org/10.3767/003158510X524150>
- Abdulai, M., Basim, H., Basim, E., Baki, D., & Öztürk, N. (2018). Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*, the causal agent of cassava bacterial blight diseases in cassava (*Manihot esculenta*) in Ghana by polymerase chain reaction. *European journal of plant pathology*, 150(2), 471–484. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1297-3>
- Aigbe, S. O., & Remison, S. U. (2010). Minor root rot pathogens of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Nigeria. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(13), 1335–1341. <https://doi.org/10.1080/03235400903145483>
- Bandyopadhyay, R., Mwangi, M., Aigbe, S. O., & Leslie, J. F. (2006). *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. *Phytopathology*, 96(6), 673–676. <https://doi.org/10.1094/PHTO-96-0673>
- Boari, A. J., Cunha, E. M., Quadros, A. F. F., Barreto, R. W., & Fernandes, A. F. (2018). First Report of *Phytophthium* sp. Causing Storage Root Rot and Foliage Blight of Cassava in Brazil. *Plant Disease*, 102(5), 1042–1042. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1449-PDN>
- Boas, S. A. V. (2016). Identificação de fontes de resistência e espécies de fungos e oomicetos causadores de podridão radicular em mandioca [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

- 213 Boas, S. A. V., de Oliveira, S. A. S., Bragança, C. A. D. C., Ramos, J. B., de Oliveira, E. J., Oliveira, S. S. A. S. de,
 214 Bragança, C. A. D. C., ... J. R.-S., 2017, U., Bragança, C. A. D., Ramos, J. B., Oliveira, E. J. de, de Oliveira,
 215 S. A. S., Bragança, C. A. D. C., Ramos, J. B., de Oliveira, E. J., Oliveira, S. S. A. S. de, Bragança, C. A. D.,
 216 Ramos, J. B., & Oliveira, E. J. de. (2017). Survey of fungi associated with cassava root rot from different
 217 producing regions in Brazil. *Scientia Agricola*, 74(1), 60–67. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0366>
- 218 Brito, A. C. Q., de Mello, J. F., Câmara, M. P. S., Vieira, J. C. B., Michereff, S. J., Souza-Motta, C. M., & Machado,
 219 A. R. (2020). Diversity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with black root rot and
 220 stem cutting dry rot in *Manihot esculenta* in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 157, 583–598.
 221 <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02024-7>
- 222 Bua, B., & Okello, C. (2011). Isolation and identification of cassava root rot disease causal pathogens from Lira
 223 district, Uganda. 4.
- 224 Cai, L., Udayanga, D., Manamgoda, D. S., Maharachchikumbura, S. S. N., McKenzie, E. H. C., Guo, L. D., Liu, X. Z.,
 225 Bahkali, A., & Hyde, K. D. (2011). The need to carry out re-inventory of plant pathogenic fungi. *Tropical*
 226 *Plant Pathology*, 36(4), 205–213. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000400001>
- 227 Coutinho, I. B. L., Freire, F. C. O., Lima, C. S., Lima, J. S., Gonçalves, F. J. T., Machado, A. R., Silva, A. M. S., &
 228 Cardoso, J. E. (2017). Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in
 229 northeastern Brazil. *Plant Pathology*, 66(1), 90–104. <https://doi.org/10.1111/ppa.12565>
- 230 DNA Dragon: DNA Sequence Contig Assembly Software. (2012). Hepperle D. <https://www.dna-dragon.com/>
- 231 Duputié, A., Salick, J., & McKey, D. (2011). Evolutionary biogeography of *Manihot* (Euphorbiaceae), a rapidly
 232 radiating Neotropical genus restricted to dry environments. *Journal of Biogeography*, 38(6), 1033–1043.
 233 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02474.x>
- 234 Hafez, M., Abdelmagid, A., Adam, L. R., & Daayf, F. (2020). Specific Detection and Identification of *Fusarium*
 235 *graminearum* Ssensu Stricto Using a PCR-RFLP Tool and Specific Primers Targeting the Translational
 236 Elongation Factor 1 α Gene. *Plant Disease*, 104(4), 1076–1086. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0572-RE>
- 237 Hohenfeld, C. S., Santana, M. P., Junior, L. R. C., de Oliveira, E. J., & de Oliveira, S. A. S. (2018). Modelling growth
 238 characteristics and aggressiveness of *Neoscytalidium hyalinum* and *Fusarium solani* associated with black
 239 and dry root rot diseases on cassava. *Tropical Plant Pathology*, 43(5), 422–432.
 240 <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0228-y>
- 241 Hongsanan, S., Jeewon, R., Purahong, W., Xie, N., Ruvishika, J. L., Hyde, K. D., Stadler, M., Ekanayaka, A. H.,
 242 Dissanayake, A., Raspe, O., Pers, D., Liu, J.-K. K., Jayawardena, R. S., Ekanayaka, A. H., Dissanayake, A.,
 243 Raspé, O., Hyde, K. D., Stadler, M., & Peršoh, D. (2018). Can we use environmental DNA as holotypes?
 244 *Fungal Diversity*, 92(1), 1–30. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0404-x>
- 245 Judova, J., Dubikova, K., Gaperova, S., Gaper, J., & Pristas, P. (2012). The occurrence and rapid discrimination of
 246 *Fomes fomentarius* genotypes by ITS-RFLP analysis. *Fungal Biology*, 116(1), 155–160.
 247 <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.10.010>
- 248 Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
 249 across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
 250 <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

- 251 Leeyaphan, C., Makimura, K., Yamanishi, C., Bunyaratavej, S., Hau, C., Tada, Y., Suthammarak, W., Kaewsutthi, S.,
252 Phaitoonwattanakij, S., & Watanabe, S. (2018). PCR-Based diagnosis of *Neoscytalidium dimidiatum*
253 infection using internal transcribed spacer 1 region of ribosomal DNA primers. *Siriraj Medical Journal*, 70(1),
254 28–35. <https://doi.org/10.14456/smj.2018.6>
- 255 Leslie, J., & Summerell, B. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>
- 256 Lima, A. M., Moura, E. F., Ishida, A. K. N., Pereira, A. C. da C., Reis, S. P. dos, & de Souza, C. R. B. (2018).
257 Expression profiles of defense genes in cassava storage roots upon exposure to *Phytophthora* sp., causal agent
258 of soft root rot disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 104, 23–30.
259 <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.09.001>
- 260 Machado, A. R., de Queiroz Brito, A. C., & de Melo, J. F. (2018). Podridões fúngicas de raízes tuberosas no Nordeste
261 brasileiro: Etiologia e manejo. Em *Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos*. Lopes,
262 U.P. & Michereff, S.J.
263 [https://repository.ufrpe.br/bitstream/123456789/2341/1/livro_desafiosdoen%C3%A7asradiculares.pdf#page=](https://repository.ufrpe.br/bitstream/123456789/2341/1/livro_desafiosdoen%C3%A7asradiculares.pdf#page=105)
264 105
- 265 Machado, A. R., Pinho, D. B., de Oliveira, S. A. S., & Pereira, O. L. (2014). New occurrences of Botryosphaeriaceae
266 causing black root rot of cassava in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39(6), 464–470.
267 <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000600008>
- 268 Machado, A. R., Pinho, D. B., & Pereira, O. L. (2014). Phylogeny, identification and pathogenicity of the
269 Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a
270 description of new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Diversity*, 231–247. [https://doi.org/10.1007/s13225-013-](https://doi.org/10.1007/s13225-013-0274-1)
271 0274-1
- 272 Maharaj, A., & Rampersad, S. N. (2012). Genetic differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*
273 associated with anthracnose disease of papaya (*Carica papaya* L.) and bell pepper (*Capsium annuum* L.)
274 based on ITS PCR-RFLP fingerprinting. *Molecular biotechnology*, 50(3), 237–249.
275 <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9434-2>
- 276 Maxmen A. (2019). The quest to build a better cassava. *Nature*, 565(7738), 144–146. [https://doi.org/10.1038/d41586-](https://doi.org/10.1038/d41586-019-00014-2)
277 019-00014-2
- 278 Notaro, K. A., Medeiros, E. V., Silva, C. A. D., & Barros, J. A. (2013). Prospecção de fitopatógenos associados a
279 podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. *Bioscience Journal*, 29(6).
- 280 Olsen, K. M., & Schaal, B. A. (2001). Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its
281 wild relatives: Further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. *American journal of*
282 *botany*, 88(1), 131–142. <https://doi.org/10.2307/2657133>
- 283 Ricciardi, V., Mehrabi, Z., Wittman, H., James, D., & Ramankutty, N. (2021). Higher yields and more biodiversity on
284 smaller farms. *Nature Sustainability*, 4(7), 651–657. <https://doi.org/10.1038/s41893-021-00699-2>
- 285 Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Consortium, F. B.,
286 List, F. B. C. A., & Bolchacova, E. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a
287 universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 109(16), 6241–
288 6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

- 289 Silva, L. L., Pestana, K. N., Ferreira, C. F., & Oliveira, S. A. S. (2018). Differentiation of phylogenetic lineages within
290 the '*Colletotrichum gloeosporioides* species complex' associated with cassava anthracnose disease by PCR-
291 RFLP. *Tropical Plant Pathology*, 43(3), 194–201. <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0218-0>
- 292 Vildoso, C. I. A. (2009). *Macrofungos em mudas cítricas* [Dissertação de Doutorado, Universidade de São Paulo].
293 <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/111137/tde-19022010-094757/en.php>
- 294 Vincze, T., Posfai, J., & Roberts, R. J. (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes.
295 *Nucleic acids research*, 31(13), 3688–3691. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg526>
- 296 White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA
297 genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315–322.
298 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- 299 Zinsou, V. A., Afouda, L. A. C., Ahohuendo, B. C., & Wydra, K. (2017). Importance of fungal root rot pathogens of
300 cassava in Benin. *Pakistan Journal of Botany*, 49(5), 2023–2028