



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA  
DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**JONNY LÚCIO DE SOUSA SILVA**

**MÉTODO DE PROPAGAÇÃO DE *Phytophthium* sp. E ANÁLISE DE PROTEÍNAS  
DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM RAÍZES DE MANDIOCA INOCULADAS  
COM O PATÓGENO**

**BELÉM-PA  
2018**

**JONNY LÚCIO DE SOUSA SILVA**

**MÉTODO DE PROPAGAÇÃO DE *Phytophthium* sp. E ANÁLISE DE PROTEÍNAS  
DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM RAÍZES DE MANDIOCA INOCULADAS  
COM O PATÓGENO**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da  
Amazônia, como parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do  
título de Doutor.

Orientadora: Dra. Elisa Ferreira Moura Cunha

Co-orientadores: Dr. Roberto Lisboa Cunha

Dra. Alessandra Keiko Nakasone Ishida

**BELÉM-PA  
2018**

---

Silva, Jonny Lucio de Sousa

Método de propagação de *Phytophthium* sp. e análise de proteínas diferencialmente expressas em raízes de mandioca inoculadas com patógeno / Jonny Lucio de Sousa Silva. – Belém, 2018.

57 f.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2018.

Orientadora: Elisa Ferreira Moura Cunha.

1. *Manihot esculenta* L. - Meio de cultura. 2. *Phytophthium* sp. 3. Podridão mole da raiz e proteômica. 4. Componentes Proteicos de Raízes de Mandioca. I. Moura, Elisa Ferreira (orient.) II. Título.

CDD – 633.682

---



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA  
DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**JONNY LÚCIO DE SOUSA SILVA**

**MÉTODO DE PROPAGAÇÃO DE *Phytophthium* sp. E ANÁLISE DE PROTEÍNAS  
DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM RAÍZES DE MANDIOCA INOCULADAS  
COM O PATÓGENO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Doutor.

Aprovado em 31 julho de 2018

BANCA EXAMINADORA

Dra. Elisa Ferreira Moura Cunha– Orientadora  
Embrapa Amazônia Oriental

Dra. Gisele Barata da Silva: 1º Examinadora  
Universidade Federal Rural da Amazônia- UFRA

Dr. Rafael Borges da Silva Valadares: 2º Examinador  
Instituto Tecnológico Vale- ITV

Dr. Marcelo Murad Magalhães: 3º Examinador  
Embrapa Amazônia Oriental- CPATU

Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro: 4º Examinador  
Universidade Federal Rural da Amazônia- UFRA

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter dado forças através de meu divino Max Augusto, em que sua imagem me amparou nos momentos de dificuldade, ajudando-me o suficiente para caminhar nas piores horas. Juntamente com minha esposa Almileny que dedicou sua vida a minha nos últimos anos e serviu de ombro amigo nos momentos inconsoláveis que sempre confortava com força e confiança de que tudo iria dar certo. Amo vocês!

Gostaria de agradecer à Universidade Federal Rural da Amazônia pela oportunidade de cursar uma pós-graduação de qualidade. E ao Programa de Pós-graduação da Universidade Federal Rural da Amazônia, em Agronomia, coordenado pela Dra. Gisele Barata, pela oportunidade.

À CAPES pelo auxílio e apoio concedido através da bolsa, que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À Embrapa Amazônia Oriental pelo apoio estrutural concedido para montagem do experimento e desenvolvimento da pesquisa, que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos componentes da banca por terem aceitado participar, disponibilizando suas preciosas contribuições.

Agradeço também o ITV (Instituto Tecnológico Vale) pela possibilidade de trabalhar e conhecer o manusear e de novas tecnologias dentro da biotecnologia.

À Professora Dra. Elisa Ferreira Moura Cunha, minha orientadora, agradeço o apoio, a partilha do saber e as contribuições para realização do trabalho. Obrigado por estimular o meu interesse pelo conhecimento e pela vida acadêmica.

À Dra. Alessandra Keiko, minha co-orientadora, que abriu as portas do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, juntamente com os funcionários e estagiários em especial a Ída e Manoel que guiou toda o manuseio do oomiceto da micoteca dessa tese.

Ao professor Dr. Roberto Lisboa, co-orientador, pela amizade e companheirismo em todas as fases da confecção da tese e principalmente por ter aberto as portas do LASS da Embrapa.

Ao professor Dr. Rafael Valadares, pela cooperação no desenvolvimento e processamento com os dados do segundo capítulo da tese a proteômica.

A amiga Dra. Aline Medeiros por sua grande colaboração no processamento de aquisição dos principais dados da tese e pelo seu companheirismo com ótimas dicas e concelhos.

Ao funcionário da Embrapa Edson Sampaio, muito contribuiu com as coletas de campo e sua sabedoria acumulada durante tantos anos de experiência.

À minha mãe Maria Nancy e ao meu pai Antônio Lucio pela dedicação, educação, incentivo e apoio incondicional em todas as minhas escolhas. Amo vocês.

Aos amigos Dr. Renato Teixeira, Dra. Edna Sousa, Gledson Castro, Michel Sato e Bruna Sayuri que compartilharam seus conhecimentos e ajudaram-me durante todo curso como bons amigos.

A todos os familiares e amigos meu muito obrigado!

## RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma importante cultura para o Brasil, onde o Pará é o principal produtor de raízes. Em regiões com alta umidade e temperatura, o desenvolvimento de diversas doenças é favorecido, e se destaca as podridões de raiz. Os patógenos causadores das podridões, ao interagir com a mandioca por infecção, induzem uma cascata de reações culminando na produção de proteínas como aquelas relacionadas a patógenos (PRs) e a resistência sistêmica induzida (SAR), onde biologicamente interagem, tanto no apoplasto quanto no simplasto, mais rapidamente e com vigor ao ataque de patógeno, possibilitando assim a planta promover uma resistência. O presente estudo tem como objetivo gerar metodologia para o estudo da infecção do *Phytophthium* sp. em raízes de mandioca e estudar a expressão protéica de raízes de genótipos tolerantes e suscetíveis a podridão mole da raiz em resposta a infecção com o patógeno. O meio de cultura contendo raiz de mandioca mansa no escuro proporcionou um incremento de 19% no desenvolvimento micelial e de 615% na esporulação do patógeno e é o mais adequado para o cultivo do patógeno. Quanto ao tipo de inoculação, a resposta foi melhor nas raízes que obtiveram ferimentos severos, com cerca 5mm de profundidade. Dentre as proteínas obtidas, 140 foram diferencialmente expressas com o  $p \leq 0.01$ , gerando grupos de proteínas relacionadas ao estresse biótico, estresse oxidativo, metabolismo energético e estresse abiótico bem como outro grupo de proteínas ainda não associadas com a interação planta-patógeno.

Palavras chave: Meio de cultura, *Manihot esculenta*, Oomiceto, Podridão mole da raiz e proteômica.

## ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important crop for Brazil, where it is the main producer of roots. In regions with high humidity and temperature, the development of various diseases is favored, and stands out as root rot. The pathogens causing rot, when interacting with a binding cassava, with a reaction cascade culminating in the production of pathogen related aces (PRs), and induced biosensitivity (SAR), where biology interacts, both in apoplast and in the simplest way, more quickly and with vigor to the attack of pathogen, thus allowing an advanced plant a resistance. The present study aims to generate the methodology for the study of *Phytophythium* sp. in cassava roots and to study a protein expression of roots of genotypes tolerant and susceptible to a root protein in response to infection with the pathogen. The culture medium with gentle cassava root in the dark provided a 19% increase in mycelial development and 615% in sporulation of the pathogen and is the most suitable for the cultivation of the pathogen. "Among inoculum blends, 140 were differentially expressed with  $op \leq 0.01$ , generating stress groups related to biotic stress, stress oxidative, energy metabolism and abiotic stress as a group of proteins not yet associated with a plant-pathogen interaction.

Key words: Culture medium, *Manihot esculenta*, Oomycete, Root rot and proteomics.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS</b> .....	9
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
1.1. A MANDIOCA .....	10
1.2. A PODRIDÃO MOLE DA RAIZ DE MANDIOCA. ....	10
1.3. INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO.....	13
1.4. PROTEÍNAS RELACIONADA A PATÓGENOS.....	14
1.5. PROTEÍNAS E PROTEÔMICA.....	15
1.6. BIBLIOGRAFIA.....	16
<b>2 CAPITULO 1: CULTURE MEDIUM AND INOCULATION METHODOLOGY FOR THE STUDY OF SOFT ROOT ROT CAUSED BY PHYTOPYTHIUM SP</b> .....	20
2.1 INTRODUÇÃO .....	21
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
2.4 CONCLUSÕES.....	29
2.5 REFERÊNCIAS.....	29
<b>3 CAPITULO 2: ALTERAÇÕES NOS COMPONENTES PROTÉICOS DE RAÍZES DE MANDIOCA INOCULADAS COM <i>Phytopythium</i> sp., CAUSADOR DA PODRIDÃO MOLE DA RAIZ</b> .....	37
1 INTRODUÇÃO .....	38
2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
2.1 MATERIAL VEGETAL .....	39
2.2 ISOLADO DE <i>Phytopythium</i> sp.....	39
2.3 ENSAIO DE INOCULAÇÃO DE <i>Phytopythium</i> sp. EM RAÍZES DE MANDIOCA.....	40
2.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	40
2.5 DIGESTÃO DE PROTEÍNAS .....	41
2.6 DESSALINIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	41
2.7 2D-UPLC-MS <sup>E</sup> .....	41
2.8 BIOINFORMÁTICA .....	42
2.9 DESENHO EXPERIMENTAL DAS ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA .....	42
<b>3 RESULTADOS</b> .....	43
3.1 PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE ACUMULADAS EM PLANTAS INFECTADAS E NÃO INFECTADOS PELO <i>Phytopythium</i> sp.....	43
4 DISCUSSÃO .....	45
5 CONCLUSÃO .....	47
6 BIBLIOGRAFIA .....	48



## LISTA DE FIGURAS

<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	10
<b>Figura 1:</b> Sintomas da podridão mole no campo. ....	11
<b>Figura 2:</b> Hifas e estrutura de reprodução do <i>Phytophthium</i> sp. em diferentes proporções. ....	12
<b>Figura 3:</b> Ciclo da doença podridão mole causada por oomicetos em batata inglesa. ....	13
<b>2. Capítulo 1: Culture medium and inoculation methodology for the study of soft root rot caused by <i>Phytophthium</i> sp.</b> .....	20
<b>2. Figura 1:</b> Different types of injuries used preceding inoculation of <i>Phytophthium</i> sp .....	36
<b>3. Capítulo 2: Alterações nos componentes protéicos de raízes de mandioca inoculadas com <i>phytophthium</i> sp., causador da podridão mole da raiz</b> .....	52
<b>Figura 1:</b> Agrupamento de todas as proteínas que foram expressas. ....	52
<b>Figura 2:</b> Grupos de proteínas indicadas a partir do Heatmap .....	53
<b>Figura 3:</b> Esquema estrutural da reposta ao ataque do patógeno a uma célula .....	54
<b>Material suplementar:</b> Rol de proteínas com $p \leq 0,01$ .....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>2. Capítulo 1: Culture medium and inoculation methodology for the study of soft root rot caused by <i>Phytophthium</i> sp.</b> .....	20
<b>Table 1:</b> Representation of the mycelial growth index (MCI) of <i>Phytophthium</i> sp.....	34
<b>Table 2:</b> Representation of sporulation, measured in $10^5$ sporangia/ml of <i>Phytophthium</i> sp. ....	35
<b>3. Capítulo 2: Alterações nos componentes protéicos de raízes de mandioca inoculadas com <i>phytophthium</i> sp., causador da podridão mole da raiz</b> .....	37
<b>Tabela 1:</b> Seleção das 63 proteínas diferencialmente expressas com base em $p < 0.01$ .....	51

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1.A MANDIOCA

A mandioca é uma planta arbustiva pertencente à família Euphorbiaceae, gênero *Manihot* e espécie *Manihot esculenta* Crantz. Devido a sua alta adaptabilidade e aplicabilidade, foi possível a extensa incorporação da mandioca aos hábitos alimentares das populações, já que esta oferece grande fonte de carboidrato, com baixos custos de produção, elevando sua importância social significativa em países tropicais de baixa renda (O'HAIR, 1998).

Na Nigéria, foram produzidas aproximadamente 57,1 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2016) de mandioca em 2015, a maior parte consumida no próprio país. No Brasil, a produção foi de 23,7 milhões de toneladas de raiz em 2016 (IBGE, 2017).

A produtividade em toneladas/hectare varia bastante entre os países. A Nigéria, localizada na África, mais especificamente no Norte, possui o maior índice (49,1 t/ha) (FAOSTAT, 2016). O Brasil está acima da média mundial, com uma produtividade média de 13,7 t/ha em 2016 (IBGE, 2017), enquanto nos demais países produtores a média é de 10,9 t/ha (ESPM/SEBRAE, 2008).

Em segundo lugar na lista de maiores produtores mundiais de raiz de mandioca temos o Brasil, que segue a tendência dos países da América Latina e do sudeste asiático ao focar seus investimentos na crescente industrialização da mandioca. Atualmente, a produção brasileira gira em média de 23,7 milhões de toneladas de raiz (IBGE, 2017). No Brasil, os maiores produtores estão distribuídos entre Pará, Paraná, Bahia e Maranhão, figurando também como maiores consumidores de alimentos obtidos a partir da mandioca (IBGE, 2016).

Na indústria, a fécula de mandioca tem grande importância pelos seus produtos derivados terem competitividade crescente no mercado de amiláceos para a alimentação humana na fabricação de biscoitos, massa e panificação entre outros, ou como insumos em diversos ramos industriais tais como o de alimentos embutidos, embalagens, colas, mineração, têxtil e farmacêutica (MATTOS & CARDOSO, 2003).

### 1.2. A PODRIDÃO MOLE DA RAIZ DE MANDIOCA

A podridão está entre as doenças mais comuns causadas por fitopatógenos habitantes do solo, pois ocorrem na maioria das espécies cultivadas e apresentam uma ampla gama de sintomas. Nessas doenças, as raízes das plantas são afetadas e os tecidos radiculares tornam-se necróticos. O sistema radicular inteiro de uma planta ou somente uma pequena área próxima ao local de penetração inicial do patógeno, pode se tornar infectada. Então as plantas apresentam murcha, amarelecimento da folhagem, ferrugem e desfolhação, como resultado da podridão

mole das raízes (MICHEREFF et al., 2005; BOARI et al., 2018), conforme mostrado na Figura 1.

**Figura 1:** Sintomas da podridão mole da raiz de mandioca em campo. Em A sintoma da doença identificada em campo; em B colheita com perdas das raízes; em C podridão avançada com perda total das raízes e em D a deterioração da raiz característica da podridão mole.



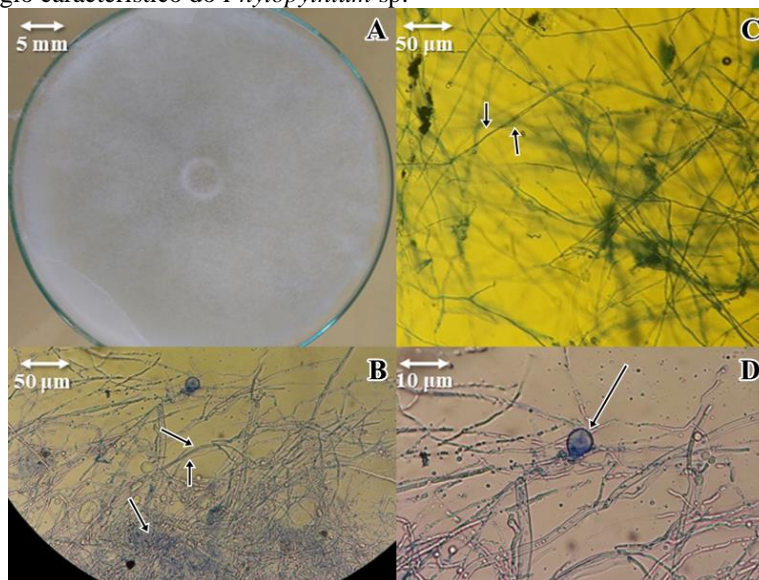
Fonte: Cunha, 2013

Os principais agentes causadores da podridão mole da mandioca, são classificados não mais como fungos verdadeiros e sim no reino Chromista ou Stramenopilla (ROSSMAN & PALM, 2006). Infectam as raízes causando podridão mole, decorrente da característica necrotrófica, dos patógenos, que atuam por maceração dos tecidos de reserva, levando à total desintegração das raízes, que liberam um odor de putrefação muito forte e característico. A podridão mole é bastante comum em áreas cujo solo não seja bem drenado, com ocorrência de acúmulo de água no período de alta intensidade pluviométrica como aqueles que ocorrem em países tropicais igualmente observado no período chuvoso amazônico, característico da região norte do Brasil (TREMACOLDI, 2016).

As podridões moles estão associadas a órgãos de reserva e, em geral, os sintomas iniciam com pequenas manchas de aspecto encharcado e coloração caramelada com rápida evolução necrótica, por liberação de substâncias pectinolíticas que matam as células em contato rapidamente caracterizando a origem necrotrófica (Figura 1) do patógeno (AMORIN et al., 2011; TREMACOLDI, 2016). Muitos fitopatógenos, dentre fungos e oomicetos, podem estar associados à podridão radicular, sendo os principais *Neoscytalidium hyalinum*, *Fusarium* sp., como fungos e *Phytophthora* sp. (OKECHUKWU et al., 2009; MASSOLA et al., 2016; VILAS

BOAS et al., 2017) e *Phytophthium* sp. (BOARI et al., 2018) como oomiceto, conforme mostrado na Figura 2.

**Figura 2:** Hifas e estruturas de reprodução do *Phytophthium* sp. Em A placa de petri de 150 mm tomada pelo *Phytophthium* sp.; Em B emaranhado de hifas indicado pelas setas; Em C hifas de oomicetos sem septos e em D seta indicando o esporângio característico do *Phytophthium* sp.

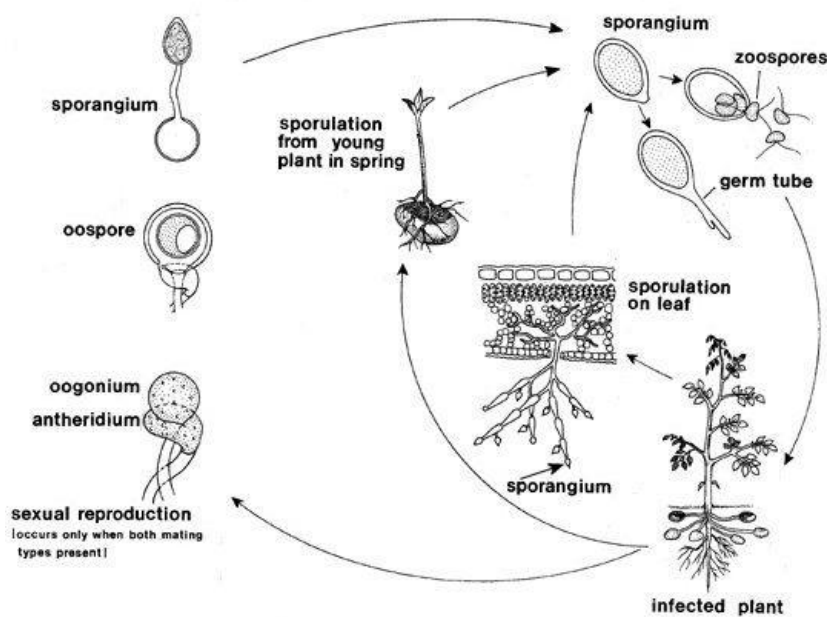


Fonte: Silva & Medeiros 2017

Os oomicetos apresentam um ciclo de vida bastante peculiar, para melhor entender esse mecanismo de sobrevivência dos oomicetos, devemos considerar três diferentes tipos de reprodução:

Na primeira, temos a reprodução sexuada caracterizada pela interação da oogonia (feminino) e anterídio (masculino) que gera um oosporo em seguida esporângio que por sua vez germinará liberando zoosporos na solução do solo afim de infectar novas plantas (Figura 3).

**Figura 3:** Ciclo da doença podridão mole causada por oomicetos em batata inglesa.



Os dois outros mecanismos de reprodução são assexuados, onde em um temos a produção direta de esporângios com posterior liberação de zoósporo na solução do solo e na outra é a propagação da doença por meio de partes vegetais ou mudas contaminadas (Figura 3).

### 1.3. INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO

A interação planta-patógeno pode aumentar a atividade nas plantas das mais diversas rotas metabólicas, podendo atuar no estímulo da NADPH oxidase na membrana plasmática, induzindo a produção de  $H_2O_2$  no apoplasto, que ao entrar na célula atua como espécie reativa de oxigênio, extremamente tóxico ao metabolismo. Este, por sua vez, irá induzir diversas sinalizações que culminarão na biossíntese de ácido salicílico, resposta a hipersensibilidade, biossíntese de fitoalexina, biossíntese de lignina e biossíntese de enzimas hidrolíticas (TAIZ & ZEIGER, 2017), que geralmente tem um padrão específico para cada resposta, com suas devidas consequências.

As plantas, como hospedeiras, apresentam diferentes níveis de resposta que auxiliam de certa forma suas limitações de defesa, comumente conhecida nos vegetais como reação de hipersensibilidade (HR) (STARKAWICZ et al., 1995). A HR geralmente é caracterizada pela drástica necrose da célula hospedeira no sítio de infecção. A necrose do tecido afetado é relacionado ao acúmulo, oxidação e polimerização de fenóis. A ativação do HR pode variar de uma célula a áreas necróticas generalizadas e que podem limitar a proliferação do patógeno, esse processo é geneticamente programado e possibilita novas transcrições e traduções, podendo ser relacionado com o início da resistência sistêmica (PACHOLATI, 2008).

Nessas reações, há um surto transitório de espécies reativas de oxigênio, seguida de uma cascata de transduções de sinais, que por sua vez, leva à ativação de genes de resposta de hipersensibilidade (HR). Na HR, há indução da produção de um grande número de proteínas solúveis, que são conhecidas como proteínas relacionadas à patogênese ou proteínas PR. São proteínas da planta hospedeira que interagem fisicamente entre si durante a infecção, causando a apoptose celular em resposta ao ataque do patógeno (HONG et al., 2017).

Manifestando-se a HR, ocorre em seguida a indução do sistema de resistência adquirida (SAR) que confere resistência a vários patógenos. A SAR é tipicamente ativada nos tecidos sistêmicos saudáveis de plantas infectadas. Após a infecção patogênica, um sinal móvel se desloca por meio do sistema vascular para ativar as respostas de defesa de tecidos distais. O salicilato, ou ácido salicílico, é uma molécula de sinal essencial para a indução de SAR, pois é necessária para a ativação de um grande conjunto de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (VALLAD & GOODMAN, 2004; PIETERSE et al., 2009).

Os mecanismos de defesa de uma planta são controlados geneticamente e dependem da expressão de determinados genes no momento certo da relação patógeno-hospedeiro (PIETERSE et al., 2014). Plantas em contato com patógenos ativam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes nas células. Os PRRs reconhecem moléculas do patógeno, conhecidas como padrões moleculares conservados associados à patógenos (PAMPs). Como esses epítetos estão presentes também em microorganismos não patogênicos, é comum encontrar o termo MAMPs (Padrões moleculares associados a microorganismos) (CHISHOLM et al., 2006; JONES & DANGL, 2006; PIETERSE et al., 2014).

#### 1.4. PROTEÍNAS RELACIONADA A PATÓGENOS

Um grupo de proteínas envolvidas em ataques de patógenos são as proteínas relacionadas a patógenos (PRs). Essas proteínas são encontradas em regiões lesionadas e não lesionadas, estando associadas ao desenvolvimento do metabolismo de reação, com a função básica de adaptar as células vegetais às condições de estresse (VAN LOON, 2006). Caracterizados pelo baixo peso molecular e resistência a ação de proteases, possuem estabilidade e alta solubilidade em pH ácido. As PRs são amplamente distribuídas nos tecidos vegetais, ocorrendo na parede celular, membrana plasmática, citoplasma, núcleo e outras organelas. As proteínas PRs são bastante estáveis em pH em torno de 2,8, tem resistência a ação de enzimas proteolíticas, se apresentam como monômero com massa molecular de 8 a 50 kDa, podem estar localizadas no vácuo, parede celular ou apoplasto e podem ser estáveis em altas temperaturas (PACHOLATI, 2008).

## 1.5. PROTEÔMICA

Frente aos avanços dos estudos na biologia molecular, uma grande quantidade de sequências de DNA foi identificada pelo sequenciamento assim como ocorreu no projeto de sequenciamento do genoma humano, fundamentais para o avanço dos estudos de proteína. Acreditava-se que era necessário apenas a determinação dos níveis de mRNA para avaliar as interações entre as proteínas e suas funções no desenvolvimento de determinada condição fisiológica (MONTI et al., 2005). No entanto, as respostas do metabolismo em grande parte têm influência direta ou indireta de proteínas ligadas as diversas rotas metabólicas.

Com o avanço dos estudos, sentiu-se a necessidade de associar o genoma às propriedades dinâmicas da proteômica. O rol de expressão proteica de uma célula altera diversas vezes ao longo do seu ciclo e por diversos estímulos, tais como temperatura, estresse abiótico (variações de temperatura, salinidade e falta de água), interação com patógeno, entre outros. Com isso, as proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais e se tornarem funcionais, sendo tais modificações não identificadas apenas com o conhecimento das sequencias gênicas ou transcritas (BAGGERMAN et al., 2003).

A genômica, de um modo geral, estuda as proteínas em função do sequenciamento de seus genes, que por sua vez não pode prever toda a estrutura dinâmica de um proteoma. Os estudos da expressão, da função e da regulação das proteínas codificadas por um organismo, podem estar associados a genômica. Nesse contexto as mudanças nos rumos das pesquisas em biologia molecular, foi chamada de Era Proteômica (DHINGRA et al., 2005).

A proteômica está focada em avaliar níveis de inibição e de superexpressão de proteínas, investigando modelos celulares de expressão proteica submetidos a diferentes situações fisiológicas, podendo ser bem específica (MONTI et al., 2005). O grande número de genomas sequenciados aumentou muito o número de sequência de nucleotídeos descaracterizadas. Isso se dá basicamente pela falta de estudos complexos das funções dessas sequencias de nucleotídeos que envolvem mecanismos particulares do ciclo celular como a interação proteína-proteína, do metabolismo celular (MONTI et al., 2005).

Trabalhos com proteômica são o ponta pé inicial de diversos estudos a nível proteico e genômico, dentre os quais podem estar associadas as mais diversas interações biológicas. Franco et al. (2015) em seu trabalho estudou a taumatina, uma PR-5, com função de quitinase, encontrada em diversos eucariotos. Estudou a taumatina inicialmente encontrada em plantas pela proteomica, agora identificada também na *Moniliophthora perniciosa* (causador da

vassoura de bruxa) com função de combate contra competidores fúngicos, em tecidos de cacaueteiro em senescência.

Shi et al. (2017), em seu trabalho com proteômica da alga *Pyropia haitanensis*, usou diferentes tempos de estresse em alta temperatura para avaliar as proteínas diferencialmente expressas em tais temperaturas. Foram identificadas 151 proteínas e as classificaram em 11 categorias funcionais. As categorias principais identificadas foram a síntese e degradação de proteínas, fotossíntese, resposta de defesa e metabolismo energético. Contudo, Shi et al. (2017) em uma de suas conclusões indicou que a fotossíntese, a síntese de proteína e o metabolismo secundário são inibidos pelo calor para limitar os danos a um nível reparável.

Nascimento et al (2018) em seu trabalho com dendê (*Elaeis guinensis* Jacq.) usou a proteômica afim de estudar as alterações metabólicas que tornam as plantas de dendezeiros mais suscetíveis ao AF (amarelecimento fatal, doença importante da cultura) e sugeriu que a severidade da doença está ligada a componentes abióticos, e que a comparação de perfis proteômicos de plantas assintomáticas com os de plantas acometidas por esta anomalia indicaram alterações metabólicas relacionadas à tolerância e ao desenvolvimento dos sintomas.

Neste contexto, a hipótese do presente trabalho é que alterações metabólicas na raiz da mandioca em resposta a um patógeno causador da podridão mole da raiz pode estar relacionada a expressão de proteínas PR e de estresse oxidativo, e que um grupo de proteínas deve manifestar alterações no metabolismo relacionado à tolerância ou a manifestação dos sintomas.

## 1.6 BIBLIOGRAFIA

AMORIN, L., J. REZENDE, AND A. FILHO, EDS., 2011, manual de fitopatologia: Princípios e conceitos, v. Volume 1: São Paulo, Lilian Amorim Jorge Alberto Marques Rezende Armando Bergamin Filho 704 p.

BAGGERMAN, G.; VERLEYEN, P. C.; HUYBRECHTS, J.; DE LOOF, A.; SCHOOF, L. Peptidomics. Journal of Chromatography b, 2003.

BOARI, A. J.; CUNHA, E. M.; QUADROS, A. F. F.; BARRETO, R. W. & FERNANDES, A. F. First report of *Phytophthora* sp. causing storage root rot and foliage blight of cassava in Brazil. Plant Disease, 102(5), 1042-1042, 2018.

BOOLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. Annual Reviews of Plant Physiology and Molecular Biology, Kidlington, v. 46, p. 189-214, 1995.

CHISHOLM, S. T.; COAKER, G.; BRAD DAY, B.; STASKAWICZ, B. J. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. Cell, v.124, p.803-814, 2006



DHINGRA, V.; GRUPTA, M.; ANDACHT, T.; FU, Z. F. New frontiers in proteomics research: A perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 299: 1-18, 2005.

ESPM/SEBRAE, 2008. estudo de mercado sobre a mandioca (farinha e fécula), estudos de mercado. ESPM/SEBRAE, <<http://www.sebrae.com.br/setor/mandiocultura>>, SEBRAE, p. 81.

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016, Food and Agricultural commodities production, <<http://faostat.fao.org>>. Acessado em: 08/2018

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016, Food and Agricultural commodities production, <<http://faostat.fao.org>>. Acessado em: 08/2018

FRANCO, S. DE F.; BORONI, R.M.; CARAZZOLE, M.F.; TEIXEIRA, P.J.P.L.; REIS, O.; PEREIRA, G.A.G. E MONDEGO, J.M.C. Genomic analyses and expression evaluation of Thaumatin-like gene family in the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015, v. 466, p.629-636.

FUKUDA, W. M. G.; FUKUDA, C.; DIAS, M. C.; XAVIER, J. J. B. N.; FIALHO, J. F.. Cultivares de mandioca recomendadas para o Brasil - 2002. Cruz das Almas - BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2002 (Circular Técnica).

LEITE, M.V.B.C.; MARINGONI, A.C. Principais doenças e seu controle. In: CEREDA, M.P. (ed.) *Agricultura: tuberosas, amiláceas latino-americanas (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas v.2)*. São Paulo: Fundação Cargill. 2002, p.370-383.

HONG, J.K.; HWAG, I.S.; HWANG, B.K. Functional roles of the pepper leucine-rich repeat protein and its interactions with pathogenesis-related and hypersensitive-induced proteins in plant cell death and immunity. *An International Journal of Plant Biology*, 246: 351-364, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. 2016. **Produção agrícola municipal**. (<http://www.ibge.gov.br>). Acessado em 04/2017

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. 2017. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. (<http://www.ibge.gov.br>). Acessado em: 04/2017

JONES, J. D. G; DANGL, J. L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, p. 323-329, 2006.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v.48, p.252-575, 1997.

LEÓN, J.; ROJO, E.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. Wound signalling in plants. *Journal of experimental botany*, v.52, p. 1-9, 2001.

MASSOLA, JR., N. S.; BEDENDO, I. P.; OLIVEIRA, S. A. S. Doenças da mandioca. In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A. *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 5 a Ed. Ouro Fino: Ceres, 54: 515-522, 2016.

MATTOS, P.L.P.; CARDOSO, E.M.R. 2003. Cultivo da mandioca para o Estado do Pará. Brasília, DF: Embrapa (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Sistema de produção, 13) (<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>). Acesso em: 04/2017.

MONTI, M., ORRÚ, S., PAGNOZZI, D., PUCCI, P. Functional proteomics. *Clinica Chimica Acta*, 357: 140-150, 2006.

MICHEREFF, SAMI J. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. 1.ed. Pernambuco: UFRPE. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. 2005, 399p.

NASCIMENTO, S.N.; MAGALHÃES, M.M.; CUNHA, R.L.; COSTA, P.E. de O.; ALVES, R.C. de O.; OLIVEIRA, G.C.; VALADARES, R.B. da S. Differential accumulation of proteins in oil palms affected by fatal yellowing disease. *Plots one*, 1: 1-20, 2018.

O'HAIR, STEPHEN. Cassava. *New Crop* (site virtual). Indiana (EUA): Center for New Crops & Plant Products, 1998. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

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

PACHOLATI, Sérgio Florentino et al. (Ed.). *Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular*. Fealq, 2008.

PIETERSE, C.M.J., ZAMIOUDIS, C., BERENDSEN, R.L., WELLER, D.M., VAN WEES, S.C.M., AND BAKKER, P.A.H.M. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol*, v. 52, p. 347-375, 2014.

PIETERSE C.M.; LEON-REYES, A.; VAN DER ENT, S. AND VAN WEES, S.C. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5:308-16, 2009.

STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J. ELLIS, J.G; JONES, J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, Washington, v. 268, p. 661-667, 1995.

SHI, J.; CHEN, Y.; XU, Y.; JI, D.; CHEN, C.; XIE, C. Differential Proteomic Analysis by iTRAQ Reveals the Mechanism of *Pyropia haitanensis* Responding to High Temperature Stress. *Scientific Reports*, 7:44734, 2017.

ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E. Why are Phytophthora and other Oomycota not true Fungi *Pest Management*, v. 17, p. 217-219, 2006.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2017. *Fisiologia vegetal*. 6° ed. Porto Alegre: Artmed, 888 p.

TREMACOLDI, C. R. Manejo das principais doenças da cultura da mandioca no estado do Pará. Embrapa Amazônia Oriental-Capítulo em livro científico (ALICE), 2016.

Vallad, G.E. & Goodman, R.M. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Sci* 44:1920-34, 2004.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, v.44, p. 135-162. 2006.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and molecular plant pathology*, v.55, p. 85-97, 1999.

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

## 2. Capítulo 1: Culture medium and inoculation methodology for the study of soft root rot caused by *Phytophthium* sp.\*\*

### Meio de cultura e metodologia de inoculação para o estudo da podridão mole de raízes causada por *Phytophthium* sp.

Jonny Lucio de Sousa Silva<sup>I</sup> Alessandra Keiko Nakasone Ishida<sup>II</sup> Roberto Lisboa Cunha<sup>II</sup> Aline Medeiros Lima<sup>III</sup> José Edson Sampaio<sup>II</sup> Elisa Ferreira Moura<sup>II\*</sup>

#### ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important crop in Brazil and Pará is the most important producer of roots. The high temperature and humidity of tropical regions favor the development of various diseases, among them the root rot. The objective of this study was to evaluate the effect of luminosity and culture medium on the mycelial growth and sporulation of *Phytophthium* sp. associated with different methods of pathogen inoculation on excised cassava roots. *In vitro* tests for pathogen growth were established in a 2 x 6 factorial design (luminosity x culture medium) with five replicates. The culture medium containing sweet cassava root produced greater mycelial development and higher pathogen sporulation and it was the most suitable medium for pathogen culture. The absence of light induced better growth and sporulation than 12h-luminated cultures. Regarding the type of inoculation, a response was better in the races that obtained deeper results in about 2mm.

**Key words:** culture medium, oomycete, sporulation, mycelium

---

<sup>I</sup>Universidade Federal Rural da Amazônia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia Belém, Pará, Brasil, [jonnylucios.silva@hotmail.com](mailto:jonnylucios.silva@hotmail.com)

<sup>II</sup>Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil; [alessandra.ishida@embrapa.br](mailto:alessandra.ishida@embrapa.br); [roberto.cunha@embrapa.br](mailto:roberto.cunha@embrapa.br); [jose.sampaio@embrapa.br](mailto:jose.sampaio@embrapa.br) e [elisa.moura@embrapa.br](mailto:elisa.moura@embrapa.br)

<sup>III</sup>Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus de Tomé-Açu, Pará, Brasil, [alinemedeiros14@hotmail.com](mailto:alinemedeiros14@hotmail.com)

\*author for correspondence: [elisa.moura@embrapa.br](mailto:elisa.moura@embrapa.br), (+55 91) 3204-1089.

\*\*De acordo com as normas da Ciência Rural

## RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma importante cultura para o Brasil, onde o Pará é o principal produtor de raízes. Regiões tropicais com alta umidade e temperatura favorecem o desenvolvimento de diversas doenças, como as podridões de raiz. O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da luminosidade e de meios de cultura no crescimento micelial e na esporulação de *Phytophthium* sp. e analisar métodos de inoculação do patógeno em raízes de mandioca destacadas. Os ensaios *in vitro* foram instalados em esquema fatorial 2x6 (luminosidade x meio de cultura), com cinco repetições e submetidos ao teste de média Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ). O meio de cultura contendo raiz de mandioca mansa proporcionou maior desenvolvimento micelial e maior esporulação do patógeno e é o mais adequado para o cultivo do patógeno. A ausência de luz gerou melhor crescimento e esporulação do que o cultivo sob 12 horas de fotoperíodo. Quanto ao tipo de inoculação, a resposta foi melhor nas raízes que obtiveram ferimentos mais profundos cerca de 2mm.

Palavras-chave: meio de cultura, oomiceto, esporulação, micélio

## INTRODUCTION

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is widely incorporated in human diets in many countries, since it serves as a plentiful source of carbohydrates at low production costs. In Brazil, the most recent figures show annual root production of 23.7 million metric tons (IBGE, 2017). The state of Pará is the nation's leading grower, producing 5.01 million tons from 501 thousand hectares in 2016 (CONAB, 2017), mainly bitter cassava, due to its preference in industrial processing.

Despite the leading place of Pará in Brazilian production, the expansion of cassava cultivation in the state is hampered by the occurrence of several diseases. Root rot caused by

various phytopathogens in the soil is among the main problems in this aspect. This class of diseases is characterized by root necrosis, which begins with isolated dead spots and evolves to affect the entire root system. The specific symptoms of a plant depend on the time of infection and the soil environment, mainly temperature and moisture (MICHEREFF, 2005).

The principal pathogens responsible for causing root rot in cassava belong to the genera *Fusarium* and *Phytophthora* (OKECHUKWU et al., 2009). In Brazil, soft root rot in cassava is mainly caused by oomycetes such as *Phytophthora* spp. and *Pythium* spp. (VILAS BOAS et al., 2016). In the state of Pará, *Phytophthora drechsleri*, *P. nicotianae* var. *parasitica*, *P. richardiae*, *Pythium scleroteichum* (FIGUEIREDO & ALBUQUERQUE, 1970; POLTRONIERI et al., 1997), and more recently, *Phytopythium* sp. (BOARI et al., 2018), have been reported as causing soft root rot in cassava.

Oomycetes are a class included in the kingdom Chromista and phylum Oomycota. The oomycete of the genus *Pythium* was defined in 1858, and is now divided into 11 clades based on molecular analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region of DNA (LÉVESQUE & COCK, 2004). VILLA et al. (2006), analyzing a large number of samples, found that a certain species of *Pythium* stood out by generating clade K, distinguished from the other species of *Pythium* for having combined traits of *Pythium* and *Phytophthora* (VILLA et al., 2006). The genus *Phytopythium* was recently classified in the family Pythiaceae, containing the species described as *Phytopythium sindhum* (BALA et al., 2010), which belongs to clade K.

The *Phytopythium* genus also occurs in another cultures, causing stem rot in tangerine plantlets (CHEN et al., 2016), decreasing in 20% the growth of soy roots (RADMER et al., 2017), causing root rot on rootstocks of pistachio (FICHTNER et al., 2016) and causing root rot on avocado (RODRIGUEZ-PADRON et al., 2018). Thus it is a versatile genus that can be pathogenic to many plant species.

Investigations of oomycetes require a reliable and efficient method to inoculate roots, but studies in this respect are scarce for the tropical conditions in Brazil. Recently, various

methods have been described for this purpose, such as inoculation of excised roots, for application in studies searching for new sources of resistance in cassava (VILAS BOAS et al., 2016). This method can also be used in experiments where there is a need to obtain and multiply oomycetes stored in mycology collections quickly while maintaining the pathogenicity of the isolate.

The essential factors for a successful culture method include the composition and concentration of nutrients in the culture medium, the physiological variability of the isolate, and environmental conditions such as temperature and luminosity. All of these can influence the development and sporulation of phytopathogens (CRUZ et al., 2009), such as fungi and oomycetes. Therefore, it is important to determine the best culture medium and luminosity conditions to obtain optimal growth followed by high production of spores in a short time frame.

Due to the importance of the disease for cassava and the lack of studies about the genus *Phytophthium* associated with cassava root rot, the aim of the study reported here was to evaluate the effect of luminosity and type of culture medium on the mycelial growth and sporulation of *Phytophthium sp.* and to analyze methods to inoculate the pathogen on excised cassava roots.

## **MATERIAL AND METHODS**

The isolate CT 0084 of *Phytophthium sp.* was obtained from the mycology collection of Embrapa Amazônia Oriental in Belém, Pará, and was used in all the tests. For the experiment, the isolate, preserved according to the method of Castellani, considered most suitable for oomycetes (CLARK & DICK, 1974), was plated on PDA medium (200 g potato, 20 g agar and 20 g dextrose per liter of autoclaved distilled water). Seven days after incubation in the dark, the pathogen was transferred to plates containing sweet cassava dextrose agar (SCDA) and kept at  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 7 days. Then the pathogenicity was tested by inoculation

on excised cassava roots following the method proposed by ONYEKA et al. (2005) and adapted by OLIVEIRA et al. (2013), for subsequent use in the experiments.

To optimize the sporulation and measure the mycelial growth of *Phytophthium sp.*, there were used six types of culture medium: (i) V8 juice with CaCO<sub>3</sub> (V8CC) (ROMERO & GALLEGLY, 1963); (ii) V8-agar (V8 Juice, Campbell's ), leaving out the CaCO<sub>3</sub>, (iii) potato dextrose agar (PDA); (iv) carrot dextrose agar (CDA) (20 g carrot root, 20 g dextrose and 20 g agar for each liter of water); (v) bitter cassava dextrose agar (BCDA), adapted from the PDA medium with replacement of potato by bitter cassava; and (vi) sweet cassava dextrose agar (SCDA), also adapted from PDA.

The terms sweet and bitter cassava refer to the concentrations of cyanogenic compounds, which are extremely toxic (requiring detoxification before ingestion). Cassava is classified as bitter when the concentration of hydrocyanic acid HCN is greater than 100 mg kg<sup>-1</sup>, and as sweet when the HCN concentration is above 100 mg kg<sup>-1</sup> (LORENZI et al., 1993). Besides the culture medium types, two luminosity levels were tested (12 h of artificial light and continuous darkness), both in a BOD chamber with average temperature of 25 °C.

The different culture media were placed in glass Petri dishes and after solidification, mycelium disks of the pathogen (diameter of 5 mm) were placed in the center of each dish (the basic method both for mycelial growth and sporulation).

The mycelial growth was evaluated daily by measuring the diameter of the colony with a digital pachymeter, until the pathogen covered the entire diameter of the dish. The data were used to calculate the mycelial growth index (MCI), based on the formula (eq. 1) adapted by Oliveira (1991):

$$\text{MCI} = \sum(D - D_p) / N \quad (\text{Equation 1})$$

Where:

D = current average diameter of the colony;

D<sub>p</sub> = average diameter of the previous day;



N = number of days after plating.

For sporulation, the evaluation was performed 30 days after plating the pathogen. To obtain the suspension of sporangia, 5 mL of sterilized distilled water was added to each dish, and then, a Drigalski loop was used to scrape the colonies. The number of sporangia was determined with a hemocytometer (Neubauer chamber), under an optical microscope. The formula used in the count of the structures corresponded to the area C, expressed as follows: average number of structures in area "C"  $\times 2.5 \times 10^5 = y$  spores/ml.

The experiment was completely randomized in a 2x6 factorial design (two luminosity treatments and six culture media), with five replicates, each represented by a Petri dish with diameter of 90 mm and mycelial growth and sporulation were evaluated as variables.

There were evaluated two cassava genotypes: one with a record of susceptibility to soft root rot (accession CPATU 530) and the other, a cultivar developed by Embrapa for tolerance to soft root rot (BRS Poti), both maintained in the cassava active germplasm bank (AGB) of Embrapa Amazônia Oriental, located in Belém, Pará, Brazil. The two genotypes were planted in an area free of the disease. The place has humid tropical climate, with average yearly temperature of 27 °C and average annual rainfall of 2,500 mm (INMET, 2017). The plants were cultivated in full sunlight, with spacing of 1.0 x 1.0 m in rows of 10 plants per genotype. The management of the crop followed the recommendations for growing cassava.

The protocol of inoculation was conducted in a growth chamber with controlled moisture (80%) and temperature (23 °C). Three types of injuries were tested: without injury; with superficial injury of the root, involving removal of the suber; and with deep injury, reaching the root pulp.

Disks containing mycelia with diameter of 5 mm were removed from the SCDA culture medium for inoculation on excised roots (ONYEKA et al., 2005). For all the materials, three disks with diameter of 5 mm were inoculated on excised roots of 12 month-old plants, where the control was the inoculation with disks only containing SCDA medium.

The root samples were previously sterilized with 5% sodium hypochlorite and then each root was injured when necessary with a flame sterilized drill with diameter of 5 mm, with 4 mm of depth on average (Figure 1 A2). After inoculation, the injured area was covered with plastic paraffin wax to maintain moisture and the roots were placed in a small chamber. The roots were watered twice a day with autoclaved distilled water until the end of the incubation period of each experiment, according to the method adapted by OLIVEIRA et al. (2013) and VILAS BOAS et al. (2016) who used different inoculum on root slices . At the end of each inoculation experiment, the roots were cut transversally with a knife at a 90° angle to the axis of the root, to observe the evolution of the disease inside the root.

The data were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Scott-Knott test at 5% significance, using the Assistat 7.7 program (SILVA & AZEVEDO, 2016).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Considering the effect of the luminosity on the mycelial growth of *Phytophthium sp.*, the pathogen grew significantly faster in the dark on all the culture media tested (Table 1), occupying the entire Petri dish surface by the third day after plating. BENNETT et al. (2017) also observed fast mycelial growth (less than three days) of *Phytophthium* genera, on culture medium containing, under dark. For the culture mediums, when considering the BCDA and SCDA mediums (which contained cassava), there was no significant difference, and, in both cases, the MCIs were higher in continuous darkness, differing significantly from the other treatments (Table 1). For the MCI, there was a 19% increase on medium containing sweet cassava at the dark when comparing medium containing V8. Under 12h light increase was 10.5%.

SCDA medium showed the greatest production of sporangia and produced an average of  $6.80 \times 10^5$  sporangia/ml under total darkness condition (Table 2), after 15 days. There was

interaction among medium type and luminosity conditions, but total darkness was the best condition for the two best responsive mediums (Table 2). V8 and CDA were the medium that generated less sporangia for *Phytophythium sp.* For the sporulation, there was a 615% increase on medium containing sweet cassava at the dark when comparing medium containing V8. Under 12h light increase was 276%.

According to the comparison of the mean sporulation levels, SCDA in the dark presented the highest means of growth and sporulation for *Phytopythyum sp.* (Table 2), closely followed by the treatment with BCDA, also in the dark. It has been observed that organic medium are the best to stimulate growth and sporulation for *Phytophthora* and *Pythium* species (ERWIN & RIBEIRO, 1996). The use of organic portions of the common host of the pathogen on the culture medium has been successful for *Phytophthora palmivora*, causal agent of black pod disease of cocoa (*Theobroma cacao*) (AWUAH & FRIMPONG, 2002). *P. palmivora* had better growth and sporulation in medium based on green cocoa pod and ripe cocoa mucilage (AWUAH & FRIMPONG, 2002). Besides, the use of tomato slices had been used successfully to isolate *Phytophthora infestans*, causal agent of late blight disease of tomato (TUMWINE et al., 2000).

SIA et al. (2013) evaluated the use of cassava as a substitute starch source to isolate endophytic fungi from leaves of guarana and olive and observed that the highest endophytic incidence and fungal diversity occurred when using MDA medium. According to the authors, the MDA medium is economically more advantageous for use in tropical countries, since cassava is easily found in these places, with more accessible prices. Besides, potato plantations are submitted to considerable applications of agrotoxics, resulting in the inhibition of microfauna growth (SIA et al., 2013). In Brazil, among 742 samples of potato analyzed, 233 had agrotoxic levels above the concentration allowed (0.01 mg/kg). On the other hand, it was not detectd agrotoxic residues above 0.01mg/kg and 455 showed no residue on 470 samples of cassava root sampled all over Brazil (ANVISA, 2016). Thus, the lack of agrotoxic residues on

cassava roots can be considered an advantage over potato for its use as feedstock of culture medium for pathogen growth.

Our results indicated that the presence of light had a slightly negative effect on the vegetative growth of *Phytophthium* sp. High sporulation values in the dark were also reported by SILVA & TEIXEIRA (2012), studying *Fusarium*. They obtained the best sporulation results in the dark in PDA medium. Besides, BRASIER (1969) verified that treatments under light inhibited the oogonium formation and stimulated sporangia formation of *Phytophthora palmivora* e *P. heveae* under temperatures of 22.5 a 27.5 °C.

After inoculation of roots without injury (Figure 1 A1, B1), no necrosis was observed in either of the two genotypes and in any repetition. However, in inoculation in deep injuries after removing all the barriers until reaching the root pulp (Figure 1A3, B3), necrosis was observed in all the genotypes seven days after inoculation, without any distinction regarding severity.

In order to establish the inoculation of an oomycete on cassava roots, a wound is necessary, since physic-chemical barriers present on the set suber+periderm are enough to avoid the disease (TREMACOLDI, 2016). In inoculations of *Fusarium* sp. in different cassava genotypes with peeled roots, the same softening and necrosis were observed (VILAS BOAS et al., 2016). The authors also found that the tolerant genotypes showed little or no necrosis or softening, and therefore constructed a scale of severity of attack on excised cassava roots (VILAS BOAS et al., 2016). The inoculations of *Fusarium* sp. in cassava roots were more efficient due to the deeper injuries. However, these levels of severity of the disease did not apply to *Phytophythium* sp. According to the methodology used in this study, it was no possible to discriminate among the types of wounds, but we were able to compare the absence of wounds with the absence of suber and the absence of suber and periderm.

By analyzing *Phytophythium* inoculation in destached roots of cassava using the same methodology, LIMA (2017) identified strong clues of plant-pathogen interaction when

analysing RNA expression. RNA extracted from susceptible cassava roots indicated the overexpression of superoxide dismutase transcripts (SOD) and of a protein related to pathogen (PR), among others. Thus, this study confirms that the methodology is robust to be applied in transcriptional and proteomic studies, which tends to be highly susceptible to environmental influence.

## CONCLUSIONS

The best culture media both for mycelial growth and sporulation of *Phytophthora* sp. were sweet cassava dextrose agar (SCDA) and bitter cassava dextrose agar (BCDA), under continuous darkness. The best inoculation method was to use deeper wounds (4mm depth on average) and keep the roots in a growth chamber with controlled temperature 25°C and humidity 80%, around 7 days.

## DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

We have no conflict of interest to declare.

We have a competing interest to declare

## REFERENCES

- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, 2016. Available at: <<http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>> Accessed on 6 June 2018.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN FILHO, A. eds. **Manual de Fitopatologia.** Princípios e Conceitos. 4<sup>a</sup> ed. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. 704p, 2011. 2v.
- BALA, K.; ROBIDEAU, G.P.; LÉVESQUE, C.A.; COCK, A.W.A.M; ADAB, Z.G; LODHI, A.M.; SHAHZAD, S.; GRAFFAR, A. & COFFEY, M.D. *Phytophthora* *sindhensis* Lodhi, Shahzad and Lévesque. Fungal Planet 49. **Persoonia**, v.24, p.136-137, 2010. Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2890159/?report=classic>>, Accessed on: 6 June 2018. doi: 10.3767/003158510X512748.

BENNETT, R.M.; BORA, N.; DEDELES, G.R.; THINES, M. *Phytophthium leanoi* sp. nov. and *Phytophthium dogmae* sp. nov., *Phytophthium* species associated with mangrove leaf litter from the Philippines. **Acta Mycologica**, v.52, p.1103, 2017. Available at: <<http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-1d947e5f-f60d-4321-832d-44fff70d35f5>>, accessed on: 6 June 2018. DOI: <https://doi.org/10.5586/am.1103>.

BOARI, A.J.; CUNHA, E.M.; QUADROS, A.F.F.; BARRETO, R.W. & FERNANDES, A.F. First report of *Phytophthium* sp. causing storage root rot and foliage blight of cassava in Brazil. **Plant Disease**, v.102, p.1042, 2018. Available on: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-09-17-1449-PDN>>, Accessed on: 06 June 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1449-PDN>

BRASIER, C.M. The effect of light and temperature on reproduction in vitro in two tropical species of *Phytophthora*. *Transactions of the British Mycological Society*, v.52, p.105-113, 1969. Available on: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153669801646>>, Accessed on: 06 June 2018. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(69\)80164-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(69)80164-6)

CLARK, G. & DICK, M.W. Long-term storage and viability of aquatic Oomycetes. **Transactions of the Bryological Society**. London, v.63, p.611-612, 1974. Available on: Access the full text: NOT AVAILABLE, Accessed on: 06 June 2018.

CHEN, XIA-REN; LIU, BEI-BEI; XING, YU-PING; CHENG, BAO-PING; LIU, MEI-LING; TONG, YON-HUI & XU, JING-YOU. Identification and characterization of *Phytophthium helicoides* causing stem rot of Shatangju mandarin seedlings in China. **European Journal of Plant Pathology**, v.146 p.715-727, 2016. Available on: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-016-0952-4>>, Accessed on: 06 June 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0952-4>

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Conjuntura das agropecuárias, 2017. Available at: <<http://www.conab.gov.br>>. Accessed on 31 May 2018.

CRUZ, M.F.A.; PRESTES, A.M. & MACIEL, J.L.N. Esporulação de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Ciência Rural**, v.39, p.1562-1564, 2009. Available on: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33113643040>>, Accessed on: 06 June 2018.

FICHTNER, E.J., BROWNE, G.T., MORTAZ, M.; FERGUSON, L. AND BLOMQUIST, C.L. First report of root rot caused by *Phytophthium helicoides* on pistachio rootstock in California. **Plant Disease**, v.100, p.23-37, 2016. Available on: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-12-15-1424-PDN>, Accessed on: 06 June 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-15-1424-PDN>

FIGUEIREDO, M.M. & ALBUQUERQUE, F.C. Podridão mole das raízes da mandioca (*Manihot esculenta*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, p.389-393, 1970. Available on: < <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/17829>>, Accessed on: 06 June 2018.

DOI:

Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) Dados de estações automáticas, 2017. Available at:<<http://sisdagro.inmet.gov.br/sisdagro/app/monitoramento/bhs>>. Accessed on: 11 May 2017.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) Levantamento sistemático da produção agrícola, 2017. Available at: < [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_\[mensal\]/Fasciculo/lspa\\_201701.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201701.pdf) >. Accessed on 20 November 2017.

LÉVESQUE, C.A. & COCK, A.W.A.M. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research**, v.108, p.1363-1383, 2004. Available on: < <https://www.cambridge.org/core/journals/mycological-research/article/molecular-phylogeny-and-taxonomy-of-the-genus-pythium/16B2E3C694C7597E1823E1E61EF06545> >, Accessed on: 06 June 2018. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0953756204001431>

LIMA, A.M. Podridão radicular da mandioca causada por *Phytophthora* sp.: propagação, metodologia de inoculação e prospecção de genes de resposta. 2017. 131f. **Tese de Doutorado**. Curso de pós-graduação em agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém.

LORENZI, J.O.; RAMOS, M.T.B.; MONTEIRO, D.A.; VALLE, T.L. & GODOY JUNIOR, G. Teor de ácido cianídrico em variedades de mandioca cultivadas em quintais do estado de São Paulo. **Bragantia**, v.52, p.1-5, 1993. Available on: < <http://www.scielo.br/pdf/brag/v52n1/01.pdf> >, Accessed on: 06 June 2018.

MICHEREFF, S.J. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. **1.ed.Pernambuco: UFRPE**. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. p.399, 2005. Available on: <file:///C:/Users/jonny/Downloads/Michereffetal.2005.pdf>, Accessed on: 06 June 2018.

OLIVEIRA, A.S.S. DE; HOHENFELD, C.S.; SANTOS, V. DA S.; HADDAD, F. & OLIVEIRA, E.J. Resistance to *Fusarium* dry root rot disease in cassava accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1414-1417, 2013. Available on: < [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-04X2013001000014&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-04X2013001000014&script=sci_arttext&tlng=es) >, Accessed on: 06 June 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013001000014>

ONYEKA, T.J., DIXON, A.G.O. & EKPO E.J.A. Assessment of laboratory methods for evaluating cassava genotypes for resistance to root rot disease. **Mycopathologia**, v.159, p.461-

467, 2005. Available on: < <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11046-004-6156-z.pdf> >, Accessed on: 06 July 2018. DOI: 10.1007/s11046-004-6156-z

OKECHUKWU, R.U.; DIXON, A.G.O.; AKORODA, M.O.; MWANGI, M. & BANDYOPADHYAR, R.R. Root rot resistance in new cassava varieties introduced to farmers in Nigeria. **Experimental Agriculture**, v.45, p.15-24, 2009. Available on: < <https://www.cambridge.org/core/journals/experimental-agriculture/article/root-rot-resistance-in-new-cassava-varieties-introduced-to-farmers-in-nigeria/FEB730C9311F5DB87B71F004DE1A428B> > Accessed on: 06 July 2018. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0014479708006777>

OLIVEIRA, J.A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). 1991. 111f. **Dissertação de Mestrado**. Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

POLTRONIERI, L.S.; TRINDADE, D.R.; SILVA, H.M. & ALBUQUERQUE, F.C. Patógenos associados à podridão mole de raízes de mandioca no estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.111-111, 1997. Available on: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/397923/1/256.pdf>, Accessed: 06 July 2018.

RADMER, E.U.; ANDERSON, G; MAVICKE, D.M. *Pythium*, *Phytophthora*, and *Phytophthora* spp. associated with soybean in Minnesota, their relative aggressiveness on soybean and corn, and their sensitivity to seed treatment fungicides. **Plant Disease**, v.101, p.62-72, 2017. Available on: < <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-02-16-0196-RE> >, Accessed on: 06 Juny 2018. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0196-RE>

RODRIGUEZ-PADRON, C.; SIVERIO, F.; PEREZ-SIERRA, A. & RODRÍGUEZ, A. Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species and *Phytophthora* recovered from avocado orchards in the Canary Islands, including *Phytophthora niederhauserii* as a new pathogen of avocado. **Phytopathologia Mediterranea**, v.57, p.89-106, 2018. Available on: < <http://fupress.net/index.php/pm/article/view/22022>>, Accessed on: 06 July 2018. DOI: [http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-22022](http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-22022)

ROMERO, S. & GALLEGLY, M.E. Oogonium germination in *Phytophthora infestans*. **Phytopathology**, v.53, p.899-903, 1963.

SIA, E.F.; MARCON, J.; LUVIZOTTO, D.M.; TSUI, S.; PEREIRA, J.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. & AZEVEDO, J.L. Endophytic fungi from the Amazonian plant *Paullinia cupana* and from *Olea europaea* isolated using cassava as an alternative starch media source. **SpringerPlus**, v.2, p.1-9, 2013. Available on: < <https://link.springer.com/article/10.1186/2193-1801-2-579> >, Accessed on: 06 July 2018. DOI: 10.1186/2193-1801-2-579



- SILVA, J.L. DA & TEIXEIRA, R.N.V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agro@mbiental**, v.6, p.47-52, 2012. Available on: < <https://revista.ufr.br/agroambiente/article/view/604> >, Accessed on: 06 Juny 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v6i1.604>
- SILVA, F. DE A.S. & AZEVEDO, C.A.V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, p. 3733-3740, 2016. Available on: < <http://www.academicjournals.org/journal/AJAR/article-full-text-pdf/5E8596460818>>, Accessed on: 06 July 2018. DOI: 10.5897/AJAR2016.11522
- TREMACOLDI, C. Manejo das principais doenças da cultura da mandioca no estado do Pará. In: Modesto Junior M de S & Alves RNB (Eds.) Cultura da mandioca: aspectos socioeconômicos, melhoramento genético, sistemas de cultivo, manejo de pragas e doenças e agroindústria. Brasília, **Embrapa**, p.161-170, 2016. Available on: < <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1056630/1/LivroMandioca2016.pdf> >, Accessed on: 06 July 2018.
- VILLA, N.O.; KAGEYAMA, K. & ASANO, T. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and beta-tubulin gene sequences. **Mycologia**, v.98, p.410-422, 2006.
- VILAS BOAS, S.A.; HOHENFELD, C.S.; OLIVEIRA, S.A.S.; SANTOS, V.S. & OLIVEIRA, E.J. Sources of resistance to cassava root rot caused by *Fusarium* spp.: a genotypic approach. **Euphytica**, v.209, p.237-251, 2016.

**Table 1:** Mycelial growth index (MCI em mm) of *Phytophthium* sp., causal agent of soft root rot in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in two luminosity levels and six culture media.

Treatment	Luminosity			
	12h light		Total darkness	
SCDA	68.59	aB	69.47	aA
BCDA	68.15	aB	68.93	aA
V8CC	62.57	bB	64.19	bA
CDA	62.47	bB	64.42	bA
PDA	61.72	cB	63.00	cA
V8	57.59	dB	62.88	cA

The lower-case letters indicate significant differences in the MCI among the culture media and the upper-case letters indicate differences between luminosity regimes. MCI was measured and expressed in centimeters (cm).

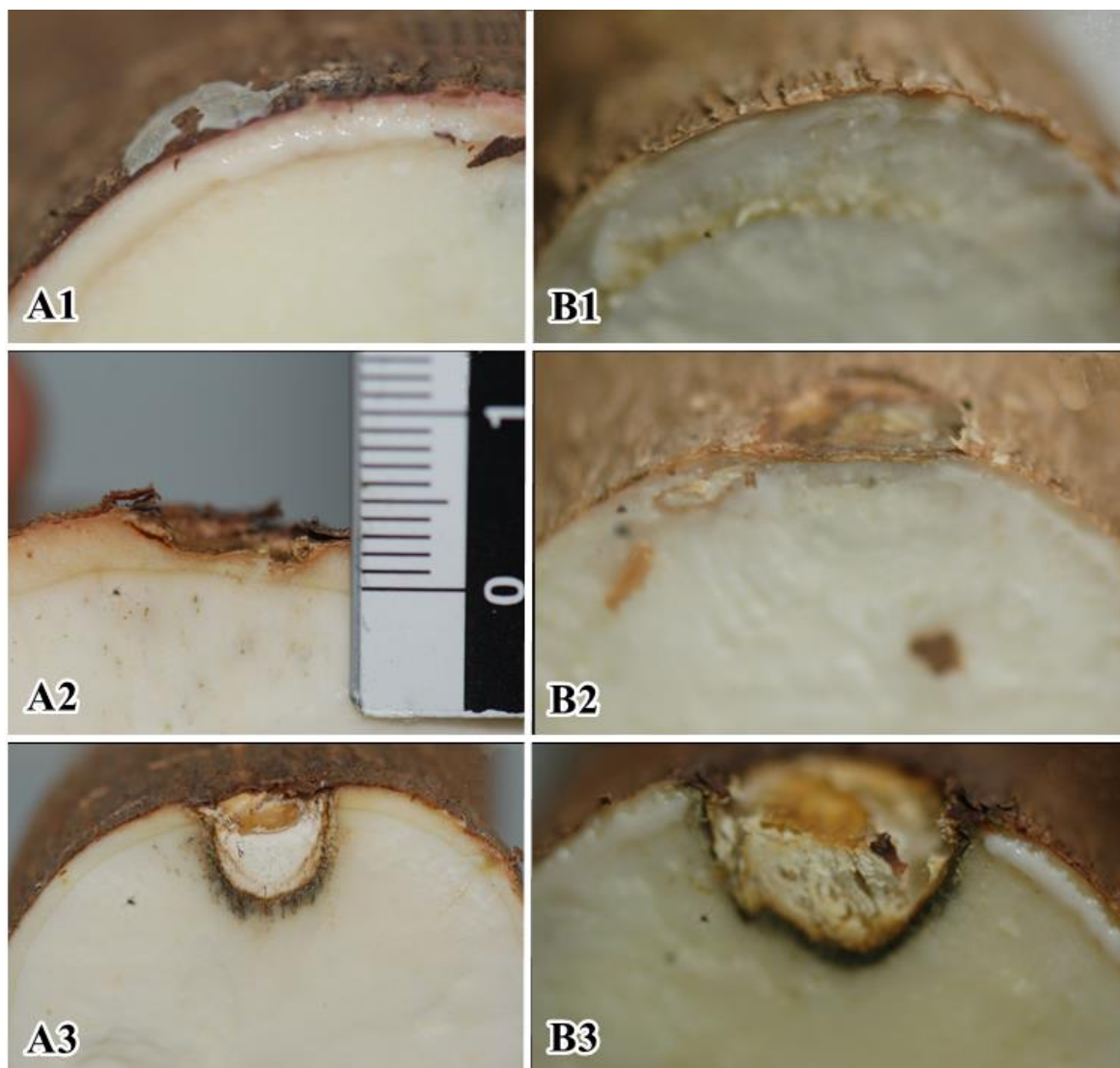
\*bitter cassava dextrose agar (BCDA); sweet cassava dextrose agar (SCDA), V8 juice with CaCO<sub>3</sub> (V8CC), V8-agar (V8), potato dextrose agar (PDA), and carrot dextrose agar (CDA)

**Table 2:** Sporulation, measured in  $10^5$  sporangia/ml of *Phytophthium* sp., causal agent of soft root rot in cassava (*Manihot esculenta* Crantz), in six culture media and two luminosity regimes

Sporulation				
Treatment	Luminosity			
	12h Light		Total darkness	
SCDA	5.40	aB	6.80	aA
BCDA	4.01	bB	4.84	bA
V8CC	3.18	cA	2.26	dB
PDA	3.04	cA	2.73	cB
V8	2.45	dA	1.28	fB
CDA	0.95	eB	1.81	eA

The lower-case letters indicate significant differences in sporulation among the culture media and the upper-case letters indicate differences between luminosity regimes.

\*bitter cassava dextrose agar (BCDA); sweet cassava dextrose agar (SCDA), V8 juice with  $\text{CaCO}_3$  (V8CC), V8-agar (V8), potato dextrose agar (PDA), and carrot dextrose agar (CDA)



**Figure 1:** Different types of injuries used preceding inoculation of *Phytophthium* sp. on cassava varieties: *Manihot esculenta* Crantz, cultivar BRS Poti – tolerant (A) and cultivar CPATU 530 – susceptible (B). 1) inoculation without injury, 2) inoculation with partial (superficial) injury and 3) inoculation with deeper injury.

### **3 CAPITULO 2: ALTERAÇÕES NOS COMPONENTES PROTÉICOS DE RAÍZES DE MANDIOCA INOCULADAS COM *Phytophthium* sp., CAUSADOR DA PODRIDÃO MOLE DA RAIZ**

Jonny Lúcio de Sousa Silva, Elisa Ferreira Moura, Roberto Lisboa Cunha, Alessandra Keiko Nakasone, Rafael Borges da Silva Valadares, Sidney Vasconcelos do Nascimento, Marcelo Murad Magalhães

#### **RESUMO**

A cultura da mandioca apresenta diversos problemas fitossanitários e entre as principais doenças que acometem a cultura, a podridão radicular é a principal em regiões de clima quente e úmido. O gênero *Phytophthium* está associado à podridão mole da raiz de mandioca. Proteínas como as relacionadas a resistência a patógenos (PRs), ou a resistência sistêmica adquirida (SAR) tem papel fundamental na imunidade desencadeada por padrão PAMP e MAMPs. Além disso, plantas com SAR constitutivo reagem mais rapidamente e com vigor ao ataque de patógeno subsequente. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão diferencial proteica de raízes destacadas de acessos de mandioca tolerantes e suscetíveis a podridão mole da raiz, inoculadas ou não com o patógeno *Phytophthium* sp.. As proteínas foram extraídas de duas amostras compostas de três raízes em duas condições (inoculada e não-inoculada) para os dois acessos (suscetível e tolerante). As proteínas foram analisadas no equipamento 2D-UPLC-MS<sup>E</sup>. Na comparação dos dois acessos sob condição de inoculação, foram identificadas 860 proteínas já descritas como de *Manihot esculenta*, das quais 341 foram diferencialmente expressas de acordo com  $\log_2$  fold change  $\geq 1$  e  $\log_2$  fold change  $\leq -1$ . Em seguida, houve a seleção das proteínas com base na expressão diferencial considerando  $p \leq 0,01$ , resultando em 140 proteínas diferencialmente expressas, onde 63 foram categorizadas como: 18 proteínas relacionados a patógeno, 17 a estresse oxidativo, 13 ao metabolismo energético e 15 a estresse abiótico. Por tanto, os acessos de mandioca tiveram uma boa resposta da interação planta-patógeno, sobressaindo diversas proteínas diferencialmente expressas relacionadas com estresse biótico como endoquitinase, taumatina, proteína PR-4 e provável cinamil álcool desidrogenase. Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase.

Palavras chaves: *Manihot esculenta*, Proteômica, interação planta patógeno

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as principais doenças que acometem a cultura da mandioca, destacam-se as podridões radiculares, tendo impacto econômico e social no Brasil, pois leva a grandes perdas na produtividade, inviabilizando áreas de plantio ao longo dos ciclos da cultura (Serra et al. 2009; Vilas Boas et al. 2017). Considerando as podridões moles, geralmente estão associados os patógenos *Fusarium* sp., o *Phytophthora* sp. (Okechukwu et al. 2009; Massola et al. 2016), *Phytophthium* sp. (Boari et al. 2018), *Neoscytalidium hyalinum* e o *Phytophthora melonis* (Vilas Boas et al. 2017) que acometem raízes tuberosas de reserva. Em geral, os sintomas iniciam com pequenas manchas de aspecto encharcado, descolorido com rápida evolução necrótica. Esses sintomas estão relacionados com enzimas pectinolíticas que degradam o tecido em contato (Amorin et al. 2011).

De modo geral, durante a infecção por patógeno, as proteínas de resistência das plantas (PRs) reconhecem os fatores de avirulência de patógenos (Avr) e iniciam a resposta hipersensibilidade (HR) e, interagindo fisicamente entre si durante a infecção causando, em última instância, apoptose (morte celular programada) no local da infecção (Coll et al. 2011; Hong et al. 2017), caracterizando resistência vertical de gene a gene, ou seja, o alelo Avr codifica um elicitor que é reconhecido por um receptor codificado pelo alelo R na planta hospedeira, induz uma rota de transdução de sinais que ativam os genes envolvidos na resposta de HR (Bespalhok et al. 2007). Ademais, as PRs podem ser induzidas por MAMPs (padrões moleculares associados a microrganismos) como os oligômeros de quitina liberados das paredes celulares dos fungos durante a infecção, que são reconhecidos no apoplasto e desencadeiam a ativação das PRs (Jashni et al. 2015). Ocorrendo um novo processo infeccioso, desencadeado por patógenos, podem conferir as plantas mais resistência a um amplo espectro de espécies de fitopatógenos (resistência sistêmica adquirida, SAR). Plantas com SAR ativado exibem expressão sistêmica aumentada para proteínas PR antimicrobianas e outras respostas imunes aumentadas. Além disso, plantas com SAR ativada reagem mais rapidamente e com vigor a ataques de patógenos subsequentes (Bernsdorff et al. 2016).

As alterações metabólicas baseadas em proteínas são facilmente identificadas pelo proteômica. Nascimento et al (2018) em seu trabalho com dendê (*Elaeis guinensis* Jacq.) usou a proteômica a fim de estudar as alterações metabólicas causadas pela interação planta-patógeno. Onde estudou níveis de acumulação de proteínas em função da severidade dos sintomas do AF (amarelecimento fatal).

Para o entendimento da interação planta-patógeno (mandioca e *Phytophythium*), fez-se uso de ferramentas de análise avançadas, 2D-UPLC cromatografia bidimensional, acoplados a detectores de massas, no intuito de se identificar e quantificar um conjunto de proteínas diferencialmente expressas, durante a inoculação sob condições controladas. Para tal, alteração de perfil protéicos em raízes inoculadas de mandioca auxiliarão o entendimento da interação mandioca-*Phytophythium* sp., com a possibilidade de promover uma melhor descrição das principais proteínas envolvidas na resposta da planta ao patógeno. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão diferencial protéica de raízes destacadas de acessos de mandioca tolerantes e suscetíveis à podridão mole da raiz, inoculadas com o patógeno *Phytophythium* sp. e identificar proteínas que estejam ligadas a tolerância ou a resposta suscetível ao patógeno.

## **2.MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal**

Foram selecionados dois acessos de mandioca: um com histórico de suscetibilidade a podridão mole da raiz, genótipo CPATU 530 e o acesso BRS Poti com tolerância a podridão mole da raiz. Ambos os acessos estão depositados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de mandioca da Embrapa Amazônia Oriental Belém-PA. Os dois acessos foram plantados em Belém, PA, Brasil, em área livre da ocorrência da doença. A região de Belém possui clima tropical úmido, com temperatura média anual de 27 °C e precipitação média anual de 2500 mm (INMET 2017). As plantas foram cultivadas a pleno sol, sob espaçamento de 1,0 x 1,0 m em fileiras de dez plantas por acessos. A condução da cultura seguiu as recomendações preconizadas no sistema de produção da mandioca (Mattos e Cardoso 2003).

### **2.2. O isolado de *Phytophythium* sp.**

O isolado CT 0084 de *Phytophythium* sp. foi obtido da micoteca da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA, e usado em todos os ensaios. O isolado foi preservado pelo método de Castellani de preservação, mais adequado para oomicetos (Clark e Dick 1974).

Para uso no experimento, o isolado foi repicado para o meio BDA (200g de batata cortada, 20g de ágar e 20g de dextrose para cada litro de água destilada autoclavada) e após 7 dias de incubação no escuro, o patógeno foi novamente repicado para MMDA (mandioca mansa dextrose ága) e mantido a 25 °C ± 2 °C por 7 dias. Em seguida, foi realizado um teste de patogenicidade em raízes destacadas de mandioca seguindo a metodologia proposta por Onyeka et al. (2005) adaptada por Oliveira et al. (2013), para só então serem utilizados nos experimentos.

### **2.3. Ensaio de inoculação de *Phytophthium* sp. em raízes de mandioca**

Foram retirados discos de 5 mm de diâmetro de meio de cultura MMDA contendo micélio para inoculação em raiz destacada, seguindo metodologia adaptada por Oliveira et al. (2013). No tratamento de infecção, foram inoculados em raízes destacadas com 12 meses de idade dos acessos suscetível e tolerante, três discos de 5 mm de diâmetro contendo o patógeno, e no tratamento controle foi realizada a inoculação de discos contendo meio MMDA sem o patógeno.

As raízes foram previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio 0,01% e depois feridas com furador de 5mm de diâmetro esterilizado (flambado). Após a inoculação, os ferimentos gerados foram envolvidos com parafilme (da marca Parafilm), para manter a umidade em uma pequena câmara. As raízes foram irrigadas duas vezes por dia com água destilada e autoclavada, até o final do período de incubação, metodologia adaptada de Oliveira et al. (2013) e Vilas Boas (2016). As raízes, foram submetidas ao corte transversal, a fim de constatar a evolução da doença no interior da raiz após 7 dias. A fim de acentuar o contraste entre a raiz controle e a raiz inoculada, foram utilizadas as raízes que apresentaram maiores áreas necrosadas para a extração de proteínas.

### **2.4. Extração e quantificação de proteínas**

A extração foi realizada a partir de quatro amostras compostas, constituídas por três raízes em duas condições (inoculada e não-inoculada), com um genótipo suscetível (CPATU 530) e outro tolerante (BRS Poti) a podridão mole da raiz. As três raízes de cada acesso em cada uma das condições foram homogeneizadas em apenas uma amostra, afim de diminuir o efeito da interação genótipo x ambiente.

As amostras foram maceradas separadamente em nitrogênio líquido. Em cada amostra, foram adicionados 10 mL de tampão contendo sacarose 1,5 M, Tris-HCL 1 M (pH 8), SDS 10% (dodecilsulfato de sódio) PMSF 100 mM (fluoreto de metilfenilsulfonil), PVPP (polivinilpolipirrolidona) e H<sub>2</sub>O ultrapura, com a adição de 100 µL de inibidor de proteases (*Protease Inhibitorcocktail*- P8340 Sigma-Aldrich) e 500 µL de β-mercaptoetanol. As amostras foram mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente até serem sonicadas por aproximadamente cinco repetições de 30 segundos. Em seguida, os extratos foram divididos em dez microtubos de 5 ml cada, adicionando-se 700 µL de fenol por microtubo (Wang et al. 2006).

As amostras foram vortexadas por 15 segundos e centrifugadas por oito minutos a 14.000 rpm, para separação da fase fenólica, que foi transferida para novo microtubo e em seguida novamente centrifugadas a 14.000 rpm por oito minutos para eliminar resíduo da fase aquosa



ou de SDS. Foram adicionados 1300  $\mu\text{L}$  de acetato de amônia em metanol ambos 100% para a precipitação das proteínas por aproximadamente 24 horas à  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . Decorrido o tempo de 24h, uma nova centrifugação foi realizada a 14.000 rpm por oito minutos, sendo posteriormente descartado o sobrenadante. O precipitado foi transferido para um novo microtubo e lavado por quatro vezes com acetona 80 %. Uma última lavagem foi realizada com etanol 70 % e o precipitado foi seco à temperatura ambiente em concentrador à vácuo por aproximadamente sete minutos. Os extratos foram solubilizados em 200  $\mu\text{L}$  de tampão de uréia (7 mols. $\text{L}^{-1}$ ) e tiouréia (2 mols. $\text{L}^{-1}$ ) (Wang et al. 2006).

Para cada uma das quatro amostras, foram realizadas três extrações. As quantificações das proteínas foram realizadas em equipamento Qubit 2.0 (Invitrogen).

### **2.5. Digestão de proteínas**

Na digestão se utilizou 50  $\mu\text{g}$  do produto final da extração, de cada amostra. Sendo completadas com uréia 8 M para um volume final de 150  $\mu\text{L}$  cada. O primeiro passo na digestão foi a redução de proteínas com ditioneitol (DTT, 5 mM), incubando-as por 25 minutos a  $56\text{ }^\circ\text{C}$ , seguida pela alquilação com iodoacetamida (IAA, 14 mM) por 30 minutos em temperatura ambiente. A remoção de IAA residual foi realizada adicionando novamente DTT (5 mM), com incubação de 15 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram diluídas em 1:5 de bicarbonato de amônio (50 mM), seguida pela adição de  $\text{CaCl}_2$  (1 mM). A digestão foi realizado com tripsina (20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) por 16 horas à  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , em seguida adicionado ácido trifluoacético (TFA) na concentração final de 0,4 % do volume das amostras para interromper a reação enzimática.

### **2.6. Dessalinização das amostras**

As amostras foram submetidas às colunas *Sep-Pak* C18 de 50 mg de fase sólida e 1 mL de capacidade. As colunas foram ativadas com 3 mL de acetonitrila (ACN, 100 %), em seguida equilibrada com 1 mL de ACN 50 % contendo 0,1 % de ácido fórmico, e 3 mL de ácido trifluoacético 0,1 %. As colunas foram carregadas com as amostras individualmente e lavadas com 3 mL de ácido trifluoacético 0,1 %, sendo equilibradas com 1 mL de ácido fórmico 0,1 %. A eluição foi realizada em 2 mL e 1 mL de ACN 50 % e 80 %, respectivamente, contendo 0,1 % de ácido fórmico. Por fim as amostras foram secas em concentrador a vácuo e ressuspensas em 50  $\mu\text{L}$  de formiato de amônio (10 mM) (Nascimento et al. 2018). Antes de injetar no 2D-UPLC-MS.

### **2.7 2D-UPLC-MS<sup>E</sup>**

Nesse passo da metodologia, foi utilizado o cromatógrafo Nano Acquity UPLC (Waters), configurado para um fracionamento em duas dimensões. Na primeira dimensão foi utilizada

uma coluna analítica de 5 µm XBridge™ BEH130 C18 (300 µm x 50 mm) em um fluxo de 2 µL por minuto. A segunda dimensão foi montada com uma coluna *trap* C18, 5 µm (180 µm x 20 mm) e uma coluna analítica 1.7 µm BEH130™ C18 1.8 µm (100 µm x 100 mm) em um fluxo de 400 nL.min<sup>-1</sup>. As amostras foram separadas em 5 frações a partir de um gradiente de 10.8, 14.0, 16.7, 20.4 e 65.0 % de acetonitrila.

O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas ESI-Q-ToFSynapt G2S (Waters) configurado para operar em modo positivo, e fragmentação contínua (MS<sup>E</sup>) com a energia de colisão oscilando entre 5 a 40 eV. Foram adquiridos espectros de massas dentro da faixa de 50 a 1200 Da, com *scan* de 0,5 segundos e um intervalo entre *scans* de 0,1 segundos. A largura do pico e resolução dos espectros de massas foram configurados no modo automático. O peptídeo (*lockmass*) [Glu-1]-fibrinopeptídeo, de massa 785.4827 Da e cargas <sup>+2</sup>, foi utilizado como referência e lido a cada 30 segundos (segundo configurações do *lockmass spray*).

## 2.8. Bioinformática

Os dados brutos foram processados com o programa Proteinlynx Global Server (PLGS) 3.0.2, utilizando a base de dados de *Manihot esculenta* 43286 sequencias obtida no site do NCBI (Resource Protein, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/425892087>). A identificação das proteínas foi estabelecida na probabilidade de identificação dos peptídeos maior que 90%, calculada pelo algoritmo *Peptide Prophet*, e as proteínas com 95 % (Nesvizhskii et al. 2003). A validação dos resultados, quantificação relativa e as tabelas de alterações de níveis proteicos foram geradas no Scaffold 4 (Proteome Software), a última com algumas modificações. Neste mesmo programa foi aplicado o teste de permutação considerando p<0.1 e selecionadas um grupo de proteínas com p>0.01. A anotação funcional das proteínas foi realizada no programa Blast2GO versão 4.0 (Biobam).

Foi realizada ainda uma seleção bruta com base nas informações obtidas no site do UniProt (ResourceProtein, <http://www.uniprot.org/uploadlists/>), e das funções proteicas relacionadas com resposta a estímulos (Biotico), estresse oxidativo, metabolismo de energético e estresse abiótico.

Os dados de saída foram caracterizados como: JM1 (BRS Poti/ tolerante inoculado), JM2 (BRS Poti/ tolerante controle), JM3 (CPATU 530/ suscetível inoculado) e JM4 (CPATU 530/ suscetível controle).

## 2.9. Desenho experimental das análises de bioinformática

Com o auxílio do Scaffold 4, foram selecionadas as proteínas que apresentaram expressão diferencial considerando p<0.01. Em seguida, foi realizada uma seleção manual considerando

as funções básicas contidas no site: <http://www.uniprot.org/uploadlists/>, para a identificação das proteínas relacionadas ao estresse biótico, estresse oxidativo, metabolismo de energético e estresse abiótico. Objetivaram identificar quais proteínas foram acumuladas com a infecção do patógeno *Phytophthium* sp. na raiz de mandioca.

Para melhor comparar as proteínas diferencialmente expressas e função básica entre os tratamentos foi confeccionado um heatmap pelo site <http://www2.heatmapper.ca/expression/>, onde as especificações básicas alteradas foram a *Distance Measurement Method* com *Pearson* e *Clustering Method* com *Centroid linkage*.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Proteínas diferencialmente acumuladas em plantas infectadas e não infectadas pelo *Phytophthium* sp.

Comparando os perfis protéicos iniciais segundo o banco de dados base obtidos dos acessos tolerante e suscetível separadamente, foram identificadas 710 proteínas comuns entre elas. Quanto às diferencialmente expressas, para a tolerante controle foram obtidas 52 proteínas (Figura 1A) e 46 para a inoculada (Figura 1B). Considerando o genótipo suscetível, 87 proteínas foram detectadas para suscetível inoculada e 42 para controle (Figura 1A). Quando se comparou a tolerante inoculada com a suscetível inoculada, 94 proteínas foram comuns entre elas e apenas 40 proteínas foram diferencialmente expressas (Figura 1B).

As proteínas foram agrupadas de acordo com diferentes processos biológicos. Aplicando um  $p \leq 0.01$ , foram selecionadas 140 proteínas. Adequando os resultados aos objetivos do estudo, foi necessária uma nova seleção baseada na relação planta-patógeno. Neste contexto, foram selecionadas proteínas relacionadas a estresses bióticos, estresse oxidativo e metabolismo de carboidratos. Assim, foram selecionadas 63 proteínas diferencialmente acumuladas (Tabela 1), excluindo sempre as proteínas não caracterizadas (pelo baixo alinhamento com as sequências de referência no banco de dados).

As proteínas observadas na Tabela 1 foram agrupadas de acordo com seus espectros totais normalizados. O genótipo suscetível apresentou maior número de proteínas diferencialmente expressas, incluindo as proteínas de 27 a 63 da Tabela 1, totalizando 36 proteínas, sendo 30 mais acumuladas (33 a 63 da Tabela 1) nesse acesso. As proteínas mais acumuladas no genótipo tolerante foram as proteínas iniciais da Tabela 1. As proteínas de 13 a 26 foram mais acumuladas no tolerante controle, e estão relacionadas principalmente a estresse biótico e oxidativo.

Em busca de obter maior clareza dos dados e evidências de respostas bioquímicas da mandioca aos estímulos causados pelo *Phytophthium* sp., foi produzido um *heatmap*, afim de comparar as 63 proteínas em função das variáveis (tolerante e suscetível ambas inoculada e controle) agrupando-as de acordo com valores de Espectros Totais Normalizados, bem como de acordo com suas funções básicas. No *heatmap* (Figura 2), as regiões destacadas em vermelho determinam valores de  $\log_2$  fold change  $<0$  e em verde valores de  $\log_2$  fold change  $>0$ , determinando assim padrões de coloração específico para cada resposta mais ou menos acumuladas.

As proteínas relacionadas com a defesa de plantas mais acumuladas como *Peroxisomal fatty acid  $\uparrow$ beta-oxidation* (XP\_021597222.1),  *$\uparrow$ Pathogenesis-related protein PR-4-like* (XP\_021621262.1),  *$\uparrow$ Thaumatococin-like protein* (XP\_021601423.1),  *$\uparrow$ GDSL esterase/lipase-like* (XP\_021627517.1),  *$\uparrow$ Endochitinase-like* (XP\_021627349.1) e  *$\uparrow$ Glutathione S-transferase F9-like* (XP\_021620730.1) foram mais acumuladas em duas situações: nas plantas inoculadas e controle da suscetível (Tabela 1 e Figura 2).

Por outro lado, as proteínas menos acumuladas no genótipo suscetível controle foram as mesmas que se apresentaram mais acumuladas no genótipo tolerante controle. As proteínas relacionadas com a defesa de plantas em plantas inoculadas como  *$\uparrow$ PLAT domain-containing protein 3-like* (XP\_021632198.1),  *$\uparrow$ Pectinesterase 31* (XP\_021595750.1), três sequências de  *$\uparrow$ Heatshock* e *Myosin heavy chain* (XP\_021612724.1) foram mais acumuladas no controle (Tabela 1, Figura 2) da tolerante em relação ao controle da suscetível.

Dentre as 140 proteínas identificadas a partir do  $p < 0,01$ , obtivemos diversas proteínas relacionadas ao estresse oxidativo mais acumuladas, onde as proteínas  *$\uparrow$ Probable protein disulfide-isomerase* (XP\_021612090.1),  *$\uparrow$ Probable nucleoredoxin 1* (XP\_021630912.1),  *$\uparrow$ CBS domain-containing protein CBSX3* (XP\_021601952.1) foram mais acumuladas no suscetível controle e inoculado em relação ao genótipo tolerante. Enquanto que a  *$\uparrow$ Superoxide dismutase [Cu-Zn]* (XP\_021609177.1) e *Ferritin-4* (XP\_021619150.1) foram mais acumuladas no tolerante controle do que no tolerante inoculado. A proteína  *$\uparrow$ L-ascorbate peroxidase, cytosolic-like isoform X2* (XP\_021610874.1) uma proteína com grande importância para o metabolismo oxidativo, foi mais acumulada na tolerante controle e suscetível controle e inoculado (Tabela 1). Para a tolerante inoculada foram superexpressas apenas três proteínas uma  *$\uparrow$ Chaperone* (XP\_021615851.1) e duas variantes de  *$\uparrow$ DJ-1* (XP\_021607432.1; XP\_021592628.1).

Outro grupo de proteínas não menos importantes, foram aquelas relacionadas ao metabolismo energético (Tabela 1, Figura 2). Nesse grupo de proteínas, foram identificadas

diversas proteínas, entre elas a ↑*NADP-dependent malic enzyme* (XP\_021596446.1), que está diretamente relacionada ao metabolismo do malato, que por sua vez está associada ao metabolismo energético do ciclo de Krebs. Esta proteína foi presente apenas no suscetível controle e inoculado (linha 51 da Tabela 1), assim como a ↑*pyrophosphate-fructose 6-phosphate* (XP\_021613305.1), que está relacionada com a biossíntese da frutose-6-fosfato, componente fundamental na rota oxidativa das pentoses-fosfato.

As proteínas relacionadas ao estresse abiótico foram basicamente de reposta a temperatura (frio/ calor), íons inorgânicos e sais. Essas proteínas foram detectadas em ambos os tratamentos, como as proteínas ↑*Chaperone protein ClpB4, mitochondrial* (XP\_021607240.1), ↑*5-methy tetrahydropteroy triglutamate* (XP\_021610267.1), ↑*Formate--tetrahydrofolate ligase* (XP\_021607315.1) e ↑*Small heat shock protein, chloroplastic* (XP\_021619516.1).

#### 4. Discussão

Cada proteína tem sua função própria que a caracteriza dentro de sua classificação, para melhor visualizar e exemplificar uma rota de defesa de forma sintetizada. Com base nas proteínas mais acumuladas com o  $\uparrow p \leq 0.01$ , em tecidos de raízes de mandioca atacadas, foi sugerido uma resposta ao ataque de patógenos (Figura 3). A célula sob o estímulo de elicitores, liberados pelo patógeno, desencadeia uma cascata de reações que culmina na síntese de proteínas direcionadas a defesa que conferem resistência como a *calmodulin* (Figura 3) (encontrada no rol de resultados com  $p > 0,01$ ), que está diretamente ligada a biossíntese de ácido jasmônico (Taiz e Zeiger, 2017), sendo relacionada a defesa a patógenos, nesse caso específico, ao oomicetos.

Dentre os oomicetos, os do gênero *Phytophthora* têm a capacidade de infectar diferentes espécies de plantas, crescendo inicialmente como biotróficos, em seguida mudando para uma fase necrotrófica. Após a penetração da parede celular por apressórios, os oomicetos geram hifas vegetativas que crescem inter-celularmente, e haustórios se desenvolvem como ramos laterais de hifas intercelulares, terminando por penetrar em células hospedeiras. Na fase de infecção, o oomiceto patogênico e necrotrófico estabelece a infecção a partir da germinação do esporo e em seguida há o lançamento do tubo germinativo e do opressório, que ao ser favorecido pela topografia da superfície, libera enzimas de degradação da parede celular (Fawke et al. 2015), provocando uma serie de sinalizações que desencadeia uma cascata de reações como resposta da planta.

O esquema apresentado na Figura 3 mostra uma pequena fração do que ocorre na planta durante uma infecção. Podemos observar em “1F (Fase 1 de resposta)” da Figura 3 o

estabelecimento do patógeno com a liberação do eliciador, que em seguida é rapidamente reconhecido por um receptor inerente da planta. Esse receptor pode estar atuando no NADPH oxidase (2F) promovendo a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio extracelular. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ao entrar na célula, atua como espécie reativa de oxigênio extremamente tóxico ao metabolismo, este por sua vez irá induzir resposta a hipersensibilidade, com biossíntese de fitoalexina, lignina, ácido salicílico e de enzimas hidrolíticas (Figura 3).

Na Figura 3, a biossíntese de Ácido salicílico está relacionada a resistência sistêmica com produção de proteínas como a ↑*EG45-like domain containing protein* (XP\_021634516.1) (Tabela 1) que atua ao primeiro contato com o patógeno, gerando resistência da planta, ou seja, a resistência é basicamente pontual e abrange a região de infecção. Marazo et al. (2015), em seu trabalho com acerola, mostrou que o ácido salicílico ativa rotas de defesa vegetal (proteínas PR quitinases e β-1,3-glucanase), rota dos fenilpropanóides (com alteração na atividade da fenilalanina amônia-liase) e nos compostos do metabolismo secundário (antocianinas e flavonoides).

O ROS (espécies reativas de oxigênio) como mediador na resposta a hipersensibilidade pode estar induzindo a produção de ↑*peroxidase 15-like* (XP\_021595914.1) na suscetível (controle e inoculada) (Tabela 1), proteína responsável pela quebra dessas espécies reativas de oxigênio. A morte celular por hipersensibilidade é um mecanismo de defesa, caracterizado pela rápida morte celular no local da infecção, restringindo o crescimento fungico. Esse mecanismo pode ser caracterizado pelo reconhecimento inicial de PAMPS (padrões patogênicos associados a patógenos) evitando a entrada do patógeno pela membrana plasmática do hospedeiro (Danna et al. 2011) e pelo aumento no influxo de Ca<sup>2+</sup> (Lee et al. 2011) como no mecanismo descrito 3F (Figura 3) que consiste no bombeamento de Ca<sup>2+</sup> para dentro da célula. Estes íons cálcio, ao entrar na célula, associam-se a *calmodulin* [(XP\_021614276.1), p>0.01] para formar CAM-Ca<sup>2+</sup> que também desencadeará a biossíntese de ácido salicílico, produção de fitoalexinas, ligninas, enzimas hidrolíticas e resposta a hipersensibilidade (Figura 3) (Taiz e Zeiger 2017). Ao nível de membrana existe a cooperação de um sistema integrado de sinalização, englobando proteínas canais na mudança de potencial de concentração. Um importante integrante desse sistema é o cátion cálcio, por ser mantido em baixas concentrações no citosol e quando ocorre o seu aumento há reconhecimento e ativação do mecanismo de defesa (Lamb e Dixon, 1997) (Figura 3).

Na biossíntese de fitoalexinas, dentre todas as na literatura, a maioria deriva da via biossintética dos fenilpropanóides, que são uma classe de compostos orgânicos sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina intermediada pelo *phenylalanine ammonia-lyase I*

[(XP\_021622419.1),  $p > 0.01$ ] (Figura 3). As plantas geralmente produzem mais de 100.000 produtos de baixo peso molecular conhecidos como metabólitos secundários, alguns desses atuam na defesa contra patógenos de plantas como as fitoalexinas (Arruda et al. 2016).

Outro composto importante na relação planta x patógeno é a biossíntese de lignina, que pode ser regulada pela proteína  $\uparrow$ *probable cinnamyl alcohol dehydrogenase* (XP\_021602317.1) (Figura 3) diferencialmente expressa na tolerante inoculada. O *cinnamyl alcohol dehydrogenase* (CAD) catalisa a redução final dos cinamaldeídos aos seus correspondentes alcoólicos, que por fim são oxidados e usados para formar polímeros de lignina (Hao e Mohnem, 2014).

Para finalizar a Figura 3, temos a biossíntese de enzimas hidrolíticas como a  $\uparrow$ *endochitinase* (XP\_021601423.1), uma variável de quitinase, encontrada apenas na suscetível (inoculada e controle). Esta enzima é extremamente importante na defesa de plantas contra patógenos, já que a quitina é um dos principais componentes das células fúngicas e é um proeminente PAMP indicando a presença de injúrias nas plantas. Portanto, as plantas evoluíram produzindo proteínas que hidrolisam quitinas conhecidas como quitinases, para atacar pragas ou patógenos e gerar oligômeros de quitina para atuar como SAR (Das et al. 2015).

Os elicitores liberados pelos patógenos durante o processo de infecção também podem estar atuando nas mitocôndrias e produzindo o  $\uparrow$ *peroxisomal fatty acid* (XP\_021597222.1), uma proteína peroxissomal, precursora do ácido jasmônico, este por sua vez irá atuar no peroxissomo seguindo para o cloroplasto produzindo o ácido linolênico (Wasternack e Hause, 2013), que por sua vez irá enviar uma mensagem para o núcleo e então induzir a síntese de proteínas como a  $\uparrow$ *Thaumatococin* (XP\_021601423),  $\uparrow$ *pathogenesis related protein* (XP\_021621262.1),  $\uparrow$ *Major Allergen Pru* (XP\_021595051.1) e  $\uparrow$ *Endochitinase* (XP\_021627349) (Figura 2) (Taiz e Zeiger 2017), proteínas fundamentais na geração de resistência da planta a patógenos e foram todas mais acumuladas na suscetível.

## 5. Conclusão

Os acessos de mandioca tiveram uma boa resposta ao patógeno *Phytophthium* sp. causador da podridão mole da raiz, com diversas PRs da interação planta-patógeno, sobressaindo diferentes proteínas diferencialmente expressas relacionadas com estresse biótico, oxidativo e metabolismo energético. Esses resultados possibilitaram inferir que nos dois acessos estudados existem diversas proteínas que podem, em um estudo mais aprofundado, diferir qual acesso tem o aparato proteico capaz de resistir por mais tempo ao ataque do patógeno.

## 6. Bibliografia

- Agrios GN (2004) Plant Pathology. 5. Ed. San Diego, Califórnia: Elsevier Academic Press, 922p.
- Amorin L, Rezende J and Filho A.E.D.S. (2011) Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos, v. Volume 1: São Paulo, Lilian Amorim Jorge Alberto Marques Rezende Armando Bergamin Filho 704 p.
- Arruda RL, Paz, ATS, Bara MTF, Côrtes MVDCB, de Filippi MCC & da Conceição EC (2016) Uma abordagem sobre fitoalexinas: função, caracterização e biossíntese em plantas da família Poaceae. *Ciência Rural*, 46(7), 1206-1216.
- Bala K, Robideau GP, Lévesque CA (2010) *Phytopythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque. gen. nov. and *Phytopythium sindhum* Lodhi, Shahzad & Lévesque. *Fungal Planet* 49. *Persoonia*, 24: 136-137.
- Bespalhok FJC, Guerra EP & Oliveira R (2007) Melhoramento para resistência a doenças. Curitiba: UFPR. Disponível em: < <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/conteudo/4resistdoenc.htm>>. Acessado em, 11.
- Bernsdorff F, Döring AC, Gruner K, Schuck S, Bräutigam A, Zeier J (2016) Pipecolic acid orchestrates plant systemic acquired resistance and independent pathways. *The plant cell*, 28:102-129.
- Boari AJ, Cunha EM & AFF Quadros (2018) First Report of *Phytopythium* sp. Causing Storage Root Rot and Foliage Blight of Cassava in Brazil. *Plant disease*, 0 0:0, PDIS-09-17-1449-PDN.
- Booler T (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Reviews of Plant Physiology and Molecular Biology*, Kidlington, 46: 189-214.
- Coll NS, Epple P, Dangl JD (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ* 18:1247–1256
- Clark, G and Dick, MW (1974) Long-term storage and viability of aquatic Oomycetes. *Transactions of the Bryological Society*. London, 63:611-612.
- Danna CH, Millet YA, Koller T, Han SW, Bent AF, et al. (2011) The Arabidopsis flagellin receptor FLS2 mediates the perception of Xanthomonas Ax21 secreted peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 9286-9291.
- Das SN, Madhuprakash J, Sarma PVS RN, Purushotham P, Suma K, Manjeet K, & Podile AR (2015) Biotechnological approaches for field applications of chitoooligosaccharides (COS) to induce innate immunity in plants. *Critical reviews in biotechnology*, 35(1), 29-43.
- Dhingra V, Gupta M, Andacht T, FU ZF (2005) New frontiers in proteomics research: A perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 299: 1-18.



Fawke S, Doumane M & Schornack S (2015) Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 263-280.

Fernandes C de F, Junior JRV, Silva DSG da, Reis ND, Junior HA (2009) Mecanismo de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO. Ed.1, 18p.

Fukuda WMG, Fukuda C, Dias MC, Xavier JJBN, Fialho JF (2002) Cultivares de mandioca recomendadas para o Brasil - 2002. Cruz das Almas - BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura (Circular Técnica).

Hao Z, & Mohnen D (2014). A review of xylan and lignin biosynthesis: foundation for studying *Arabidopsis* irregular xylem mutants with pleiotropic phenotypes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(3), 212-241.

Hong JK, Hwang IS, Hwang BK (2017) Functional roles of the pepper leucine-rich repeat protein and its interactions with pathogenesis-related and hypersensitive-induced proteins in plant cell death and immunity. *An International Journal of Plant Biology*, 246: 351-364.

Instituto Nacional de Meteorologia- INMET (2017) Dados de estações automáticas, <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>. Acessado em: 11/05/2017.

Jashni MK, Mehrabi R, Collemare J, Mesarich CH, Wit PJGM de (2015) The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 6:584.

Lee H, Chah OK, Sheen J (2011) Stem-cell-triggered immunity through CLV3pFLS2 signalling. *Nature* 473: 376-379.

Mazaro S M, Chiamulera Borsatti F, Locatelli Dalacosta N, Lewandowski A, Andriago Danner M, Busso C & Wagner Junior A (2015) Qualidade pós-colheita de acerolas tratadas com ácido salicílico. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 10(4).

Massola JR NS, Bedendo IP, Oliveira SAS (2016) Doenças da mandioca. In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 5 a Ed. Ouro Fino: Ceres, 54: 515-522.

Monti M, Orrú S, Pagnozzi D, Pucci P (2006) Functional proteomics. *Clinica Chimica Acta*, 357: 140-150.

Mattos PLP e Cardoso EMR (2003) Cultivo da mandioca para o estado do Pará. <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acessado em: 23/06/2017.

Nascimento SN, Magalhães MM, Cunha RL, Costa PE de O, Alves RC de O, Oliveira GC, Valadares RB da S (2018) Differential accumulation of proteins in oil palms affected by fatal yellowing disease. *Plots one*, 1: 1-20.

Onyeka TJ, Dixon AGO, Ekpo EJA (2005) Assessment of laboratory methods for evaluating cassava genotypes for resistance to root rot disease. *Mycopathologia*, 159:461-467.

Okechukwu RU, Dixon AGO, Akoroda MO, Mwangi M, Bandyopadhyar R (2009) Root rot resistance in new cassava varieties introduced to farmers in Nigeria. *Experimental Agriculture*, 45: 15-24.

Oliveira SAS DE, Hohenfeld CS, Santos V DA S, Haddad F e Oliveira EJ (2013) Resistance to fusarium dry root rot disease in cassava accessions. *Pesquisa agropecuaria brasileira (PAB)*, Brasília, 48:1414-1417.

Silva JL de S, Moura EF, Ilkiu-Borges F, Galvão RJ, Farias-Neto JT de Silva, GB da, Rêgo MCF e Cunha RL (2017) Morphoanatomy and histochemistry analyses of cassava roots do not discriminate resistant from susceptible genotypes to soft root rot. *Acta amazônica*, 47:1-6.

Taiz L e Zeiger E (2017) *Fisiologia vegetal*. 6° ed. Porto Alegre: Artmed, 888 p.

Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG e Jones JDG (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, Washington, 268: 661-667.

Uarrota VG, Moresco R, Schmidt EC, Bouzon ZL, Nunes EC, Neubert EO, Peruch LAM, Rocha M e Marashin M (2016) The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. *Food Chemistry*, 197: 737-746.

Van Loon LC, Rep M e Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, 44: 135-162.

Vilas Boas SA, Hohenfeld CS, Oliveira SAS, Santos VS e Oliveira EJ (2016) Sources of resistance to cassava root rot caused by *Fusarium* spp.: a genotypic approach. *Euphytica*, 209: 237-251.

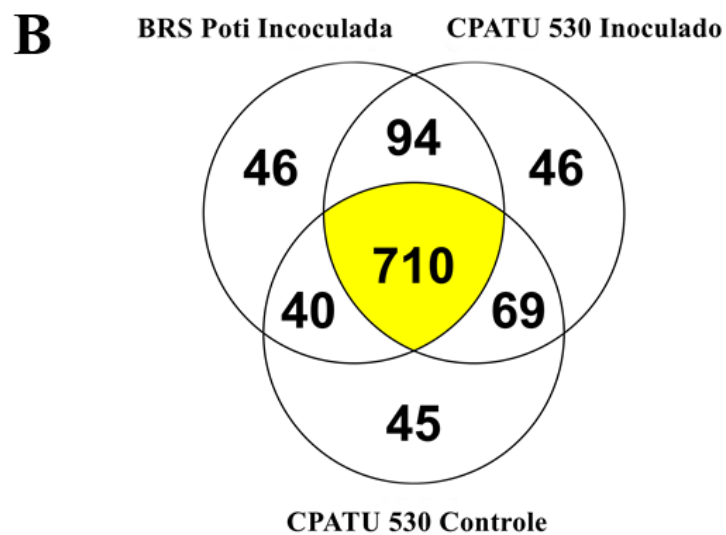
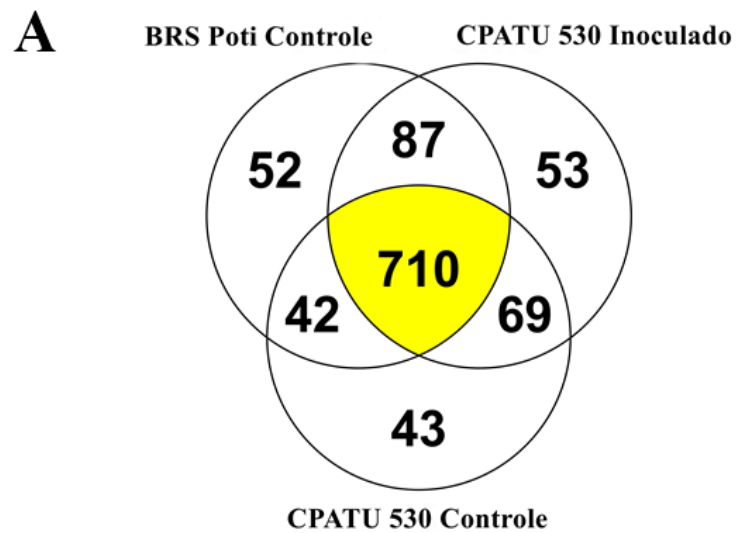
Vilas Boas AS, Oliveira SAS de, Bragança CAD, Ramos JB, Oliveira EJ de (2017) Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. *Scientia Agricola*, 74: 60-67.

Wang W, Vignani R, Scali M e Cresti M (2006) A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27: 2782-2788.

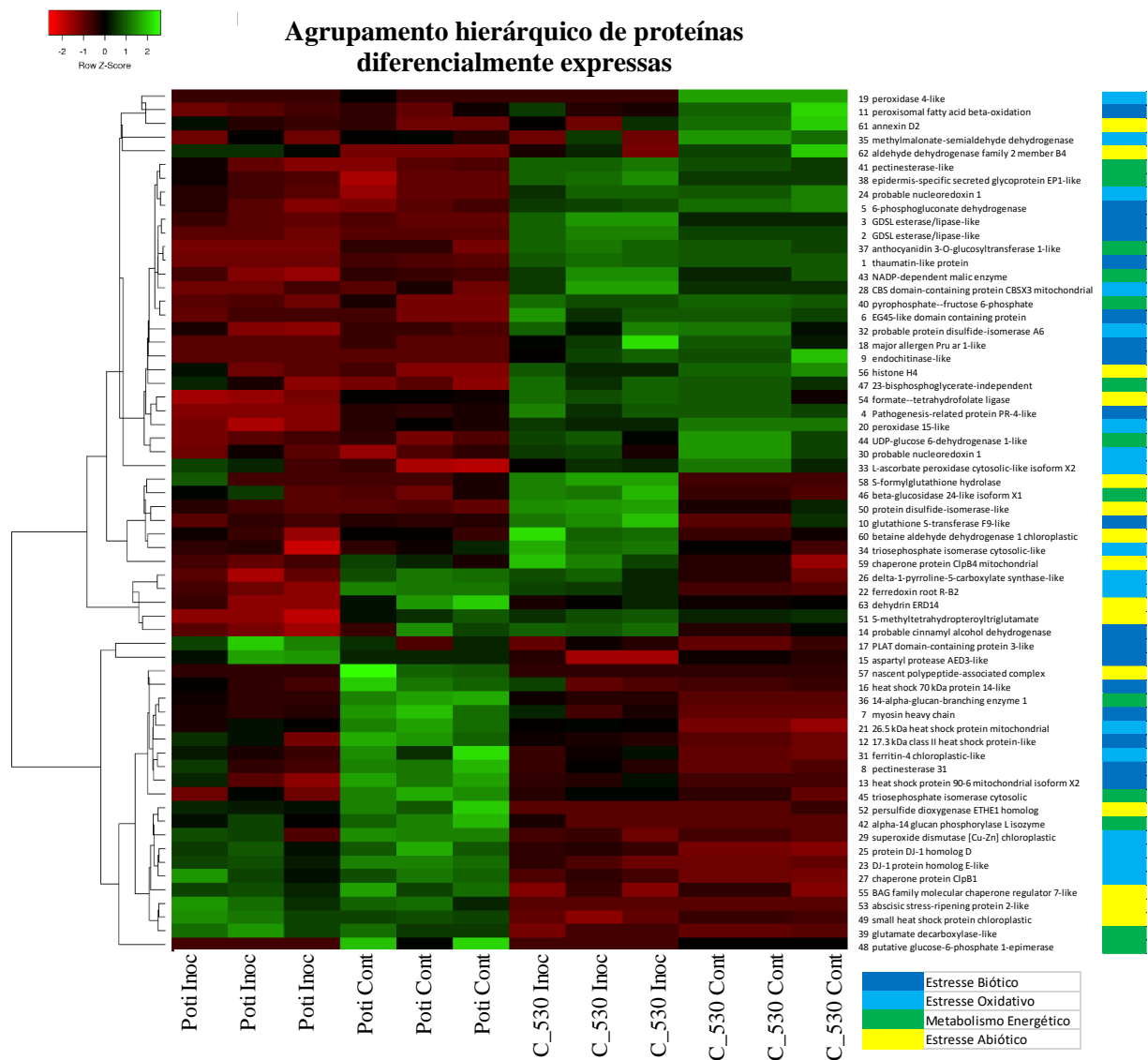
Wasternack C e Hause B (2013) Jasmonatos: biossíntese, percepção, transdução de sinal e ação na resposta ao estresse da planta, crescimento e desenvolvimento. Uma atualização para a revisão de 2007 em *Annals of Botany*. *Anais de botânica*, 111 (6), 1021-1058.

**Tabela 1:** Seleção das 63 proteínas diferencialmente expressas com base em  $p < 0.01$  em acesso tolerante e suscetível de mandioca (*Manihot esculenta*) a podridão mole da raiz em raízes destacadas inoculadas com *Phytophthium* sp.. As proteínas estão divididas de acordo com suas funções básicas. Setas para cima (em cinza) indicam valores de hiperepressas e setas para baixo (em branco) hipoeexpressas. Número de acesso no site: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

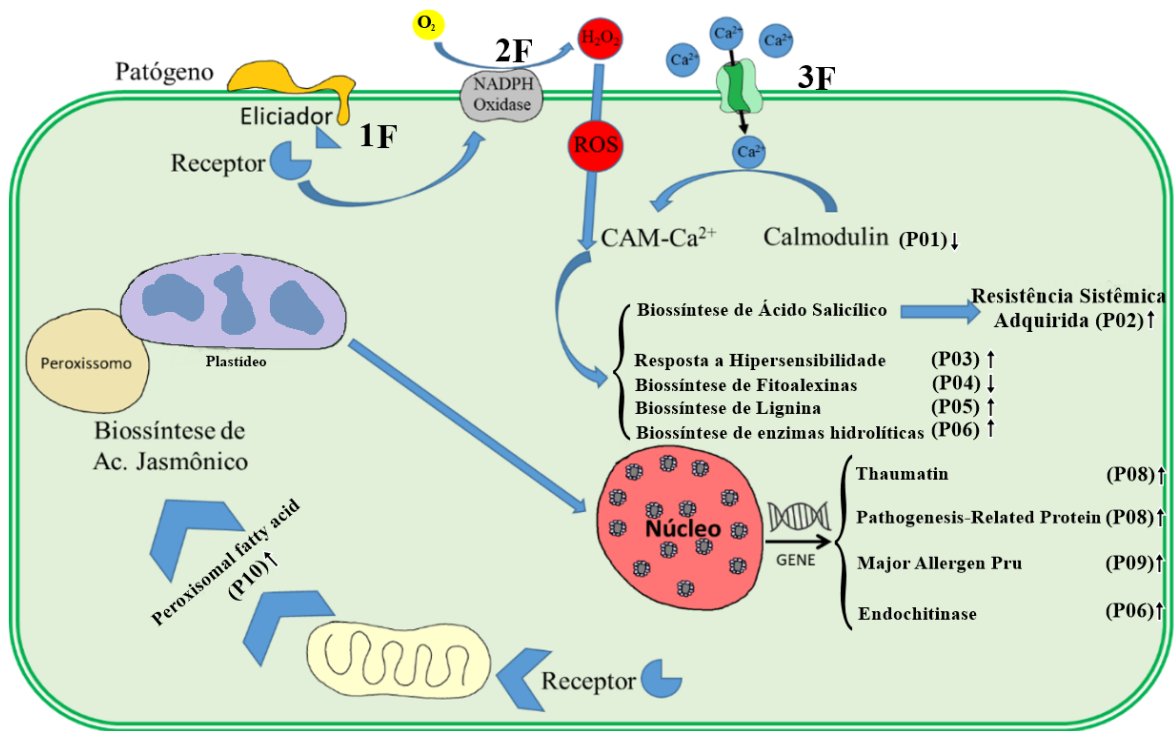
Número de acesso	Função Básica	Proteínas identificadas de <i>Manihot esculenta</i>	Tolerante Inoculada	Tolerante Controle	Suscetível Inoculada	Suscetível Controle	
1	XP_021632198.1	Estresse Biótico	PLAT domain-containing protein 3-like	↑	↓	↓	↓
2	XP_021601885.1	Estresse Biótico	Aspartyl protease AED3-like	↑	↑	↓	↓
3	XP_021607432.1	Estresse Oxidativo	DJ-1 protein homolog E-like	↑	↑	↓	↓
4	XP_021592628.1	Estresse Oxidativo	Protein DJ-1 homolog D	↑	↑	↓	↓
5	XP_021615851.1	Estresse Oxidativo	Chaperoneprotein ClpB1	↑	↑	↓	↓
6	XP_021616456.1	Met. Energ.	Glutamatedecarboxylase-like	↑	↑	↓	↓
7	XP_021619516.1	Estresse Abiótico	Small heat shock protein, chloroplastic	↑	↑	↓	↓
8	XP_021604944.1	Estresse Abiótico	Persulfidedioxygenase ETHE1 homolog	↑	↑	↓	↓
9	XP_021600123.1	Estresse Abiótico	Abscisic stress-ripening protein 2-like	↑	↑	↓	↓
10	XP_021592304.1	Estresse Abiótico	BAG family molecular chaperone regulator 7	↑	↑	↓	↓
11	XP_021610874.1	Estresse Oxidativo	L-ascorbateperoxidase, cytosolic-likeisoform X2	↑	↓	↑	↑
12	XP_021592138.1	Estresse Abiótico	Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4,	↑	↓	↓	↑
13	XP_021611292.1	Estresse Biótico	Heat shock 70 kDa protein 14-like	↓	↑	↓	↓
14	XP_021597369.1	Estresse Biótico	17.3 kDa class II heat shock protein-like	↓	↑	↓	↓
15	XP_021630848.1	Estresse Biótico	Heat shock protein 90-6, mitochondrial isoform X2	↓	↑	↓	↓
16	XP_021612724.1	Estresse Biótico	Myosin heavy chain	↓	↑	↓	↓
17	XP_021595750.1	Estresse Biótico	Pectinesterase 31	↓	↑	↓	↓
18	XP_021610372.1	Estresse Oxidativo	26.5 kDa heat shock protein, mitochondrial	↓	↑	↓	↓
19	XP_021609177.1	Estresse Oxidativo	Superoxidedismutase [Cu-Zn], chloroplastic	↓	↑	↓	↓
20	XP_021619150.1	Estresse Oxidativo	Ferritin-4, chloroplastic-like	↓	↑	↓	↓
21	XP_021620786.1	Met. Energ.	1,4-alpha-glucan-branching enzyme 1	↓	↑	↓	↓
22	XP_021605758.1	Met. Energ.	Alpha-1,4 glucan phosphorylase L isozyme	↓	↑	↓	↓
23	XP_021625499.1	Met. Energ.	Triosephosphate isomerase, cytosolic	↓	↑	↓	↓
24	XP_021616738.1	Met. Energ.	Putative glucose-6-phosphate 1-pimerase	↓	↑	↓	↓
25	XP_021610612.1	Estresse Abiótico	Nascentpolypeptide-associated	↓	↑	↓	↓
26	XP_021614140.1	Estresse Abiótico	Dehydrin ERD14	↓	↑	↓	↓
27	XP_021602317.1	Estresse Biótico	Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase	↓	↑	↑	↓
28	XP_021628542.1	Estresse Oxidativo	Ferredoxin, root R-B2	↓	↑	↑	↓
29	XP_021626266.1	Estresse Oxidativo	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase-like	↓	↑	↑	↓
30	XP_021607240.1	Abiotic stress	Chaperoneprotein ClpB4, mitochondrial	↓	↑	↑	↓
31	XP_021610267.1	Abiotic stress	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate	↓	↑	↑	↑
32	XP_021607315.1	Abiotic stress	Formate—tetrahydrofolateligase	↓	↑	↑	↑
33	XP_021621262.1	Estresse Biótico	Pathogenesis-related protein PR-4-like	↓	↓	↑	↑
34	XP_021605174.1	Estresse Biótico	6-phosphogluconate dehydrogenase	↓	↓	↑	↑
35	XP_021634516.1	Estresse Biótico	EG45-like domain containing protein	↓	↓	↑	↑
36	XP_021627517.1	Estresse Biótico	GDSL esterase/lipase-like	↓	↓	↑	↑
37	XP_021603162.1	Estresse Biótico	GDSL esterase/lipase-like	↓	↓	↑	↑
38	XP_021601423.1	Estresse Biótico	Thaumatococcal protein	↓	↓	↑	↑
39	XP_021627349.1	Estresse Biótico	Endochitinase-like	↓	↓	↑	↑
40	XP_021595051.1	Estresse Biótico	Major allergen Pruar 1-like	↓	↓	↑	↑
41	XP_021595914.1	Estresse Oxidativo	Peroxidase 15-like	↓	↓	↑	↑
42	XP_021630912.1	Estresse Oxidativo	Probablenucleoredoxin 1	↓	↓	↑	↑
43	XP_021601952.1	Estresse Oxidativo	CBS domain-containing protein CBSX3	↓	↓	↑	↑
44	XP_021630461.1	Estresse Oxidativo	Probablenucleoredoxin 1	↓	↓	↑	↑
45	XP_021612090.1	Estresse Oxidativo	Probableproteinindisulfide-isomerase A6	↓	↓	↑	↑
46	XP_021617742.1	Met. Energ.	Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 1-like	↓	↓	↑	↑
47	XP_021594181.1	Met. Energ.	Epidermis-specific secreted glycoprotein EP1-like	↓	↓	↑	↑
48	XP_021613305.1	Met. Energ.	Pyrophosphate--fructose 6-phosphate	↓	↓	↑	↑
49	XP_021610359.1	Met. Energ.	Pectinesterase-like	↓	↓	↑	↑
50	XP_021596446.1	Met. Energ.	NADP-dependentmalicenzyme	↓	↓	↑	↑
51	XP_021633444.1	Met. Energ.	UDP-glucose 6-dehydrogenase 1-like	↓	↓	↑	↑
52	XP_021620486.1	Met. Energ.	2,3-bisphosphoglycerate-independent	↓	↓	↑	↑
53	XP_021591740.1	Estresse Abiótico	Histone H4	↓	↓	↑	↑
54	XP_021620730.1	Estresse Biótico	Glutathione S-transferase F9-like	↓	↓	↓	↑
55	XP_021604434.1	Estresse Oxidativo	Triosephosphateisomerase, cytosolic-like	↓	↓	↑	↓
56	XP_021617701.1	Met. Energ.	Beta-glucosidase 24-like isoform X1	↓	↓	↑	↓
57	XP_021604639.1	Estresse Abiótico	Proteinindisulfide-isomerase-like	↓	↓	↑	↓
58	XP_021621034.1	Estresse Abiótico	S-formylglutathionehydrolase	↓	↓	↑	↓
59	XP_021616679.1	Estresse Abiótico	Betaaldehydedehydrogenase 1, chloroplastic	↓	↓	↑	↓
60	XP_021597222.1	Estresse Biótico	Peroxisomal fatty acid beta-oxidation	↓	↓	↓	↑
61	XP_021600197.1	Estresse Oxidativo	Peroxidase 4-like	↓	↓	↓	↑
62	XP_021625996.1	Estresse Oxidativo	Methylmalonate-semialdehydedehydrogenase	↓	↓	↓	↑
63	XP_021631363.1	Estresse Abiótico	Annexin D2	↓	↓	↓	↑



**Figura 1:** Agrupamento de todas as proteínas que foram expressas. Comparação entre os tratamentos das quantidades de proteínas obtidas. Em A interseção da Tolerante Controle com a SUSCETÍVEL controle e inoculada; Em B interseção da Tolerante Inoculada com a SUSCETÍVEL controle e inoculada.



**Figura 2:** Grupos de proteínas indicadas a partir do Heatmap com base em  $p < 0.01$  em acesso tolerante e suscetível de mandioca (*Manihot esculenta*) a podridão mole da raiz inoculados com *Phytophthium* sp. Correlação de Pearson e  $p < 0.01$ .



Autor: Silva (dados não publicados)

**Figura 3:** Esquema estrutural da resposta ao ataque do patógeno a uma célula de um acesso de mandioca considerado resistente a podridão mole da raiz (Tolerante). As legendas Px presentes referem-se as proteínas diferencialmente acumuladas como: ↓P01 (Calmodulin-7-like/ XP\_021614276.1), ↑P02 (EG45-like domain containing protein/ XP\_021634516.1), ↑P03 (Peroxidase 15-like/ XP\_021595914.1), ↓P04 (Phenylalanine ammonia-lyase-like/ XP\_021622419.1), ↑P05 (Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase/ XP\_021602317.1), ↑P06 (Endochitinase-like/ XP\_021627349.1), ↑P07 (Thaumatococcus-like protein/ XP\_021601423.1), ↑P08 (Pathogenesis-related protein PR-4-like/ XP\_021621262.1), ↑P09 (Major allergen Pru ar 1-like/ XP\_021595051.1) e ↑P10 (Peroxisomal fatty acid beta-oxidation/ XP\_021597222.1). Setas (↑) para cima indica as proteínas mais acumuladas com o  $p \leq 0.01$ , setas (↓) para baixo indicam proteínas com o  $p > 0.01$ .