



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

ALINE MEDEIROS LIMA

**PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA CAUSADA POR *Phytophthium* sp.:
PROPAGAÇÃO, METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO E PROSPECÇÃO DE
GENES DE RESPOSTA**

**BELÉM
2017**

ALINE MEDEIROS LIMA

**PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA CAUSADA POR *Phytophthium* sp.:
PROPAGAÇÃO, METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO E PROSPECÇÃO DE
GENES DE RESPOSTA**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da
Amazônia, como parte das exigências do Curso de
Doutorado em Agronomia para obtenção do título de
Doutor.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cláudia R. Batista de Souza

Co-orientadora: Dr.^a Elisa Ferreira Moura Cunha

**BELÉM
2017**

Lima, Aline Medeiros

Podridão radicular da mandioca causada por *Phytophthium* sp.:
propagação, metodologia de inoculação e prospecção de genes de resposta /
Aline Medeiros Lima. – Belém, 2017

131 f.

Tese (Doutorado em Agronomia / Área de Concentração Agronomi
Universidade Federal Rural da Amazônia, 2017.

Orientadora: Cláudia R. Batista de Souza.

1. *Manihot esculenta* 2. *Phytophthium sp* 3. Expressão
diferencial 4. Propagação rápida da mandioca 5. Produção de mudas I.
Souza, Cláudia R. Batista de, (orient.) II. Título

CDD: 633.682

ALINE MEDEIROS LIMA

**PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA CAUSADA POR *Phytophthium* sp.:
PROPAGAÇÃO, METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO E PROSPECÇÃO DE
GENES DE RESPOSTA**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do
Curso de Doutorado em Agronomia para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cláudia Regina Batista de Souza

Co-orientadora: Dr.^a Elisa Ferreira Moura Cunha

Aprovado em 20 de dezembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Cláudia Regina Batista de Souza – Orientadora
(UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ- ICB/UFPA)

Prof. Dr. Sávio Pinho dos Reis - 1º Examinador
(UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARÁ - UEPA)

Dr. Roberto Lisboa Cunha - 2º Examinador
(EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL)

Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro - 3º Examinador
(UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA)

Prof.^a Dr.^a Gisele Barata da Silva - 4º Examinadora
(UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA)

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –
CAPES



Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA



Universidade Federal do Pará - UFPA



Fundação Amazônia Paraense de Amparo a Pesquisa - FAPESPA



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –
CNPq



Programa de Pós Graduação em Agronomia - UFRA



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Oriental – Belém - PA

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Universidade Federal Rural da Amazônia que através do Programa de Pós-Graduação em Agronomia proporcionou a realização de meu curso de doutorado. A Universidade Federal do Pará a EMBRAPA Amazônia Oriental pelo apoio dado a pesquisa.

- Ao CNPq, FAPESPA, GOVERNO DO PARÁ e CAPES pelo financiamento do projeto de pesquisa e bolsa de estudo.

Aos professores pelos ensinamentos oferecidos durante todo o curso, em especial a professora Prof^a. Dr^a. Cláudia Regina Batista de Souza e a Dr^a. Elisa Ferreira Moura da Cunha pela eficiente e dedicada orientação durante todo o trabalho e aos professores componentes da banca pela participação, atenção e valiosos comentários oferecidos na ocasião da pré-banca e da apresentação deste trabalho. Aos técnicos Edson Sampaio e Nivaldo pelo apoio dado e conselhos valiosos.

A minha família pelas orações e pensamentos positivos para que eu pudesse alcançar meus objetivos em especial aos meus pais Sonia e Sebastião que me compreendem e me deram ensinamentos valiosos e a minha irmã Audriana que em todos os momentos que estava em dificuldade me ajudou.

Ao meu noivo/esposo Diehgo, companheiro e amigo de todas as horas que esteve comigo todos os dias acompanhando o meu dia a dia me dando força diante das dificuldades e se alegrando com cada conquista. A minha segunda família, meu sogro e minha sogra, que nos últimos meses acompanhou de perto os meus dias e me deram força e coragem para seguir em frente.

Aos meus amigos e amigas que vivenciaram comigo esta conquista, agradeço o apoio recebido, todos os ensinamentos e os momentos de incentivo compartilhando alegrias e tristezas. Em especial aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e da Embrapa, que estiveram comigo durante a realização deste trabalho.

E em especial a Deus por ter me concedido esta grande vitória.

Dedico este trabalho ao meu noivo/esposo Diehgo companheiro e confidente que paciente me ajudou a caminhar e chegar até aqui, aos meus Pais que me educaram para enfrentar as dificuldades da vida e a minha orientadora Prof.^a Cláudia que confiou em mim e me educou para enfrentar a vida acadêmica.

"No fim tudo dá certo, se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim". Fernando Sabino

RESUMO

A mandioca é um dos mais dinâmicos produtos da agricultura mundial, sendo cultivada em mais de cem países, no entanto sua produtividade é afetada por patógenos, principalmente os causadores de podridões radiculares, como o *Phytophthium* sp. Não há relatos de estudos que identificaram genes envolvidos na interação Mandioca- *Phytophthium* sp., portanto esta tese tem como objetivo principal a prospecção de genes envolvidos nos mecanismos de resposta da mandioca ao agente causador da podridão radicular. A tese está dividida em seis capítulos, onde o primeiro faz a contextualização geral, o segundo identificou genes relacionados à imunidade de mandioca que possuam potencial para atuar na defesa contra o agente causador da podridão radicular, o terceiro capítulo discutiu o potencial das fitocistatinas no controle de doenças de plantas causadas por fungos. No quarto capítulo foi realizada uma busca no genoma da mandioca por genes que irão codificar fitocistatina e estes foram caracterizados *in silico* e comparados filogeneticamente com fitocistatinas de outras culturas. O quinto capítulo trata de uma adaptação no método de propagação rápida da mandioca para a obtenção de mudas visando estudos em casa de vegetação, tais como, a inoculação do agente causador da podridão radicular das raízes em plantas de mandioca. O sexto capítulo apresenta os resultados visando realizar a inoculação do agente causador da podridão radicular das raízes em plantas de mandioca. A adaptação do método de propagação rápida da mandioca foi eficaz na produção de mudas para estudos em nível molecular da interação mandioca- *Phytophthium* sp. No total foram investigados nove genes envolvidos na resposta ao estresse biótico, dos quais sete apresentaram padrões de expressão diferencial nas raízes inoculadas com *Phytophthium* sp.. A análise do genoma da mandioca resultou na identificação de nove isoformas de genes da fitocistatina que estão distribuídas em sete cromossomos. Estes genes se tornam candidatos para utilização em programas de melhoramento genético que visem o combate a podridão radicular em mandioca causado por *Phytophthium* sp.

Palavras chaves: *Manihot esculenta*, *Phytophthium* sp, expressão diferencial, propagação rápida da mandioca, produção de mudas.

ABSTRACT

Cassava is one of the most dynamic agricultural products in the world, being cultivated in many countries, however your productive is affected by pathogens, mainly those witch cause root rot, with *Phytophythium* sp. Studies related with identification of genes in the interaction between cassava-*Phytophythium* sp. are not found in the literature. Therefore, the main objective of thesis was prospecting genes involved in the mechanisms of response of cassava to the agent that causes root rot. The thesis is divided in six chapter, the first does a general contextualization, in second chapter was identified genes related with cassava immunity that possess potential for combat against root rot pathogen, the third chapter discussed the potential of phytocystatin in the control of plant diseases caused by fungi. In the chapter four a search of the cassava genome was carried out by genes that will code phytocystatin and these were characterized in silico and compared phylogenetically with phytocystatin from other cultures. Chapter five is about the adaptations methodology of rapid propagation of cassava for obtainment of seedlings aiming at greenhouse studies, such as the inoculation of root rot agent in cassava plants. The sixth chapter presents the results aiming at the inoculation of root rot agent of roots in cassava plants. The adaptation of the rapid propagation method of cassava was effective in the production of seedlings for studies at the molecular level of the interaction of cassava -*Phytophythium* sp. In total, nine genes involved in biotic stress response were investigated, of which seven presented differential expression patterns in the roots inoculated with *Phytophythium* sp. The analysis of the cassava genome resulted in the identification of novel phytochemical gene isoforms that are distributed on seven chromosomes. These genes become eligible for use in breeding programs aimed at combating root rot in cassava caused by *Phytophythium* sp.

Key words: *Manihot esculenta*, *Phytophythium* sp, differential expression, rapid propagation of cassava, production of seedlings.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRAT	
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	11
REFERÊNCIAS	23
2. PROPAGAÇÃO RÁPIDA DE MANDIOCA PARA ESTUDOS EM CASA DE VEGETAÇÃO	32
RESUMO	33
ABSTRACT	34
2.1 Introdução	35
2.2 Material e Métodos	37
2.3 Resultados e Discussão	38
2.4 Conclusão	43
Referências	44
3. PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA: METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA	53
RESUMO	54
ABSTRACT	55
3.1 Introdução	55
3.2 Material e Métodos	56
3.3 Resultados e Discussão	60
3.4 Conclusão	62
Referências	63
4. PADRÕES DIFERENCIAIS DE EXPRESSÃO GÊNICA EM RAÍZES DE MANDIOCA INOCULADAS COM <i>Phytophthium sp.</i>	72
RESUMO	73
ABSTRACT	73
4.1 Introdução	74
4.2 Material e Métodos	75
4.3 Resultados e Discussão	78
4.4 Conclusão	89
Referências	90

5. PHYTOCYSTATINS AND THEIR POTENTIAL TO CONTROL PLANT DISEASES CAUSED BY FUNGI	95
6. A FAMÍLIA DE GENES DE FITOCISTATINAS EM MANDIOCA: CARACTERIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA	104
RESUMO	105
ABSTRACT	105
6.1 Introdução	106
6.2 Material e Métodos	107
6.3 Resultados e Discussão	108
6.4 Conclusão	116
Referências	117
CONCLUSÕES GERAIS	120
ANEXOS	121

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 A cultura da mandioca e a podridão radicular.

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à classe das Eudicotiledôneas, à ordem Malpighiales, à família Euphorbiaceae e ao gênero *Manihot*, sendo uma espécie de arbusto nativo do Brasil e conhecida popularmente como mandioca, macaxeira e aipim (CORDEIRO et al., 2017).

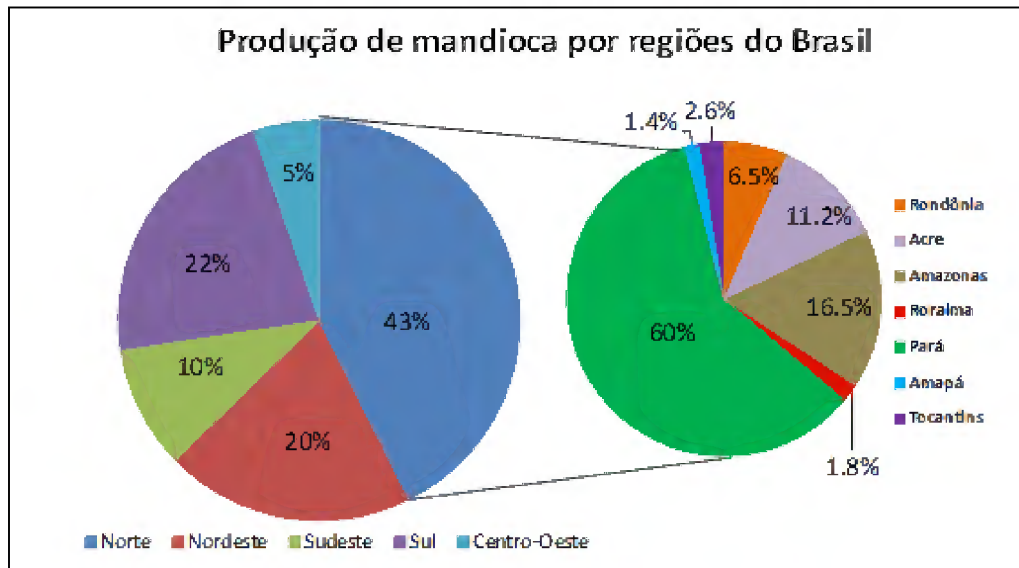
A mandioca é um dos mais dinâmicos produtos da agricultura mundial, sendo cultivada em mais de cem países. As raízes são fontes de carboidratos e uma importante fonte de alimentação para pessoas de baixa renda. A folha é fonte de carboidratos e proteínas. Sendo que a maior teor de proteínas da mandioca está concentrado nas folhas denominadas de manivas. As manivas tem potencialidade para ser utilizado na alimentação animal e como matéria-prima para a agroindústria e o etanol (MATTOS e CARDOSO, 2003; LARA et al., 2008; ANDRE e SANTOS, 2012).

O Brasil é um dos maiores produtores de mandioca e também um grande consumidor (ALVES FILHO et al., 2015). Em 2016, o Brasil produziu mais de 23 milhões de toneladas de mandioca, com rendimento médio de mais de 15 toneladas por hectare (IBGE, 2017). A região Norte é responsável por 43% da produção Brasileira (Figura 1), sendo o estado do Pará o mais representativo nesta região e no país, com produção total anual de mais de 6 milhões de toneladas em 2016 (IBGE, 2017).

A mandioca é considerada uma cultura rústica e a maior parte dos cultivos está concentrada em pequenos produtores, que se caracterizam pelo uso de poucos insumos no manejo da cultura. Deste modo, o sistema rudimentar de manejo utilizado pela maioria dos agricultores associado ao baixo uso de insumos são fatores responsáveis pelo baixo rendimento da mandiocultura (ALVES FILHO et al., 2015).

A raiz da mandioca é uma das principais fontes de alimento nas populações de baixa renda em países subdesenvolvidos. Neste sentido, programas de melhoramento genético, atualmente estão focados em desenvolver variedades biofortificadas principalmente com a presença de carotenoides como β -caroteno, encontrados nas raízes de coloração amarela (IGLESIAS et al. 1997; MEZETTE et al., 2009; CARVALHO et al., 2012a; SILVA et al., 2014).

Figura 1. Percentual da produção de mandioca por regiões do Brasil. Destacando o percentual de produção da região norte do Brasil.



Fonte: Dados IBGE, (2017).

Estudo a nível molecular foi realizado por CARVALHO et al. (2012b), visando fornecer informações a respeito do acúmulo de carotenoides na raiz de reserva da mandioca. Logo, melhorar o conteúdo de precursores de vitamina A, como β -caroteno, em mandioca, pode auxiliar, sobretudo em regiões de baixa renda, no combate a doença como a cegueira noturna, distúrbios de crescimento e dificuldade de aprendizagem (UNDERWOOD e SMITASII, 1999).

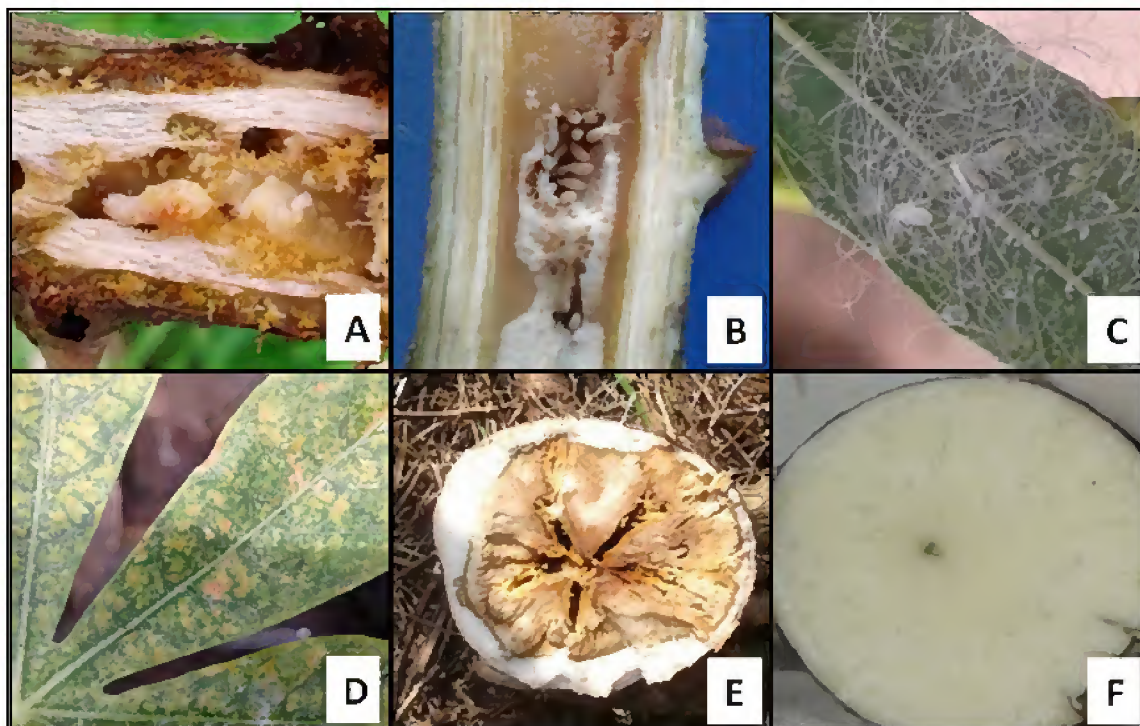
Os espécimes de mandioca podem ser classificados em dois grupos, conforme o teor de ácido cianídrico presente. Um dos grupos é constituído por mandioca brava (também conhecida como amarga) e o outro constituído pela mandioca mansa (também conhecida como doce). O sabor amargo está associado ao potencial cianogênico, que é a capacidade da liberação de ácido cianídrico, que é tóxico (LARA *et al.*, 2008).

A obtenção de mudas de mandioca é feita preferencialmente por propagação vegetativa, onde pedaços do caule, chamados manivas-semente ou estacas, são utilizados para gerar plantas geneticamente idênticas (SILVA *et al.*, 2002; CARVALHO e GUERRA, 2002). Em contraste, o uso de sementes em mandioca é limitado pela baixa taxa de fecundação das flores, baixa germinação destas e levam mais tempo para se estabelecer e são menores e menos vigorosas que as plantas oriundas de estacas (SILVA *et al.*, 2002). Contudo, a reprodução sexuada se mantém ativa, promovendo a variabilidade genética e possibilitando aos melhoristas selecionar genótipos de maior importância agrônômica (SILVA *et al.*, 2001).

No Brasil, existe uma ampla variabilidade genética de mandioca, a qual se encontra mantida em coleções de trabalho e bancos ativos de germoplasma distribuídos em todo o país. Essa variabilidade é representada em sua maioria por variedades selecionadas naturalmente ou por agricultores (FUKUDA *et al.*, 1996; VIEIRA *et al.*, 2007). Essas variedades representam o alicerce dos sistemas de produção familiar, por isso são consideradas um patrimônio genético importante para a segurança alimentar dos agricultores e para a preservação da biodiversidade (FUKUDA *et al.*, 1996).

Apesar de sua rusticidade vários fatores relacionados a estresse biótico (Figura 2 A-E) e abiótico (Figura 2 F) limitam a expansão da mandiocultura (BORGES *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2013; VENTURINI *et al.*, 2015; VILAS-BOAS *et al.*, 2016). Dentre os fatores bióticos limitantes para a cultura da mandioca, a podridão radicular vem se tornando uma doença de alto impacto econômico e social no Brasil (SERRA *et al.*, 2009), pois provoca queda progressiva na produtividade, com relatos de perdas de até 100% na produtividade de raízes (MOSES *et al.*, 2007), além de inutilizar as áreas para plantio ao longo dos ciclos da cultura (NOTARO, 2013).

Figura 2. Fatores bióticos e abiótico que afetam a produção da mandioca. A- Brocas do caule. B- Cupins. C- Mosca-branca. D- Ácaros. G-Podridão radicular. H- Deterioração pós-colheita.



Fonte: Arquivo pessoal.

1.2. Podridão radicular da mandioca causada por *Phytophthora*.

No Estado do Pará, foram descritos como patógenos associados à podridão mole das raízes, os oomicetos dos gêneros *Phytophthora* e *Pythium* (FIGUEIREDO e ALBUQUERQUE 1970; POLTRONIERI et al., 1997), o fungo *Fusarium solani* (POLTRONIERI et al., 2002) e, recentemente, os oomicetos do gênero *Phytophthora* (Boari et al., 2018).

O gênero *Phytophthora* foi recentemente enquadrado no reino Chromista, filo Oomycota, na ordem Pythiales e na família Pythiaceae. Esta alteração se deu ao analisar molecularmente espécie de *Pythium*, os resultados revelaram um grupo que se destaca como sendo filogeneticamente distinto, denominado clado K, resultando assim na criação do gênero, onde as espécies possuem características intermediárias entre *Phytophthora* e *Pythium* (BALA et al., 2010; de COCK et al., 2015). Estudos mostraram que o oomiceto *Phytophthora* sp. está associado à podridão da raiz de mandioca e a ferrugem de folhagem no estado do Pará, sendo este o primeiro relato mundial de *Phytophthora* sp. causando podridão radicular na mandioca (Boari et al., 2018).

As espécies de patógenos associadas à podridão mole das raízes em mandioca habitam o solo e afetam principalmente as raízes tuberosas e o efeito do apodrecimento pode ser camuflado até a colheita, já que a planta de mandioca tem um extenso sistema radicular, podendo permanecer de pé, apesar de uma parcela significativa de suas raízes estarem podres. A podridão mole é caracterizada pela deterioração completa da raiz e a exsudação de um líquido de forte odor (MSIKITA et al., 2005; BANDYOPADHYAY et al., 2006).

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

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) recomenda três acessos (BRS Mari, BRS Kiriris e BRS Poti), que apresentam baixa produção comparada com outros acessos, mas boa tolerância a podridão radicular (ALBUQUERQUE e BRANDÃO, 2008). Estudos que busquem elucidar os mecanismos envolvidos na resistência destes acessos podem

contribuir para o desenvolvimento de acessos mais produtivos e resistentes à doença. No entanto, faz-se necessário identificar os genes envolvidos na resposta da planta a patógenos.

1.3. Metodologias de propagação e inoculação de plantas de mandioca com *Phytophthium sp.*

A propagação vegetativa da mandioca é um processo vantajoso porque mantém as características da planta mãe, mas por outro lado tem como fatores limitantes a baixa taxa de multiplicação, a redução da qualidade sanitária da maniva durante ciclos sucessivos de propagação, além da facilidade de transmissão de doenças através do material de propagação (FUKUDA e CARVALHO, 2006; SANTOS et al., 2009; SILOTO e FERNANDES, 2016). Para sanar essas dificuldades o Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) desenvolveu o método de propagação rápida da mandioca (COCK et al., 1976), o qual foi testado em algumas regiões brasileiras, proporcionando um aumento significativo do fator de multiplicação da cultura comparado com o método de propagação tradicional (SILVA et al. 2002; FUKUDA e CARVALHO, 2006; RODRIGUES et al. 2008; ALVES et al., 2009; SANTOS et al. 2009; VIEIRA e MOURA, 2011).

Esta metodologia deve ser adaptada de acordo com as condições edafo-climáticas da região onde os experimentos são conduzidos e as características genéticas da acesso usada (RODRIGUES et al. 2008; ALVES et al. 2009; SANTOS et al. 2009; VIEIRA e MOURA, 2011; SILOTO e FERNANDES, 2016). O método de propagação rápida da mandioca ainda não foi testado para as condições climáticas da região de Belém. Além disso, a utilização deste método pode possibilitar a obtenção de plantas de mandioca com raízes tuberculizadas adequadas para estudos em condições controladas de casa de vegetação.

Um dos desafios da identificação de fontes de resistência a podridão radicular nos germoplasmas de mandioca é a falta de metodologias adequadas para a seleção de genótipos por meio de inoculações artificiais, de modo a refletir o comportamento destes em condições de campo. O método de inoculação de raízes destacadas, apesar de ser a metodologia de seleção atualmente utilizada na busca por genótipos resistentes à podridão radicular, é uma metodologia que necessita de uma programação na colheita das raízes (com tempo mínimo de 10 meses de plantio) e uma minuciosa triagem para que não sejam utilizadas raízes com injúrias e com infecções provenientes do campo (ONYEKA et al., 2005a; OLIVEIRA et al., 2013; VILAS-BOAS et al., 2016). Sendo, necessário estabelecer protocolos de inoculação

que visem inocular plantas jovens e em condições controladas para serem utilizadas nos experimentos que visem identificar os genes envolvidos na resposta da mandioca a patógenos.

1.4 Mecanismos de resistência das plantas contra patógenos

As plantas estão continuamente expostas a microrganismos, patogênicos ou não, e desenvolveram, durante o processo de evolução, mecanismos diferenciados de defesa que quando são acionados traduzem essa percepção em uma resposta apropriada. Os fitopatógenos, em especial, usam diversas estratégias, como a liberação de moléculas efetoras (efetores de virulência) na célula da planta, garantindo uma maior aptidão ao patógeno (JONES e DANGL, 2006; THAKUR e SOHAL, 2013).

As plantas respondem ao ataque de patógenos com um sistema de defesa que evita a infecção ou combate aos patógenos que as infectam. As alterações que constituem o sistema de resistência da planta podem ser agrupadas em constitutiva e indutível, e os mecanismos de defesa variam de morfológicos a estruturais e químicos (FERREIRA *et al.*, 2007).

A interação entre a planta e o patógeno pode ser dividida em dois tipos básicos: a interação compatível e a interação incompatível. Na interação compatível, o patógeno invade o tecido vegetal, multiplica-se e provoca doença na planta. Na interação incompatível, o patógeno, ao penetrar no tecido vegetal, encontra as defesas da planta que irão impedir sua multiplicação, resultando na resistência. A intensidade do mecanismo de defesa da planta depende da capacidade do vegetal de reconhecer certos patógenos. Os patógenos são classificados em dois tipos: virulentos e avirulentos (BORÉM & MIRANDA, 2013).

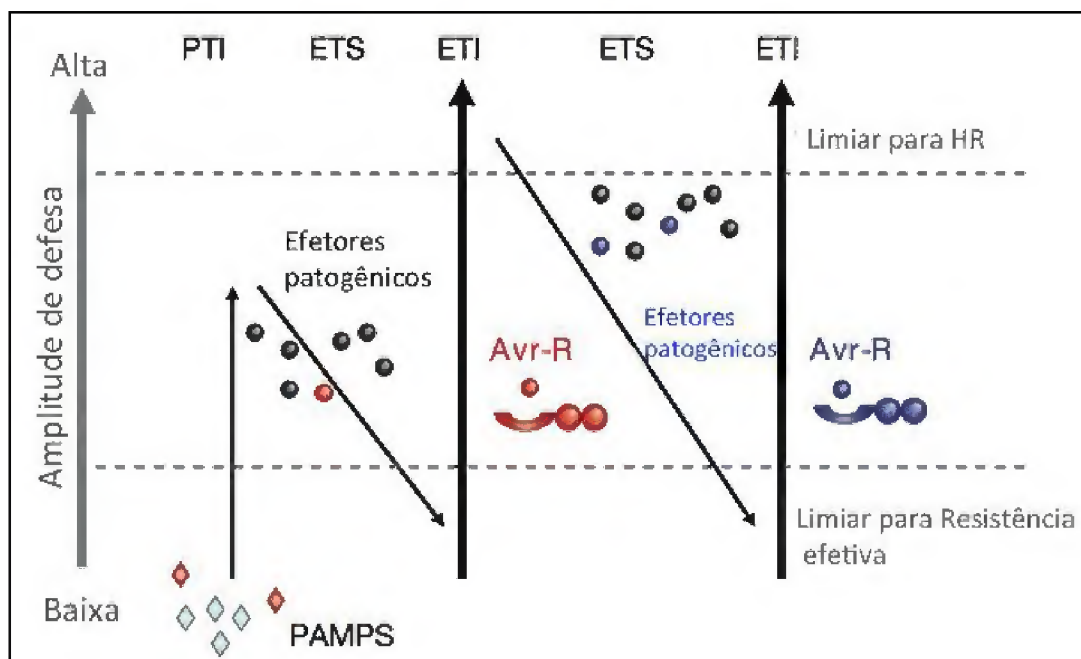
A expressão da resistência é governada tanto por genes R da planta quanto por genes de Avirulência (Avr) correspondente do patógeno. Uma vez que o reconhecimento específico é realizado, uma resposta forte e rápida é desencadeada no local da infecção. Esta resposta é conhecida como reação de hipersensibilidade (HR) e é característica de interações incompatíveis (ELVIRA *et al.*, 2008). Desta forma, HR aciona o sistema de resistência adquirida (SAR) que confere uma imunidade para um amplo espectro de patógeno. Os mecanismos de defesa de uma planta são controlados geneticamente e dependem da expressão de determinados genes no momento e magnitude adequados após o contato do patógeno com o hospedeiro (PIETERSE *et al.*, 2014).

Plantas quando em contato com microrganismos ativam, em nível celular, receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes na membrana celular ou no citoplasma das células. Os PRRs das células vegetais estão localizados na membrana plasmática,

apresentando dois tipos estruturais básicas, *receptors like Kinases* (RLKs) e *receptors Like Proteínas* (RLPs), ambos possuindo um domínio funcional modular. 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 e DANGL, 2006; PIETERSE *et al.*, 2014).

Segundo JONES e DANGL (2006), o sistema de defesa vegetal pode ser representado por um modelo de quatro fases denominado “Zig-Zag” (Figura 3) em que na fase 1 PAMPs são reconhecidos por PRRs resultando na imunidade disparada por PAMPs (PTI); na fase 2 patógenos que obtiveram sucesso liberam efetores que interferem na PTI, desencadeando uma suscetibilidade disparada por efetores (ETS); na fase 3 o efector é especificamente reconhecido por uma proteína R resultando em imunidade disparada por efetores (ETI).

Figura 3: Modelo Zig-Zag do sistema imune em plantas. No esquema, as plantas detectam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, losangos vermelhos) via PRRs para desencadear a imunidade disparada por PAMPs (PTI). Patógenos de sucesso produzem efetores que interferem com a PTI, resultando em suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS). Se um efector (indicado em vermelho) é reconhecido por uma proteína da planta NB-LRR, a imunidade disparada por efetores (ETI) é ativada, sendo uma versão amplificada de PTI que permite a indução da morte celular e resposta de hipersensibilidade (HR). Isolados do patógeno podem evoluir, perdendo efetores (em vermelho) ou ganhar novos efetores (em azul), permitindo que o patógeno suprima ETI. Tal seleção, então, favorecem novos alelos NB-LRR a evoluir e reconhecer um dos efetores recém-adquirido, resultando novamente em ETI.



Fonte: Adaptado de Jones e Dangl (2006).

Os PAMPs são definidos como moléculas de epítomos invariantes, que são fundamentais para a adequação dos diferentes microrganismos patógenos, ausentes no hospedeiro, porém reconhecidas por eles (LIU *et al.*, 2013). A primeira molécula claramente definida como um PAMP foi a Pep13, um peptídeo curto de 13 aminoácidos com uma superfície exposta dentro de um fragmento de transglutaminase cálcio dependente da parede celular da *Phytophthora sojae*, que provoca respostas de defesa em Solanaceae (NURNBERGEN *et al.*, 2004).

Considerando sua estrutura molecular, a maioria dos PAMPs pode ser dividida em polissacarídeos e polipeptídios. Os representantes mais conhecidos do primeiro grupo são Lipopolissacarídeos presentes na membrana das bactérias gram-negativas, peptídeoglicanos encontrados na membrana celular das bactérias gram-negativas e gram-positivas, e quitina presente na parede celular de fungos (LIU *et al.*, 2013; NEWMAN *et al.*, 2013).

Os principais polipeptídios são flagelina microbiana, proteína componente do flagelo de bactérias e fator Tu de alongamento, proteína envolvida na biossíntese da cadeia de aminoácidos pelos ribossomos bacterianos (NEWMAN *et al.*, 2013). O domínio N-terminal da flagelina (flg22) é altamente conservado e reconhecido pela maioria das plantas (ZIPFEL e FELIX, 2005). A planta do tomate é capaz de reconhecer uma versão mais curta do mesmo epítopo (flg15) e o arroz parece ser insensível à flg22, mas pode reconhecer a molécula de flagelina como um todo (TAKAI *et al.*, 2007; WAN *et al.*, 2008).

O elicitor lecitina que se encontra ligado à celulose, em *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, foi identificado como o responsável pelo mecanismo de disparo de respostas de defesa em *Arabidopsis* e tabaco (GAULIN *et al.*, 2006). Esses dois pontos de ligação com a celulose, que são provavelmente relevantes na adesão celular durante a infecção, são suficientes para a indução de defesa. Outras PAMPs mais amplamente reconhecidas são derivadas de componentes da parede celular de fungos, tais como beta-glucanas, ergosterol ou quitina (MIYA *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, diversos estudos mostraram a relevância dos PAMPs e sua ligação com a imunidade das plantas. Muitos receptores para os PAMPs ainda precisam ser identificados e mais estudos devem ser desenvolvidos para uma melhor compreensão de como as mais diversas plantas respondem ao estresse causado no vegetal durante o processo de patogênese (HENRY *et al.*, 2012; NEWMAN *et al.*, 2013).

O sistema de defesa vegetal apresenta dois níveis. Durante o primeiro nível de defesa, a célula vegetal reconhece os PAMPs/ MAMPs, através dos seus receptores de reconhecimento de padrão presentes na superfície celular, desencadeando a imunidade ativada

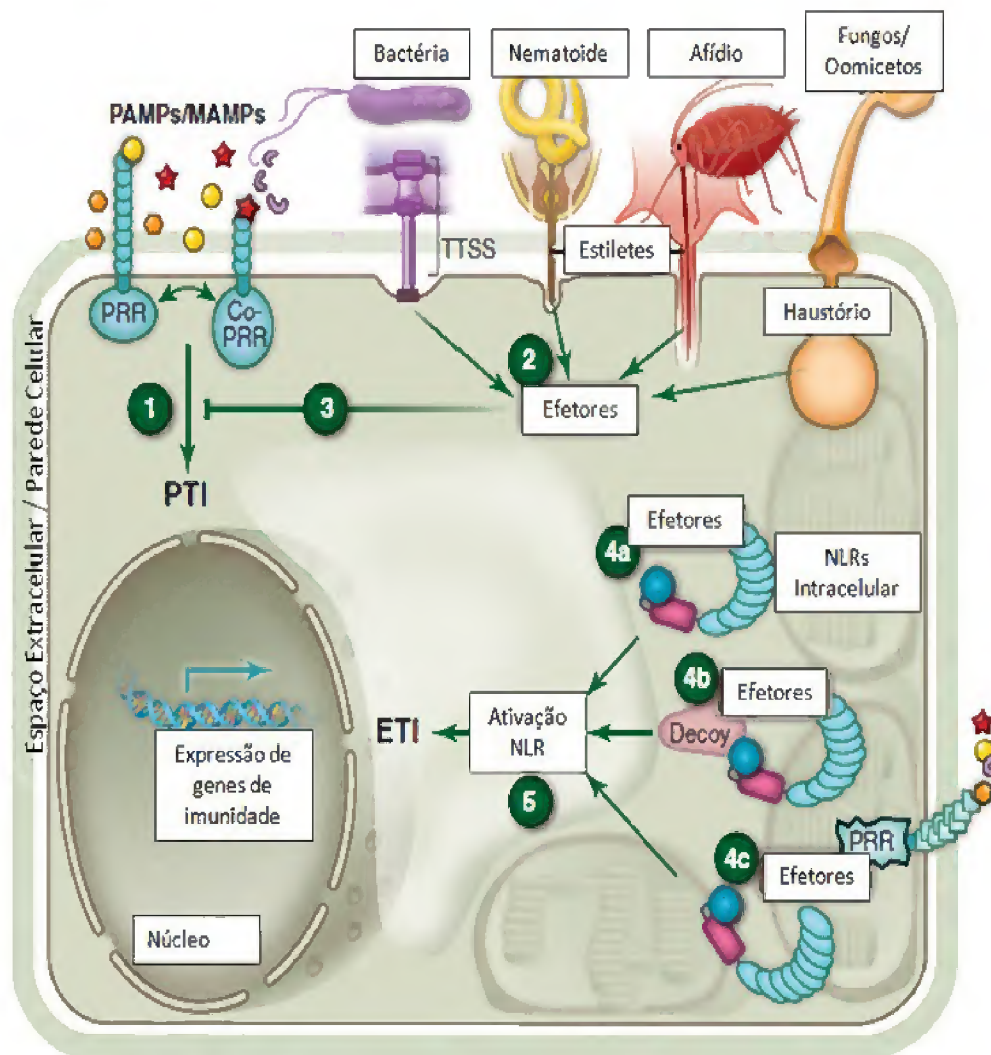
por PAMP (*PAMPs-triggered immunity* - PTI) (CHISHOLM *et al.*, 2006). Sendo esta fase essencial para a ativação da imunidade inata nas plantas. Pois, há estudos demonstrando que plantas com mutações nos PRRs são susceptíveis a infecções microbianas (ZIPFEL, 2009).

Uma vez que as barreiras da primeira linha de defesa são ultrapassadas, as plantas desenvolveram um mecanismo mais especializado para detectar e combater o ataque de microrganismos patogênicos, a imunidade desencadeada por efetor (*effector triggered immunity* - ETI), que apresenta como principal característica a morte celular e necrose tecidual no local da infecção, esta conhecida como reação de hipersensibilidade (CHISHOLM *et al.*, 2006). Nessa fase, a efetividade do patógeno em conseguir secretar proteínas efetoras no citoplasma da célula é combatida por proteínas especializadas, que atuam como receptores conhecidas como proteínas de resistências, sendo essas proteínas expressas por genes conhecidos como genes de resistência ou genes R (DANGL E JONES, 2006; DANGL *et al.*, 2013) (Figura 4).

A maioria dos genes R codificam membros de uma superfamília extremamente polimórfica de repetição rica em leucina (NLR) que são receptores de nucleotídeos de ligação, que funcionam intracelularmente e âncora o segundo nível do sistema imunológico da planta. Proteínas específicas NLR são ativadas por efetores específicos do patógenos. Essa interação pode ser via direta entre a molécula efetora e o receptor. Alternativamente, através da modificação da proteína efetora por uma molécula *Decoy* (Isca) que é reconhecida pelo receptor somente quando sofre a mudança. E também através do reconhecimento da molécula efetora mediada pela alteração de um alvo de virulência hospedeiro, tal como a de um domínio citosólico, PRR; cada um desses três processos de reconhecimento desencadeia a ETI (DANGL *et al.*, 2013).

O desenvolvimento da doença, em plantas é, na maioria das vezes, um evento raro. Isso se deve a eficiência na reposta, que não se restringe apenas aos receptores, ativada tanto na PTI quanto ETI. Plantas sobre estresse biótico possui vasto e variado mecanismo de defesa que incluem barreiras estruturais e bioquímicas, ambos pré e/ou pós-formados em relação à tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro. Dentre os mecanismos encontrados podemos citar as barreiras estruturais pré-formadas, representadas principalmente pelo processo de lignificação da parede celular das plantas vasculares (TOBIMATSU *et al.*, 2013). E as barreiras químicas pré-formadas, estas representadas principalmente pelas Proteínas Relacionadas à Patogênese, conhecidas também como proteínas PR (VAN LOON *et al.*, 2006).

Figura 4: Célula vegetal infectada por patógenos de todas as classes; Em (1) a célula reconhece os PAMPs através dos PRR extracelulares ativando a PTI; Em (2) mostra a capacidade que os patógenos possuem de secretar proteínas efetoras no citoplasma da célula inativando a resposta PTI (3); Intracelular NLRs percebem as moléculas efetoras por três vias: Através da ligação direta entre a molécula efetora e o receptor (4a); Através da modificação da proteína efetora por uma molécula *Decoy* (Isca) que é reconhecida pelo receptor somente quando sofre a mudança (4b); através do reconhecimento da molécula efetora mediada pela alteração de um alvo de virulência hospedeiro, tal como a de um domínio citosólico, PRR (4c); cada um desses três processos de reconhecimento desencadeia a ETI (5).



Fonte: Adaptado de Dangl *et al.* (2013).

1.5. Prospecção de genes de resposta da mandioca à podridão radicular

O estudo da indução de genes de defesa nas plantas é algo que vem sendo feito há mais de quatro décadas (GREEN e RYAN, 1972) e, ainda hoje, existem pontos não esclarecidos a respeito deste processo (DANGL e JONES, 2006; DANGL *et al.*, 2013; ZIPFEL e OLDROYD, 2017).

Vários métodos permitem isolar e manipular genes específicos de interesse agrônomo, como os que conferem resistência a condições de estresses bióticos e abióticos e também aqueles que podem aumentar o valor nutricional das culturas. Este conhecimento permitiu que algumas culturas fossem modificadas. Dentre as culturas melhoradas e que são amplamente utilizadas, podemos citar: a soja (resistente a herbicida), algodão (resistente a insetos) milho (resistente a herbicida e insetos), mamão (resistente a vírus), tomate (alteração no amadurecimento) e arroz (maior qualidade nutricional) (BESPALHOK *et al.*, 2017).

Desta forma, torna-se evidente a importância dos estudos moleculares de expressão gênica na compreensão das respostas de defesa das plantas contra os patógenos. A busca por genes diferencialmente expressos em plantas resistentes e susceptíveis a patógenos vem sendo realizadas em diversas plantas tais como, tomate (AMARAL *et al.*, 2008), *Piper tuberculatum* (NASCIMENTO *et al.*, 2009), pimenteira-do-reino (DE SOUZA *et al.*, 2011), maçã (BALDO *et al.*, 2010), couve-flor (JIANG *et al.*, 2011), uva (LEGAY *et al.*, 2011), soja (WANG *et al.*, 2012), banana (TIMM *et al.*, 2016), cana-de-açúcar (SATHYABHAMA *et al.*, 2016) e trigo (ALTAWEEL *et al.*, 2017).

A identificação de genes de resposta da mandioca ao agente causador da podridão radicular pode contribuir para, no futuro, obter-se acessos melhorados. Nas buscas realizadas na literatura não há relatos de estudos que visem identificar genes de resposta a estresse biótico da interação Mandioca- *Phytophthium* sp.. Espera-se ao final dos experimentos confirmar a hipótese de que a mandioca expressa genes de forma diferencial quando em contato com o agente causador da podridão radicular. Com isso, o presente trabalho tem como objetivo principal a prospecção de genes envolvidos nos mecanismos de resposta da mandioca ao agente causador da podridão radicular. Para satisfazer os objetivos traçados, foram realizados 5 trabalhos no qual estão descritos nos capítulos que constituem esta tese.

Este primeiro procura levantar os dados já descritos na literatura sobre o tema em questão. O segundo capítulo trata de uma adaptação no método de propagação rápida da mandioca para a obtenção de mudas visando estudos em casa de vegetação, tais como, a inoculação do agente causador da podridão radicular das raízes em plantas de mandioca. A metodologia de propagação rápida da mandioca foi proposta para contornar o baixo índice de multiplicação da cultura. Uma vez que estudos que utilizem material destacado não possibilita a análise da planta como um todo e para estudar a interação mandioca- *Phytophthium* sp. em plantas foi necessário estabelecer um método de obtenção de material que possibilitasse os estudos em condições controladas.

O terceiro capítulo apresenta os resultados visando realizar a inoculação do agente causador da podridão radicular das raízes em plantas de mandioca. Por se tratar dos primeiros esforços para estudar os mecanismos envolvidos na interação foi necessário desenvolver um método para realizar a inoculação do agente causador da podridão radicular das raízes de mandioca e assim possibilitar a produção de material vegetal adequado para os estudos moleculares desta interação planta-patógeno. As mudas foram produzidas utilizando o método de propagação rápida da mandioca. Para a inoculação, as mudas foram infestadas com uma mistura de areia e fubá (3:1) com discos de meio mandioca dextrose ágar contendo micélio do isolado CT084 e seus efeitos analisados. Foi possível observar sinais característicos da doença nas plantas inoculadas quando comparadas com as plantas controle.

O quarto capítulo deste trabalho visa identificar genes relacionados à imunidade de mandioca que possuam potencial para atuar na defesa desta planta contra o agente causador da podridão mole das raízes e analisar sua expressão em raízes de mandioca inteiras inoculadas com *Phytophthora* sp..

O quinto capítulo visa discutir o potencial das fitocistatinas no controle de doenças de plantas causadas por fungos, uma vez que uma fitocistatina foi identificada como potencialmente envolvida na resposta da mandioca ao ataque do *Phytophthora* sp. Os inibidores de proteases cisteínicas, também conhecidos como cistatinas, são um grupo de proteínas que se ligam às proteases cisteínicas inibindo sua atividade. As cistatinas de plantas ou fitocistatinas já foram identificadas em diversas espécies vegetais (FERNANDES *et al.*, 1993; WALDRON *et al.*, 1993; ABE *et al.*, 1995; MISAKA *et al.*, 1996; JOSHI *et al.*, 1998; KURODA *et al.*, 2001; RYAN *et al.*, 2003; SHYU *et al.*, 2004; BANGRAK *et al.*, 2011). Possuem várias funções como a regulação dos processos de maturação e germinação das sementes (OJIMA *et al.*, 1997; RASSAM *et al.*, 2004), a regulação da morte celular programada (BELENGHI *et al.*, 2003) e funções de defesa em resposta a estresse biótico (HINES *et al.*, 1991; MARTINEZ *et al.*, 2005; PIROVANI *et al.*, 2010) e abiótico (DIOP *et al.*, 2004; HWANG *et al.*, 2010).

O sequenciamento de todo o genoma da mandioca tornou possível à análise dos genes que irão codificar fitocistatinas. No sexto capítulo foi realizada uma busca no genoma da mandioca por genes que irão codificar fitocistatina e estes foram caracterizados *in silico* e comparados filogeneticamente com fitocistatinas identificadas em cacau, seringueira e inhame. Os resultados obtidos contribuirão para futuros estudos funcionais que possam ser realizados com as fitocistatinas de mandioca.

REFERÊNCIAS

- ABE, M.; ABE, K.; DOMOTO, C.; ARAI, S. Two distinct species of corn cystatin in corn kernels. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 59, p. 756-758, 1995.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology** . 5ª edição. Amsterdam: Elsevier, 2004. 922 p.
- ALBUQUERQUE, A. S.; BRANDÃO, I. C. D. **Acessos BRS Mari e BRS Poti e medidas de controle da podridão-mole da mandioca.** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, Documentos, 326 ISSN 1517-2201, 2008. 27p.
- ALTAWHEEL, K.; AMARASINGHE, C. C.; BRÛLÉ-BABEL, A. L.; FERNANDO, W. D. Gene expression analysis of host–pathogen interaction between wheat and *Fusarium graminearum*. **European Journal of Plant Pathology**, v.1, p.13, 2017.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, TL, SHAFFER AA, ZHANG J, ZANGH Z, MILLER W, LIPMAN DJ. Gapped Blast and PSI-Blast a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v.25, p. 3389-3402, 1997.
- ALVES AAC, CUNHA AF. 2003. Cultivo da Mandioca para a Região Semi-Árida. Embrapa Mandioca e Fruticultura Sistemas de Produção, 12. ISSN 1678-8796. Versão eletrônica.
- ALVES, J. M. A.; ARRUDA, K. R.; RODRIGUES, G. S.; UCHÔA, S. C. P.; ALBUQUERQUE, J.A.A. Brotação de manivas para a propagação rápida da mandioca. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 5, p. 280-284, 2009.
- ALVES FILHO, P. P. DA C.; GALVÃO, J. R.; NEVES, L. B.; COSTA, I. DOS R. Produção de Mandioca acesso roxinha, Igarapé-Açu, Pará em resposta à adubação NPK. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2015.
- AMARAL, D. O. J., LIMA, M. M. A., RESENDE, L. V., & SILVA, M. V. Differential gene expression induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection, in tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1017–1023, 2008.
- ANDRÉ, T.B. e SANTOS, A.C. Uso de produtos da cultura da mandioca (*Manihot*) na produção animal. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15, p.1622-1647, 2012.
- BALA, K.; ROBIDEAU G.P.; LÉVESQUE C.A. *Phytophthium Abad*, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi e Lévesque, gen. nov. and *Phytophthium sindhum* Lodhi, Shahzad e Lévesque. **Fungal Planet** 49. **Persoonia** 24: 136-137. 2010.
- BALDO, A., NORELLI, J. L., FARRELL, R. E., JR., BASSETT, C. L., ALDWINCKLE, H. S., & MALNOY, M. Identification of genes differentially expressed during interaction of resistant and susceptible apple acessos (*Malus × domestica*) with *Erwinia amylovora*. **BMC Plant Biology**, v.10, p.1, 2010.
- BANDYOPADHYAY, R.; MWANGI, M.; AIGBE, S. O.; LESLIE, J. F. *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. **Phytopathology**, v. 96, p. 673–676, 2006.

BANGRAK, P.; CHOTIGEAT, W. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cystatin from *Hevea* rubber latex. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 49, p.244-250, 2011.

BELENGHI, B.; ACCONCIA, F.; TROVATO, M.; PERAZZOLLI, M.; BOCEDI, A.; POLITICELLI, F.; ASCENZI, P.; DELLEDONNE, M. AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. **Eur. J. Biochem.** v. 270, p. 2593-2604, 2003

BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. **Plantas Transgênicas**. Disponível em: <<http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%20transgenicos.pdf>>. Acessado em: 09 junho 2017.

BOARI, A. J., QUADROS, A. F. F., CUNHA, E. M., FERNANDES, A. F., & BARRETO, R. W. First report of *Phytophthora* sp. causing storage root rot and foliage blight of cassava in Brazil. *Plant Disease*, <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1449-PDN>, 2018.

BORÉM, A. e MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa. Editora UFV, 5ª edição, 2013. 529p.

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

CARVALHO, L. M.; OLIVEIRA, A. R.; GODOY, R. L.; PACHECO, S.; NUTTI, M. R.; DE CARVALHO, J.L.; PEREIRA, E. J.; FUKUDA, W.G. Retention of total carotenoid and β -carotene in yellow sweet cassava (*Manihot esculenta* Crantz) after domestic cooking. **Food Nutr. Res.**, v.56, 15788, 2012a. doi: 10.3402/fnr.v56i0.15788.

CARVALHO L. J. C. B ; LIPPOLIS, J. ; CHEN, S. ; DE SOUZA, C. R. B. ; VIEIRA, E. A. ; ANDERSON, J. . Characterization of carotenoid-protein complexes and gene expression analysis associated with carotenoid sequestration in pigmented cassava (*Manihot esculenta* Crantz) storage root. **Open Biochem. J.**, v. 6, p. 116-130, 2012b.

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

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

COCK, J.H; WHOLEY, D.; LOZANO J.C.; TORO, J.C. **Sistema rápido de propagación de yuca**. Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1976. 12 p. (Serie ES: Centro Internacional de Agricultura Tropical. N°. 20). Disponível em http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/CIAT/books/historical/147.pdf. Acessado em: 15 out. 2017.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; SILVA, M.J.DA; SODRÉ, R.C.; MARTINS, M.L.L. *Manihot* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17600>. Acesso em: 22 Jun. 2017.

COSTA, C. N.M.; SANTA-BRÍGIDA, A. B.; BORGES, B. N.; MENEZES-NETO, M. A.; CARVALHO, L. J. C. B.; DE SOUZA C. R. B. Levels of MeLEA3, a cDNA sequence coding for an atypical late embryogenesis abundant protein in cassava, increase under in vitro salt stress treatment. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v. 29, p. 997–1005, 2011.

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.

CHOI, H.W.; HWANG, B. K. The pepper extracellular peroxidase CaPO2 is required for salt, drought and oxidative stress tolerance as well as resistance to fungal pathogens. **Planta**, v. 235 p.1369–1382, 2012.

DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J. Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. **Science**, v. 341, p.746-751, 2013.

DE COCK, A. W. A. M.; LODHI, A. M.; RINTOUL, T. L.; BALA, K., ROBIDEAU, G. P.; ABAD, Z. G.; ... LÉVESQUE, C. A. Phytophythium: molecular phylogeny and systematics. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 34, p. 25-39, 2015.

DE SOUZA, C. R. B.; CARVALHO, L. J. C. B.; CASCARDO, J. C. M. Comparative gene expression study to identify genes possibly related to storage root formation in cassava. **Protein Pept. Lett.** V. 11, p. 577–582, 2004.

DE SOUZA CRB, SANTA BRÍGIDA AB, DOS SANTOS RC, COSTA CNM, DARNET SH, HARADA ML. Identification of sequences expressed during compatible black pepper - *Fusarium solani* f. sp. *piperis* interaction. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, p.2553-2560, 2011.

DIATCHENKO L, LAU, Y-FC, CAMPBELL AP, CHENCHIK A, MOQADAM F, HUANG B, LUKYANOV S, LUKYANOV K, GURSKAYA N, SVERDLOV ED, SIEBERT PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **PNAS**, v.93, p.6025-6030, 1996.

DIOP, N.N.; KIDRIC, M.; REPELLIN, A.; GAREIL, M.; D'ARCY-LAMETA, A.; PHAM THI, A.T.; ZUILY-FODIL, Y. A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. **FEBS Lett.**, v. 577, p. 545-550, 2004.

ELVIRA MI, MOLINA GALDEANO M, GILARDI P, GARCÍA-LUQUE I, SERRA MT. Proteomic analysis of Pathogenesis-Related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. **Journal of Experimental Botany**, v.59, p.1253-1265, 2008.

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

FERNANDES, K. V. S.; SABELLI, P. A.; BARRATT, D. H. P.; RICHARDSON, M.; XAVIER-FILHO, J.; SHEWRY, P. R. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is

not related to levels of cysteine proteinase - inhibitors. **Plant Mol. Biol.**, v. 23, p.215-219, 1993.

FERREIRA RB, MONTEIRO S, FREITAS R, SANTOS CN, CHEN Z, BATISTA LM, DUARTE J, BORGES A, TEIXEIRA AR. The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 8: p.677-700, 2007.

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

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

FUKUDA, W.; de CARVALHO, H. W. L. **Propagação rápida de mandioca no nordeste brasileiro**. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. 6 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, 45). Disponível em <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/372216>. Acessado em: 15 out. 2017.

FUKUDA, W.M.G; COSTA, I.R.S.; VILARINHOS, A.D.; OLIVEIRA, R.P. **Banco de germoplasma de mandioca: manejo, conservação e caracterização**. Embrapa-CNPMPF: Cruz das Almas-Bahia, 1996. (Documento, 68).

FUKUDA, W. M. G.; COSTA, I. R. S.; SILVA, S. O. **Manejo e conservação de recursos genéticos de mandioca (Manihot esculenta Crantz) na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**.Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 2005. 4 p. (Circular Técnica, 74).

GAULIN, E.; DRAME, N.; LAFITTE, C.; TORTO-ALALIBO, T.; MARTINEZ, Y.; AMELINE-TORREGROSA, C.; KHATIB, M.; MAZARGUIL, H.; VILLALBA-MATEOS, F.; KAMOUN, S. Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. **Plant Cell**, v. 18, n. 7, p. 1766-1777, 2006.

GREEN, T.R. & RYAN, C.A. Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science**, v. 175, p. 776-777, 1972.

HALL T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98 /NT. **Nuc. Acid Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HENRY, G., THONART, P., AND ONGENA, M. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** v. 16, p.257–26, 2012.

HINES, M. E.; OSUALA, C. I.; NIELSEN, S. S. Isolation and partial characterization of soybean cystatin cysteine proteinase inhibitor of coleopteran digestive proteolytic activit. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39 (8), p.1515–1520. 1991.

HU , L.; YANG, Y.; JIANG, L. AND LIU, S. “The catalase gene family in cucumber: genome-wide identification and organization,” **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, p. 408–415, 2016.

- HWANG, J.E.; HONG, J.K.; LIM, C.J.; CHEN, H.; JE, J.; YANG, K.A.; KIM, D.Y.; CHOI, Y.J.; LEE, S.Y.; LIM, C.O. Distinct expression patterns of two *Arabidopsis* phytolectin genes, AtCYS1 and AtCYS2, during development and abiotic stresses. **Plant Cell Rep.** v. 29, p. 905-915, 2010.
- IGLESIAS, C.; MAYEN, J.; CHÁVEZ, L.; CALLE, F. Genetic potential and stability of carotene content in cassava roots. **Euphytica**, v.94, p. 367-373, 1997
- JIANG, H., SONG, W., LI, A., YANG, X., & SUN, D. Identification of genes differentially expressed in cauliflower associated with resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 1, p. 621-629, 2011.
- JONES JDG, DUNSUMUIR P, BEDBROOK J. High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. **EMBO Journal**,v. 4, p. 2411-2418, 1985.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329, 2006.
- JOSHI, B. N.; SAINANI, M. N.; BASTAWADE, K. B.; GUPTA, V. S.; RANJEKAR, P. K. Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, n. 246, p. 382-387, 1998.
- KURODA, M.; KIYOSAKI, T.; MATSUMOTO, I.; MISAKA, T.; ARAI, S.; ABE, K. Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 65, p. 22-28, 2001.
- LACERDA, A., VASCONCELOS, É. A. R., PELEGRINI, P. B., & GROSSI-DE-SA, M. F. Antifungal defensins and their role in plant defense. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 116. 2014.
- LARA, A. C. C.; BICUDO, S. J.; BRACHTVOGEL, E. L.; ABREU, M. L.; CURCELLI F. MELHORAMENTO GENÉTICO DA CULTURA DA MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 4, p.55-65, 2008.
- LEGAY, G., MAROUF, E., BERGER, D., NEUHAUS, J. M., MAUCH-MANI, B., & SLAUGHTER, A. Identification of genes expressed during the compatible interaction of grapevine with *Plasmopara viticola* through suppression subtractive hybridization (SSH). **European journal of plant pathology**, v. 129, n. 2, p. 281-301, 2011.
- LIU, W.; LIU, J.; NING, Y.; BO DING, B.; WANG, X.; WANG, Z.; GUO-LIANG WANG., G. L. Recent Progress in Understanding PAMP- and Effector-Triggered Immunity against the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. **Molecular Plant**, v.6, n.3, p. 605–620, 2013.
- MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; MENEGHELLO, G. E.; BINNECK, E. ; PESKE, S. T. Prospecção de Genes em Bibliotecas de cDNA. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 12, p. 7-13, 2006.
- MARTINEZ, M.; ABRAHAM, Z.; GAMBARDELLA, M.; ECHAIDE, M.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. The strawberry gene Cyf1 encodes a phytolectin with antifungal properties. **J. Exp. Bot.**, v. 56, p. 1821-1829, 2005.

MATTOS, P. L. P. de.; CARDOSO, E. M. R. **Cultivo da mandioca para o Estado do Pará.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Sistema de Produção 13.). Disponível em: https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_para/importancia.htm. Acessado em 22 jun 2017.

MEZETTE, T. F.; CARVALHO, C. R. L.; MORGANO, M. A.; SILVA, M. G.; PARRA, E. S. B.; GALERA, J. M. S. V.; VALLE, T. L. Seleção de clones-elite de mandioca de mesa visando a características agrônômicas, tecnológicas e químicas. **Bragantia**, v.68, n.3, p. 601-609, 2009.

MISAKA, T.; KURODA, M.; IWABUCHI, K.; ABE, K.; ARAI, S. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. **Eur. J. Biochem.**, v. 240, p. 609-614, 1996.

MIYA, A.; ALBERT, P.; SHINYA, T.; DESAKI, Y.; ICHIMURA, K.; SHIRASU, K.; NARUSAKA, Y.; KAWAKAMI, N.; KAKU, H.; SHIBUYA, N. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 49, p. 19613-19618, 2007.

MIZUBUTI, E.S.G., MAFFIA, L.A. **Introdução à Fitopatologia - Caderno Didático 115 da UFV.** Viçosa. Editora UFV, 2006. 190 p.

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

NASCIMENTO SB, CARCARDO JCM, MENEZES IC, DUARTE MLR, HARADA ML, DARNET S, DE SOUZA CRB. Identifying Sequences Potentially Related to Resistance Response of *Piper tuberculatum* to *Fusarium solani* f. sp. *piperis* by Suppression Subtractive Hybridization. **Protein Peptide Letters**, v.12, p.1429-1434, 2009.

NEWMAN, M.; SUNDELIN, T.; NIELSEN, J. T.; ERBS, G. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-14, 2013.

NURNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 249-266, 2004.

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

OJIMA, A.; SHIOTA, H.; HIGASHI, K.; KAMADA, H.; SHIMMA, Y. I., WADAMASATA, P., SATOH, S. An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteases in cell cultures and seeds of carrot. **Plant Mol. Biol.**, v. 34, p. 99-109, 1997.

ONYEKA, T. J.; DIXON, A. G. O.; EKPO, E. J. A. Assessment of laboratory methods for evaluating cassava genotypes for resistance to root rot disease. **Mycopathologia**, v.159, p.461-467, 2005a.

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

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.

PIROVANI, C. P.; SANTIAGO, A. S.; SANTOS, L.S.; MICHELI, F.; MARGIS, R.; GESTEIRA, A.S.; ALVIM, F. C.; PEREIRA, G. A. G.; CASCARDO, J. C. M. *Theobroma cacao* cystatins impair *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth and are involved in postponing cell death symptoms. **Planta**, v. 232, p.1485–1497, 2010.

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.111-112, 1997.

POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R.; CARDOSO, S. S. Incidência de *Fusarium solani* em mandioca no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 5, p. 544. 2002.

RASSAM, M.; LAING, W. A. Purification and characterization of phytocystatins from kiwifruit cortex and seeds. **Phytochemistry**, v. 65, p. 19–30, 2004.

RYAN, S. N.; MCMANUS, M. T.; LAING, W. A. Identification and characterization of proteinase inhibitors and their genes from seeds of apple (*Malus domestica*). **J. Biochem.**, v.134, p. 31–42, 2003.

REIS SP, TAVARES LSC, COSTA CNM, SANTA-BRIGIDA AB, de SOUZA CRB. Molecular cloning and characterization of a novel RING zinc-finger protein gene up-regulated under *in vitro* salt stress in cassava. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 6513-6519, 2012.

RODRIGUES, A. R.; ALVES, J. M. A.; UCHÔA, S. C. P.; ALBUQUERQUE, J. A. A.; RODRIGUES, G. S.; BARROS, M. M. Avaliação da capacidade de enraizamento, em água, de brotações, ponteiros e estacas herbáceas de clones de mandioca de mesa. **Agro@ambiente On-line**, v.2, n.1, p.37-45, 2008.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1989

SANTA BRIGIDA, A. B.; REIS, S. P.; COSTA, C. N. M.; CARDOSO, C. M.; LIMA, A. M. DE SOUZA C.R.B. Molecular cloning and characterization of a cassava translationally controlled tumor protein gene potentially related to salt stress response. **Mol. Biol. Rep.** v. 41, p. 1787–1797, 2014.

SANTOS, V.S.; SOUZA, A.S.; VIANA, A.E.S.; FERREIRA FILHO, J.R.; SOUZA, K.A.; MENEZES, M.C. **Multiplicação rápida, método simples e de baixo custo na produção de**

material propagativo de mandioca. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 23 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 44). Disponível em <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/748639/multiplicacao-rapida-metodo-simples-e-de-baixo-custo-na-producao-de-material-propagativo-de-mandioca> Acesso em 17 abr. 2017.

SATHYABHAMA, M., VISWANATHAN, R., MALATHI, P., & SUNDAR, A. R. (2016). Identification of differentially expressed genes in sugarcane during pathogenesis of *Colletotrichum falcatum* by suppression subtractive hybridization (SSH). **Sugar Tech**, v. 18, n. 2, p. 176-183, 2016.

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

SHYU, D. J. H.; CHYAN, C. L.; TZEN, J. T. C.; CHOU, W. M. Molecular cloning, expression, and functional characterization of a cystatin from pineapple stem. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 68, p.1681-1689, 2004.

SILOTO, E.D.; FERNANDES, A. M. Brotação de manivas de mandioca no sistema de propagação rápida sob diferentes níveis de adubação. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 12, p.15-25, 2016.

SILVA, M. N.; CEREDA, M. P.; FIORINI, R.A. Multiplicação rápida de mandioca. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002, p.187-197.

SILVA, R.M. BANDEL, G. FARALDO, M.I.F. & MARTINS, P.S. 2001. Biologia reprodutiva de etnovarietades de mandioca. **Scientia Agricola**, 58(1): 101-107.

SILVA, K. N.; VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; CARVALHO, L. J. C. B.; SILVA, M. S. Potencial agrônomo e teor de carotenoides em raízes de reserva de mandioca. **Cienc. Rural**. v.44, n.8, p. 1348-1354. 2014.

SINGH, P., & ZIMMERLI, L. Z. (2013). Lectin receptor kinases in plant innate immunity. *Frontiers in plant science*, v. 4, p.124, 2013.

TAKAI, R.; KANEDA. T.; ISOGAI, A.; TAKAYAMA, S.; CHE, F. S. A new method of defense response analysis using a transient expression system in rice protoplasts. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 2, p. 590-593, 2007.

THAKUR, M.; SOHAL, B.S. Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. **ISRN Biochemistry** v. 2013, p. 1-10, 2013.

TIMM, E. S., PARDO, L. H., COELLO, R. P., NAVARRETE, T. C., VILLEGAS, O. N., & ORDÓÑEZ, E. S. (2016). Identification of Differentially-Expressed Genes in Response to *Mycosphaerella fijiensis* in the Resistant *Musa* Accession 'Calcutta-4' Using Suppression Subtractive Hybridization. **PLoS one**, v.11, n.8, DOI:10.1371/journal.pone.0160083, 2016.

TOBIMATSU, Y., WAGNER, A., DONALDSON, L., MITRA, P., NICULAES, C., DIMA, O., KIM, J. I., ANDERSON, N., LOQUE, D., BOERJAN, W., CHAPPLE, C., RALPH, J. Visualization of plant cell wall lignification using fluorescence-tagged monolignols. **The Plant Journal**, v. 76, p. 357–366, 2013.

UNDERWOOD, B.A.; SMITASII, S. Micronutrient malnutrition: policies and programs for control and their implications. **Annual Review of Nutrition**, v.19, p.303-324, 1999.

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.

VIEIRA, E.A.; FIALHO, J.F.F.; SILVA, M.S.; FALEIRO, F.G. **Variabilidade genética do banco ativo de germoplasma de mandioca do Cerrado acessada por meio de descritores morfológicos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007b. 15p.

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

VENTURINI, M. T., DA SILVA SANTOS, V., & DE OLIVEIRA, E. J. Procedures for evaluating the tolerance of cassava genotypes to postharvest physiological deterioration. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 7, p. 562-570, 2015.

VRIENS, K., CAMMUE, B., & THEVISSSEN, K. (2014). Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12280-12303, 2014.

WAN, J.; ZHANG, X. C.; NEECE, D.; RAMONELL, K. M.; CLOUGH, S.; KIM, S. Y.; STACEY, M. G.; STACEY, G. A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 20, n. 2, p. 471-481, 2008.

WALDRON, C.; WEGRICH, L. M.; MERLO, P. A.; WALSH, T. A. Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor. **Plant Mol. Biol.**, v. 23, p. 801-812, 1993.

WANG, Y., YUAN, X., HU, H., LIU, Y., SUN, W., SHAN, Z., & ZHOU, X. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in resistant soybean leaves after *Phakopsora pachyrhizi* infection. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n.10, p. 554-560, 2012.

ZIPFEL, C.; FELIX, G. Plants and animals: a different taste for microbes? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 353-360, 2005.

ZIPFEL, C. Early Molecular Events in PAMP-triggered Immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p.414–420, 2009.

ZIPFEL, C., & OLDROYD, G. E. Plant signalling in symbiosis and immunity. **Nature**, v. 543, n.7645, p. 328-336, 2017.

Capítulo II
PROPAGAÇÃO RÁPIDA DE MANDIOCA PARA ESTUDOS EM CONDIÇÕES 1
CONTROLADAS DE CASA DE VEGETAÇÃO

Propagação rápida de mandioca para estudos em condições controladas de casa de vegetação¹

Aline Medeiros Lima^(1,2,3), Jonny Lucio Sousa Silva^(1,4), Elisa Ferreira Moura^(4,*), José Edson de Sampaio⁽⁴⁾, Roberto Lisboa Cunha⁽⁴⁾ e Cláudia Regina Batista de Souza⁽³⁾

⁽¹⁾Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, CEP 66077-530, Brasil. E-mail: aline.lima@ufra.edu.br, jonnylucios.silva@hotmail.com ⁽²⁾Universidade Federal Rural da Amazônia - Campus de Tomé-Açu, Tomé Açu - PA, CEP 68680-000, Brasil. ⁽³⁾ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 66075-110, Brasil. bsouza@ufpa.br. ⁽⁴⁾ Embrapa Amazônia Oriental, Caixa postal 48, Belém, PA CEP 66095-903, Brasil, elisa.moura@embrapa.br, jose.sampaio@embrapa.br, roberto.cunha@embrapa.br
*Corresponding author: elisa.moura@embrapa.br

Resumo – O presente trabalho teve como objetivo testar a metodologia de propagação rápida da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) para a produção de plantas adequadas para estudos em condições controladas de casa de vegetação. A metodologia consistiu na indução de brotos a partir de manivas, e posterior corte e enraizamento na água, seguido do preparo das mudas, aclimatação em viveiros e posterior desenvolvimento em casa de vegetação até que as raízes estivessem em fase de tuberização. Os procedimentos foram baseados na metodologia de propagação rápida da mandioca descrita na literatura, contudo as câmaras de propagação e de enraizamento foram adaptadas com clarete com 20% de sombreamento devido as condições climáticas de Belém-PA. Foram utilizados quatro cultivares do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca da Embrapa Amazônia Oriental (Belém-PA), os quais apresentaram

desempenhos diferenciados nas etapas de produção de brotos, de enraizamento e de aclimação. Os cultivares BRS Poti e CPATU 530 apresentaram maior taxa de multiplicação, produzindo mudas com qualidade e quantidade adequadas para estudos em casa de vegetação e que necessitem de raízes já tuberizadas, como aqueles que requerem a inoculação de patógenos causadores da podridão radicular e/ou a análise de genes com expressão diferencial em raízes nesta fase de desenvolvimento.

Termos para indexação: *Manihot esculenta*, produção de mudas, raízes tuberosas.

Abstract – The present work aimed to test the methodology of rapid propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) for the production of plants suitable for studies under greenhouse controlled conditions. The method was based on bud induction from stem cuttings, which were cut and water rooted, followed by seedlings preparation, acclimatization in the nursery and further development under greenhouse until roots were tuberized. The procedures were based on the methodology of rapid propagation of cassava described on the literature, although the propagation and rooting chambers were adapted with clarity that reduced light transmission by 20%, due to climatic conditions of Belém, Pará, Brazil. It was used four accessions from a germplasm bank, which had different behavior during the phases of bud production, rooting and acclimatization. The accessions BRS Poti and CPATU 530 had higher rate of bud multiplication and produced higher-quality and quantity seedlings, suitable for studies under greenhouse conditions and that need tuberized roots, such as those that require the inoculation of root rot pathogens and/or differential expression analyses of root genes in this developmental stage.

Index terms: *Manihot esculenta* Crantz, seeding production, tuberous roots.

Introdução

Manihot esculenta Crantz é uma espécie de arbusto nativo do Brasil, conhecida popularmente como mandioca, macaxeira e aipim (Cordeiro et al., 2017). De fácil adaptação, a mandioca é cultivada em todo o mundo, principalmente na Ásia, África e América onde milhões de pessoas dependem da raiz de reserva desta cultura (FAO, 2017). No Brasil, seu cultivo ocorre em todos os Estados, sendo a região norte responsável por mais de 40% da produção nacional (IBGE, 2017) onde possui uma ampla utilização na alimentação (animal e humana) e na indústria (Vieira et al., 2011).

A mandioca é considerada uma cultura rústica e a maior parte dos cultivos está concentrada em pequenos produtores, que utilizam um sistema rudimentar de manejo e baixo uso de insumos (Alves Filho et al., 2015). O sucesso da mandiocultura depende, em grande parte, da utilização de mudas de boa qualidade. A obtenção de mudas de mandioca é feita preferencialmente por propagação vegetativa, onde pedaços do caule, chamados manivas-semente ou estacas, são utilizados para gerar plantas geneticamente idênticas (Silva et al., 2002; Carvalho & Guerra, 2002).

Na propagação vegetativa, após as manivas serem colocadas em contato com o solo, as brotações e as primeiras raízes, conhecidas como raízes adventícias, surgem entre 15 e 20 dias após o plantio (DAP). Com 30 DAP as folhas verdadeiras começam a se expandir e se inicia o processo fotossintético. O desenvolvimento das raízes de armazenamento inicia-se de 35-52 DAP, e a partir de oito meses já estão aptas para serem colhidas, no entanto as variações nas condições climáticas e o tipo de acesso podem afetar este processo, sendo recomendada a colheita entre 10 e 12 meses (Wechkrajang et al., 2006; de Souza et al., 2015).

Apesar de sua rusticidade, vários fatores relacionados a estresses biótico e abiótico limitam a expansão da mandiocultura (Borges et al., 2002; Oliveira et al., 2013; Venturini et al., 2015; Pietrowski et al., 2014; Vilas-Boas et al., 2016). Nos últimos anos, diversos estudos

utilizando tecidos destacados de mandioca foram realizados com o objetivo de investigar a resposta da planta frente aos diferentes estresses. Um exemplo é a utilização de folhas destacadas para identificar genes envolvidos na resposta ao estresse salino (Costa et al., 2011; Reis et al., 2012; Santa Brígida et al., 2014). As raízes destacadas é um outro exemplo, já que estudos para identificar acessos resistentes e susceptíveis a podridão radicular têm utilizado este tecido (Oliveira et al., 2013; Vilas-Boas et al., 2016). No entanto, os métodos que utilizam tecidos destacados não permitem avaliar os processos fisiológicos e/ou moleculares em outras partes da planta, bem como, por períodos de tempo mais prolongados. No caso das raízes de mandioca ainda se observa a deterioração pós-colheita, cujos sintomas assemelham-se aos causados por patógenos, levando a uma interpretação equivocada dos resultados dos estudos visando a identificação de fontes de resistência a doenças (Venturini et al., 2015).

A metodologia da propagação rápida da mandioca, estabelecida inicialmente pelo CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (Cock et al., 1976) é utilizada para contornar o baixo índice de multiplicação da cultura pelo método de propagação tradicional, sendo um instrumento capaz de viabilizar a produção de mudas sadias, com baixo custo e de fácil acesso. Esta metodologia envolve basicamente a indução de brotos a partir da maniva, e posterior corte e enraizamento na água, seguido do preparo das mudas, aclimação em viveiros e plantio no campo (Cock et al., 1976; Silva et al., 2002; Fukuda & Carvalho, 2006). Contudo esta metodologia deve ser testada nas condições climáticas onde os experimentos são conduzidos, e seu sucesso depende também das características genéticas da acesso usada.

Diante da necessidade de plantas de mandioca sadias, apresentando raízes tuberizadas e desenvolvimento homogêneo para uso em estudos em condições controladas, como os que buscam o entendimento dos mecanismos de tolerância da planta a estresses, o presente trabalho objetivou testar a metodologia de propagação rápida em acessos de um Banco Ativo de Germoplasma e nas condições climáticas de Belém-PA.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos em condições ambientais, entre os meses de agosto de 2016 a maio de 2017, na Embrapa Amazônia Oriental com sede em Belém-PA, região caracterizada por umidade e temperatura elevadas durante todo o ano (Oliveira et al., 2016). Quatro acessos de um Banco Ativo de Germoplasma, os acessos CPATU 530, CPATU 348, BRS Kiriris e BRS Poti, foram utilizados neste trabalho, sendo os dois primeiros susceptíveis e os dois últimos tolerantes a podridão radicular.

Para a produção de brotos enraizados foram utilizadas duas instalações, uma câmara de propagação e uma câmara de enraizamento, preparadas conforme Silva et al. (2002) (Figura 1A). Devido às condições climáticas de Belém foi necessária uma adaptação na câmara de propagação, substituindo o plástico transparente da cobertura por clarite 1003 com 20% de sombreamento (Figura 1B). Por outro lado, a câmara de enraizamento consistiu em uma estrutura metálica coberta com clarite 1003 verde com 20% de sombreamento na parte frontal, e plástico transparente nas demais partes (Figura 1B).

A primeira etapa consistiu na obtenção das manivas-sementes a partir dos dois terços inferiores da haste principal de plantas saudáveis e vigorosas, com 12 meses de idade. Foram cortados toletes com 10 cm em média, cada um contendo duas gemas. Em seguida, cerca de 40 manivas-sementes de cada cultivar, foram plantadas em linha nas câmaras de propagação, com as gemas voltadas para cima (Figura 1C), sendo umedecidas sempre que necessário (Figura 1D), já que esta instalação não possibilita a manutenção da umidade.

Quando os brotos atingiram de 10 a 15 centímetros, estes foram cortados abaixo de uma gema e imediatamente colocados em água destilada, para indução do enraizamento. Os cortes foram feitos com estilete esterilizado com álcool etílico 70% (Figura 1E). Em seguida, o excesso de folhas presente nos brotos foi retirado para evitar a murcha devido à perda excessiva de água. Os brotos cortados foram colocados em copos plásticos (capacidade de

300 mL) contendo 100 mL de água destilada, sendo 3 brotos/copo, com troca de água a cada dois dias (Figura 1 F). Na câmara de enraizamento, foi necessário que os copos plásticos estivessem a uma distância mínima de 1,50 m em relação ao teto, evitando o deslocamento dos mesmos devido a força do vento, o que poderia prejudicar a indução do enraizamento. Nos primeiros dias as folhas murcharam e algumas caíram logo em seguida. Após sete dias formaram-se brotações na base (Figura 1 G1), e posteriormente as raízes adventícias aos 15 dias (Figura 1 G2). As folhas que caíram e os brotos que apodreceram foram descartados.

Na etapa seguinte os brotos enraizados foram plantados em sacos de polietileno 18 x 35 cm contendo terra preta, as mudas foram transferidas para um telado de madeira coberto com sombrite a 50% de luminosidade. Na ausência de chuvas, as mudas foram umedecidas com água (Figura 1H). Os acessos foram cultivados por 90 dias e o desenvolvimento das raízes foi monitorado durante este período.

Por último, as plantas com três meses de idade foram transplantadas para vasos de 10 litros contendo terra preta. Para isto, o saco preto de polietileno foi retirado com cuidado para não danificar as raízes existentes e a planta foi colocada no vaso, o qual foi preenchido com terra preta. Após o transplante, as plantas foram umedecidas, e mantidas em casa de vegetação com irrigação diária até completarem 6 meses, quando foram observadas raízes já tuberizadas.

Resultados e Discussão

A propagação vegetativa da mandioca é um processo vantajoso visto que mantém as características da planta mãe, contudo apresenta limitações como a baixa taxa de multiplicação, a redução da qualidade sanitária da maniva durante ciclos sucessivos de propagação, além da facilidade de transmissão de doenças através do material de propagação (Fukuda & Carvalho, 2006; Santos et al., 2009; Siloto & Fernandes, 2016). Para sanar essas dificuldades o CIAT desenvolveu a metodologia de propagação rápida da mandioca (Cock et

al., 1976), a qual foi testada em algumas regiões brasileiras, proporcionando um aumento significativo do fator de multiplicação da cultura comparado com o método de propagação tradicional (Silva et al. 2002; Fukuda & Carvalho, 2006; Rodrigues et al. 2008; Alves et al. 2009; Santos et al. 2009; Vieira & Moura, 2011).

No presente trabalho a metodologia de propagação rápida da mandioca foi testada nas condições climáticas de Belém-PA e objetivou a obtenção de plantas de mandioca com raízes tuberizadas adequadas para estudos em condições controladas de casa de vegetação.

A metodologia de propagação rápida inicia-se com uma fase de propagação na qual se utiliza uma câmara de propagação, a qual proporciona um ambiente com umidade e temperatura mais elevadas, que segundo Silva et al. (2002) e Fukuda & Carvalho (2006) possibilitam uniformizar e acelerar a brotação das gemas. Contudo, devido as condições de alta umidade e temperatura em Belém-PA, a utilização do plástico transparente recomendado por Silva et al. (2002) fez com que a temperatura no interior da câmara ficasse muito elevada, limitando a produção de brotos em todos os acessos utilizados (dados não mostrados). Sendo assim, o plástico transparente teve que ser substituído por clarite 1003 na cor verde com 20% de sombreamento (Figura 1 B).

A adaptação da câmara de propagação com o clarite 1003 surtiu efeito positivo, pois sanou a condição de alta temperatura devido ao plástico transparente, e proporcionou condições adequadas para o processo de brotação, gerando brotos com desenvolvimento uniforme, e estando de acordo com dados obtidos por Silva et al. (2002) e Fukuda & Carvalho (2006) que relataram brotos com 20 DAP apresentando 15 cm de altura.

Quando o desenvolvimento dos brotos obtidos na câmara de propagação foi comparado com os brotos obtidos em condições de campo na propagação tradicional, observou-se uma aceleração na etapa de brotação e expansão foliar, visto que em condições de campo as primeiras folhas fotossintéticas ativas surgem em média com 30 DAP

(Wechkrajang et al., 2006; de Souza et al., 2015), enquanto que no presente trabalho aos 20 DAP já se pôde observar um padrão de desenvolvimento semelhante, com brotos com 15 cm de altura (Figura 1E). No entanto, necessita-se de estudos adicionais para esclarecer se esta variação foi devido às condições proporcionadas pela câmara de propagação ou às características genéticas dos acessos utilizados.

A segunda etapa do método de propagação rápida consistiu no corte dos brotos para posterior enraizamento em água. A primeira colheita dos brotos que atingiram a altura entre 10-15 cm ocorreu 20 DAP, e a segunda colheita 28 DAP, estando este tempo de corte em concordância com o observado quando a metodologia de propagação rápida foi adaptada para as condições de São Luiz do Maranhão (Silva et al., 2002) e de Araripina, em Pernambuco (Fukuda & Carvalho, 2006). Nos dois cortes realizados foi obtido um total de 414 brotos, sendo que a capacidade de brotação variou entre os acessos utilizados, e o BRS Poti apresentou melhor desempenho produzindo 145 brotos (Tabela 1). Segundo a literatura, a capacidade de brotação das manivas varia dependendo das partes do caule (Porto et al., 1979) e dos acessos que são utilizados (Alves et al., 2009; Santos et al., 2009). No presente trabalho buscou-se utilizar manivas-sementes a partir dos dois terços inferiores da haste principal de plantas saudáveis e vigorosas, com 12 meses de idade, seguindo as recomendações de Porto et al. (1979), e portanto o resultado observado deve-se provavelmente à diferença genética entre os acessos. Alves et al. (2009), em estudo com dois acessos de mandioca de mesa, observaram que o acesso Pão teve uma produção de brotos quase duas vezes menor que o acesso Aciolina.

Os brotos cortados, incubados em água, permaneceram 22 dias na câmara de enraizamento, sendo que nos seis primeiros dias algumas folhas murcharam (Figura 1F), e surgiram também as primeiras brotações (Figura 1G1). As primeiras raízes adventícias surgiram 12 dias após o corte (Figura 1G2), e dez dias depois os brotos enraizados já estavam

bem desenvolvidos e adequados para serem plantados, os resultados estão de acordo com os descritos para a região nordeste (Silva et al., 2002 e Fukuda & Carvalho, 2006).

Quanto ao enraizamento, somente o acesso CPATU 348 teve uma baixa taxa de enraizamento (~32%), sendo que os demais ficaram acima de 90%. Rodrigues et al. (2008) também observou resultado similar, já que o acesso de mandioca de mesa Aciolina apresentou uma baixa capacidade de enraizamento quando utilizado o método de propagação rápida por meio de micro-estacas comparado com o acesso Pão. A capacidade de enraizamento de brotos de mandioca em água, segundo Rodrigues et al. (2008) depende do fator genético e da origem da água utilizada; e a água proveniente da chuva pode ser uma excelente opção para indução do enraizamento das estruturas vegetativas da mandioca no processo de propagação rápida. Dentre as alterações observadas nesta etapa, a baixa taxa de enraizamento do acesso CPATU 348 foi evidenciada pela não formação de calos (Figura 2 A), com posterior apodrecimento do material. E no caso do BRS Kiriris, apesar da alta taxa de enraizamento, foram observados alguns pontos escuros (Figura 2B), que podem estar relacionados com apodrecimento do tecido, com potencial efeito na capacidade de aclimação. Desta forma, é necessário testar outras condições de enraizamento para estes acessos.

No final da etapa de enraizamento foi obtido um total de 322 brotos que apresentaram raízes de absorção bem desenvolvidas, que foram plantados em sacos de polietileno contendo terra preta resultando em 207 mudas ao final de três meses. Na produção de mudas, o BRS Poti e o CPATU 530 tiveram eficiências similares, com taxas de aclimação acima de 77%, contudo como o CPATU 530 produziu um número menor de brotos, o BRS Poti teve um melhor rendimento com a produção de 117 mudas enquanto o CPATU 530 produziu 68 mudas. A partir dos dados obtidos pode-se concluir que o acesso BRS Poti apresentou a maior taxa de multiplicação, pois produziu o maior número de mudas. Esse melhor desempenho pode estar relacionado ao fato do acesso BRS Poti possuir maior vigor híbrido por se tratar de

um cultivar resultante de cruzamento. Os acessos CPATU 348 e BRS Kiriris não apresentaram resultados satisfatórios já que o primeiro não produziu mudas e o segundo resultou em 22 mudas e com baixa qualidade.

As mudas permaneceram no viveiro por 90 dias, sendo possível observar os sinais de tuberização nas raízes de armazenamento (Figura 3). Em condições de campo o desenvolvimento das raízes de armazenamento inicia-se de 35-52 DAP (Wechkrajang et al., 2006; de Souza et al., 2015). Nesta fase se observou também a necessidade de trocar o saquinho por um vaso maior, pois recipientes pequenos podem limitar o desenvolvimento da planta pelo volume de substrato neles contido (Almeida et al., 2014).

A limitação do substrato contido nos sacos plásticos é uma possível explicação para um desenvolvimento radicular tardio em relação ao observado no campo, no entanto novos estudos devem ser realizados para determinar o tamanho ideal do recipiente para o plantio dos brotos. De acordo com dados da literatura, processos fisiológicos da planta, como a absorção de água e nutrientes, a redução de assimilação líquida de carbono e o crescimento da parte aérea podem ser afetados diretamente pelo tamanho do vaso usado, resultando numa consequente restrição ao crescimento radicular (Andrade et al., 2012; Macana, 2012).

As plantas transferidas para os vasos foram mantidas em casa de vegetação, sendo que após 30 dias já apresentavam sinais de crescimento, demonstrando que a limitação do substrato e o sombreamento estavam influenciando o seu desenvolvimento (Figura 4.1). Este período se prolongou por mais 60 dias, quando as raízes de armazenamento já se apresentavam bem desenvolvidas (Figura 4.2).

A utilização do método de propagação rápida da mandioca com câmara de propagação adaptada com clarite, no presente trabalho, possibilitou a obtenção de mudas de mandioca saudáveis e com baixo custo, sendo uma alternativa para sanar as dificuldades dos estudos com tecidos destacados, principalmente raízes. Isto porque a utilização de raízes destacadas em

estudos de identificação de fontes de resistência a patógenos que causam podridão radicular em mandioca não possibilita uma avaliação ampla, e os sintomas causados pelo patógeno podem ser confundidos com os sintomas da deterioração pós-colheita (Oliveira et al., 2013; Venturini et al., 2015; Vilas-Boas et al., 2016).

No caso da BRS Poti, foi obtido um total de 117 mudas, número suficiente de plantas para estudos moleculares de interação planta-patógeno, como por exemplo a biblioteca subtrativa (de Souza et al., 2011), onde devem ser considerados os tratamentos utilizados (plantas inoculadas e plantas não inoculadas com o patógeno, em diferentes tempos de exposição) e o número de repetições para cada tratamento.

Conclusões

- 1- A utilização da metodologia de propagação rápida da mandioca nas condições de clima quente e úmido necessita de adaptação nas câmaras de propagação e de enraizamento, onde o plástico transparente deve ser substituído por clarite com 20% de sombreamento;
- 2- Foi possível obter mudas dos cultivares BRS Poti e CPATU 530 (o primeiro tolerante e o segundo susceptível à podridão mole da raiz) com qualidade e quantidade adequadas para estudos em condições controladas;

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa; à Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas do Pará (FAPESPA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa; e à Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), à Embrapa Amazônia Oriental e à Universidade Federal do Pará (UFPA) pelo apoio a pesquisa.

Referências

- ALBUQUERQUE, A.S., & BRANDÃO, I.C.D. **Acessos BRS Mari e BRS Poti e medidas de controle da podridão-mole da mandioca**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 24p. (Embrapa Amazônia Oriental, Documento, 326) Disponível em: http://www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online. Acessado em: 11 out. 2017.
- ALMEIDA, M.D.O.; FERREIRA, E.A.; SILVA, D.V.; DOS SANTOS, J.B.; RODRIGUES, R.B.; DE SOUZA, B.P.; DA COSTA, S.S.D. Influência do tamanho do vaso e época de avaliação sobre o crescimento do picão preto em competição com milho e soja. **Bioscience Journal**, v.30, p.1428-1437, 2014.
- ALVES, J.M.A.; ARRUDA, K. R.; RODRIGUES, G.S.; UCHÔA, S.C.P.; ALBUQUERQUE, J.A.A. Brotação de manivas para a propagação rápida da mandioca. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 5, p. 280-284, 2009.
- ALVES, J. D. N., DE SOUZA, F. C. A., & VALENTE, J. Crescimento da produção de mandioca e pimenta-do-reino na microrregião do Guamá, estado do Pará, no período de 2000-2011. **Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer**, v. 10, p. 1792-1799, 2014.
- ANDRADE, F.R.; PETTER, F.A.; JUNIOR, B.H.M.; ZUFFO, A.M.; DE SOUZA, T.R.; GONÇALVES, L.G. Formação de mudas de mamona em diferentes recipientes. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, p. 274-279, 2012.
- BORGES, M.F.; FUKUDA, W.M.G.; ROSSETTI, A.G. Avaliação de variedades de mandioca para consumo humano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1559-1565, 2002.
- CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, v.136, p.159-168, 2002.
- COCK, J.H; WHOLEY, D.; LOZANO J.C.; TORO, J.C. **Sistema rápido de propagação de yuca**. Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1976. 12 p. (Serie ES: Centro

Internacional de Agricultura Tropical. Nº. 20). Disponível em http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/CIAT/books/historical/147.pdf. Acessado em: 15 out. 2017.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; SILVA, M.J.DA; SODRÉ, R.C.; MARTINS, M.L.L. *Manihot* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17600>. Acesso em: 22 Jun. 2017.

COSTA, C. N.M.; SANTA-BRÍGIDA, A. B.; BORGES, B. N.; MENEZES-NETO, M. A.; CARVALHO, L. J. C. B.; DE SOUZA C. R. B. Levels of MeLEA3, a cDNA sequence coding for an atypical late embryogenesis abundant protein in cassava, increase under in vitro salt stress treatment. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.29, p.997–1005, 2011.

DE SOUZA C.R.B; SANTA BRÍGIDA, A.B; DOS SANTOS R.C.; COSTA C.N.M.; DARNET, S.H.; HARADA, M.L.; Identification of sequences expressed during compatible black pepper - *Fusarium solani* f. sp. *piperis* interaction. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, p.2553-2560, 2011.

DE SOUZA, C. R. B.; REIS, S. P.; CARVALHO, L. J. C. B. An overview of protein identification studies in cassava. **Current Protein & Peptide Science**, v.16, p.219-27, 2015.

FAO. **Why cassava?** Disponível em http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcnds/index_en.html Acesso em 16 out 2017.

FUKUDA, W.; de CARVALHO, H. W. L. **Propagação rápida de mandioca no nordeste brasileiro**. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. 6 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, 45). Disponível em <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/372216>. Acessado em: 15 out. 2017.

IBGE (2017). **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro v.30 n.3 p.1-83 Março. 2017.

- MACANA, Y.A.M. **Efeitos da disponibilidade de água e de luz no metabolismo fotossintético em *Coffea arabica***. 2012. 46 p.. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- OLIVEIRA, S.A.S. de; HOHENFELD, C.S.; SANTOS, V. D.A.S.; HADDAD, F.; OLIVEIRA, E.J. Resistance to fusarium dry root rot disease in cassava accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1414-1417. 2013.
- OLIVEIRA, M.C.F.; SOUZA JÚNIOR, J.A.; CRUZ, P.P.N.; SOUZA FILHO, J.D. Climatologia urbana da cidade de Belém-Pará, através das precipitações e temperaturas do ar, das normais climatológicas de 1941 a 1970, 1971 a 2000 e da normal provisória de 2001 a 2015. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.09, p.803-819, 2016.
- PIETROWSKI, V.; RHEINHEIMER, A.R.; MIRANDA, A.M.; DA SILVA WENGRAT, A. P.G.; BARILLI, D.R. Ocorrência de *Aleurothrixus aepim* (Goeldi, 1886) em mandioca na região Oeste do Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, p.186-188, 2014.
- REIS S.P., TAVARES L.S.C, COSTA C.N.M, SANTA-BRIGIDA A.B., de SOUZA C.R.B. Molecular cloning and characterization of a novel RING zinc-finger protein gene up-regulated under *in vitro* salt stress in cassava. **Molecular Biology Reports**, v.39, p.6513-6519, 2012.
- RODRIGUES, A. R.; ALVES, J. M. A.; UCHÔA, S. C. P.; ALBUQUERQUE, J. A. A.; RODRIGUES, G. S.; BARROS, M. M. Avaliação da capacidade de enraizamento, em água, de brotações, ponteiros e estacas herbáceas de clones de mandioca de mesa. **Agro@ambiente On-line**, v.2, n.1, p.37-45, 2008.
- SANTA BRIGIDA, A.B.; REIS, S.P.; COSTA, C.N.M.; CARDOSO, C.M.; LIMA, A.M.; DE SOUZA C.R.B. Molecular cloning and characterization of a cassava translationally controlled tumor protein gene potentially related to salt stress response. **Molecular Biology Reports**, v.41, p.1787–1797, 2014.

SANTOS, V.S.; SOUZA, A.S.; VIANA, A.E.S.; FERREIRA FILHO, J.R.; SOUZA, K.A.; MENEZES, M.C. **Multiplicação rápida, método simples e de baixo custo na produção de material propagativo de mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 23 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 44). Disponível em <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/748639/multiplicacao-rapida-metodo-simples-e-de-baixo-custo-na-producao-de-material-propagativo-de-mandioca> Acesso em 17 abr. 2017.

SILOTO, E.D.; FERNANDES, A. M. Brotação de manivas de mandioca no sistema de propagação rápida sob diferentes níveis de adubação. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 12, p.15-25, 2016.

SILVA, M. N.; CEREDA, M. P.; FIORINI, R.A. Multiplicação rápida de mandioca. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002, p.187-197.

WECHKRAJANG, S.; VICHUKIT, V.; TOONKOOL, P.; NAKASATHIEN, S. Anatomical characterization and protein profiles in adventitious and storage roots of two commercial Thai cassava varieties. **Kasetsart Journal (Natural Science)**, v. 40, p.297-305, 2006.

VENTURINI, M.T.; DA SILVA SANTOS, V.; DE OLIVEIRA, E. J. Procedimentos para avaliar a tolerância de genótipos de mandioca à deterioração fisiológica pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.50, p.562-570, 2015.

VIEIRA, E.A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F.G.; BELLON, G. SILVA, M.S. Caracterização molecular de acessos de mandioca biofortificados com potencial de uso no melhoramento genético. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, p.457-463, 2011.

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.

Tabela 1. Número de brotos obtidos, taxa de enraizamento ao final de 22 dias e taxa de aclimação ao final de três meses, de acessos de mandioca testados com a metodologia de propagação rápida da mandioca.

Acesso	Nº de brotos obtidos	Taxa de enraizamento	Taxa de aclimação
BRS Poti	145	94,5%	85,4%
Surubim 41	107	31,7%	-----
BRS Kiriris	70	91,4%	34,3%
CPATU 530	92	95,6%	77,3%

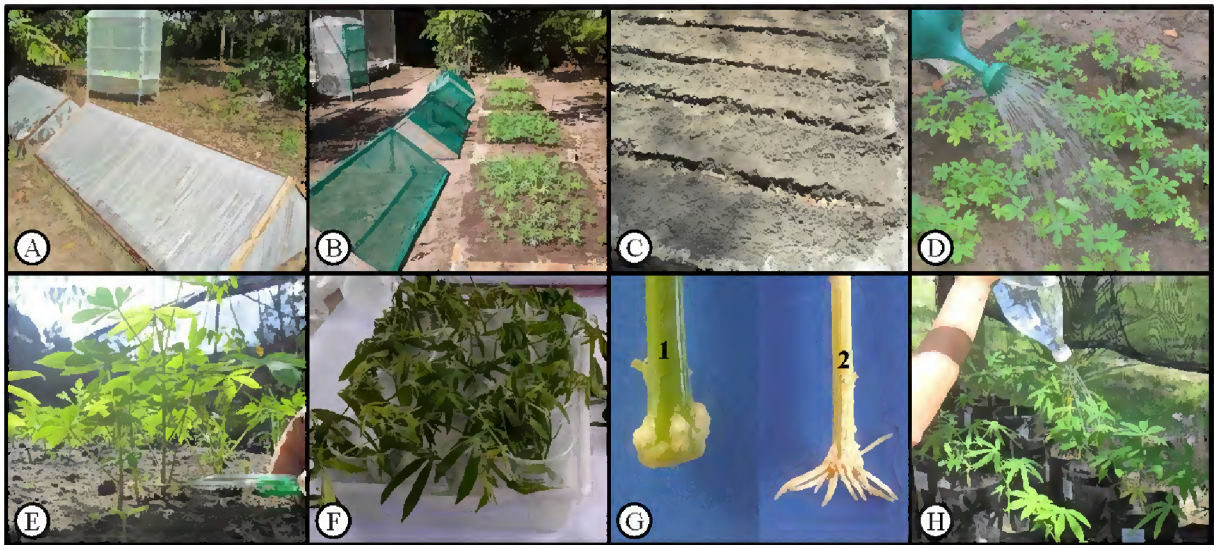


Figura 1. Etapas de propagação, enraizamento e plantio dos brotos para obtenção das mudas de mandioca. Em (A) câmara de propagação no primeiro plano e câmara de enraizamento ao fundo, ambas construídas conforme Silva et al. (2002); (B) câmara de propagação no primeiro plano, e câmara de enraizamento ao fundo, adaptadas com clarite para as condições de Belém-PA; (C) plantio das manivas; (D) cultivo dos brotos com irrigação diária; (E) Corte dos brotos com 15 centímetros de comprimento; (F) Brotos colocados em copos plásticos contendo água destilada para enraizamento, apresentando murcha inicial das folhas; (G1) Formação de calos após 5 dias; (G2) Posterior formação de raízes adventícias nos brotos; (H) Mudanças plantadas em sacos plásticos contendo terra preta, mantidas em telado de madeira e irrigadas na ausência de chuvas.

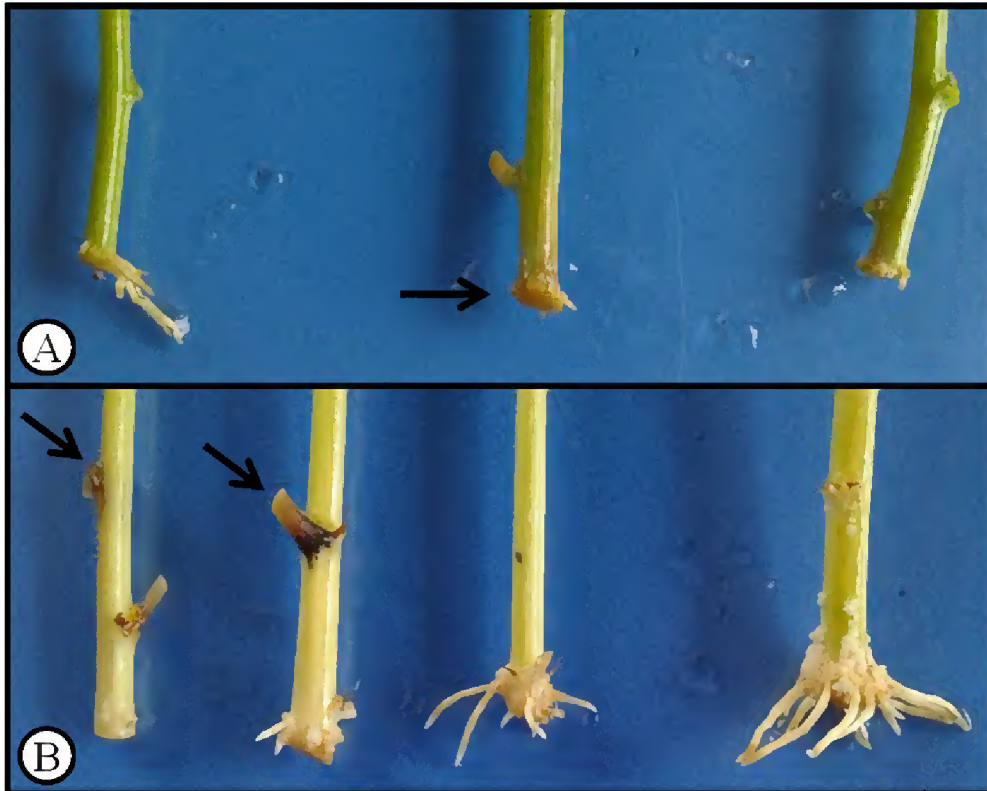


Figura 2. Brotos em fase de enraizamento. (A) Brotos do genótipo CPATU 348, com a ausência de calos, indicada pela seta; (B) Brotos do acesso BRS Kiriris, com setas indicando o aparecimento de pontos escuros.



Figura 3. Estágio do desenvolvimento das raízes com 90 dias após o plantio dos brotos do acesso BRS Poti (A) As raízes adventícias ocupam a maior parte do substrato (B e C) se observa a presença de raízes em fase inicial de tuberização.



Figura 4. Desenvolvimento das plantas com 120 e 180 dias após o plantio dos Brotos dos acessos (A) BRS Poti, (B) CPATU 530 e (C) BRS Kiriris. (1) Plantas com 120 dias e (2) plantas com 180 dias após o plantio, apresentando raízes tuberosas bem desenvolvidas.

Capítulo III

PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA: METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA

1 **PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA: METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO E**
2 **DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA¹**

3

4 Aline Medeiros Lima^(1,2,3), Jonny Lucio Sousa Silva^(1,4), Elisa Ferreira Moura Cunha^(4,*),
5 Alessandra Keiko Nakasone Ishida⁽⁴⁾, Roberto Lisboa Cunha⁽⁴⁾ e Cláudia Regina Batista de
6 Souza⁽³⁾

7

8 ⁽¹⁾Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia,
9 Belém, PA, CEP 66077-530, Brasil. E-mail: aline.lima@ufra.edu.br,
10 jonnylucios.silva@hotmail.com ⁽²⁾Universidade Federal Rural da Amazônia - Campus de
11 Tomé-Açu, Tomé Açu - PA, CEP 68680-000, Brasil. ⁽³⁾ Instituto de Ciências Biológicas,
12 Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 66075-110, Brasil. bsouza@ufpa.br. ⁽⁴⁾ Embrapa
13 Amazônia Oriental, Caixa postal 48, Belém, PA CEP 66095-903, Brasil,
14 elisa.moura@embrapa.br, alessandra.ishida@embrapa.br, roberto.cunha @embrapa.br
15 *Corresponding author: elisa.moura@embrapa.br

16

17 Resumo - O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo de inoculação do
18 agente causador da podridão radicular das raízes em plantas jovens de mandioca. Para a
19 obtenção das plantas foi utilizada a metodologia de propagação rápida em condições de casa
20 de vegetação. O isolado de *Phytophthium* sp. foi cultivado e inoculado em plântulas com
21 raízes adventícias e plantas de mandioca com raízes tuberizadas. A inoculação em plântulas
22 com raízes adventícias não resultou em sintomas característicos de podridão radicular,
23 enquanto a inoculação em plantas com raízes tuberizadas e solo infestado com o patógeno
24 *Phytophthium* sp. resultou em sintomas característicos de podridão radicular.

¹Este capítulo segue a norma de apresentação da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira - PAB

25 Termos para indexação: *Manihot esculenta*, *Phytophytium* sp., propagação rápida da
26 mandioca e interação planta-patógeno.

27 Abstract - The aim of this work was establish a protocol of inoculation of the root rot agent in
28 young cassava plants. The methodology for getting plants was the fast propagation
29 methodology under greenhouse conditions. The isolate of *Phytopythium* sp. was cultiveted
30 and inoculed in seedlings with adventitious roots and cassava plants with tuberous roots.
31 Inoculation on seedlings with adventitious roots did not result in symptoms characteristic of
32 root rot, while inoculation in plants with tuberized roots and soil infested with the pathogen
33 *Phytophytium* sp. resulted in symptoms characteristic of root rot.

34 Index termos: *Manihot esculenta*, *Phytophytium* sp., Rapid propagation of cassava and plant-
35 pathogen interaction.

36

37

Introdução

38 A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma espécie cultivada em diversos países,
39 visando principalmente o aproveitamento de suas raízes tuberosas ricas em amido utilizadas
40 em processos industriais e como fonte de calorías na alimentação humana e animal (Vieira et
41 al., 2011). Em algumas regiões do planeta como África, Ásia e America Latina milhões de
42 pessoas dependem da mandioca, principalmente como fonte de alimento e renda, sobretudo
43 para pequenos agricultores (FAO, 2015).

44 No Brasil, a mandioca é cultivada em todas as regiões, onde o estado do Pará se
45 destaca o principal produtor, com uma produção de 4,7 mil toneladas em 2016 (IBGE, 2017).
46 Essa produção é limitada pela baixa adoção de tecnologia, aliada a incidência de limitações de
47 origem biótica causadas por insetos (Pietrowski et al., 2014), ácaros e microrganismos
48 (Oliveira et al., 2013; Vilas-Boas et al., 2016).

49 A podridão radicular da mandioca é causada principalmente pelo fungo *Fusarium*
50 *solani* (Poltronieri et al., 2002) e oomicetos dos gêneros *Phytophthora* e *Pythium* (Poltronieri
51 et al., 1997) e recentemente *Phytophythium* sp. foi descrito como causador da doença no Estado
52 do Pará (Boari et al., 2018). Esta é uma doença de alto impacto econômico e social, por gerar
53 drástica queda na produtividade das raízes de mandioca e inviabilizar as áreas de plantio ao
54 longo de novos ciclos de cultura (Notaro, 2013).

55 Um dos desafios da identificação de fontes de resistência à podridão radicular nos
56 acessos de mandioca é a falta de metodologias adequadas para seleção de genótipos por meio
57 de inoculações artificiais, de modo a refletir o comportamento destes em condições de campo.
58 O método de inoculação de raízes destacada, apesar de ser a metodologia de seleção
59 atualmente utilizada na busca por genótipos resistentes à podridão radicular é uma
60 metodologia que necessita de uma programação na colheita das raízes (com tempo mínimo de
61 10 meses de plantio) e uma cuidadosa triagem para que não sejam utilizadas raízes com
62 injúrias e com infecções provenientes do campo (Onyeka et al., 2005a; Oliveira et al., 2013;
63 Vilas-Boas et al., 2016). Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer um
64 protocolo de inoculação do agente causador da podridão radicular das raízes em plantas
65 jovens de mandioca.

66

67

Material e métodos

68 Os experimentos foram conduzidos em condições ambientais entre os meses de agosto
69 de 2016 a junho de 2017, na Embrapa Amazônia Oriental com sede em Belém-PA região
70 caracterizada por umidade e temperatura elevada durante todo o ano (Oliveira et al., 2016).

71 Para a obtenção das plântulas com raízes adventícias e plantas com raízes tuberculadas
72 foi utilizada a metodologia da propagação rápida de mandioca para a região norte em
73 condições de casa de vegetação (Capítulo anterior). Dois genótipos com 12 meses de idade

74 foram selecionados no Banco Ativo de Germoplasma de mandioca da Embrapa Amazônia
75 Oriental. O acesso CPATU 530, conhecido como Olho Verde 1, apresenta o fenótipo
76 suscetível à podridão radicular, enquanto o acesso BRS Poti é tolerante à doença
77 (Albuquerque & Brandão, 2008).

78 O isolado de *Phytopythium* sp. utilizado neste trabalho está catalogado na Micoteca da
79 Embrapa Amazônia Oriental (CPATU) com o código CT0084. Um fragmento da coleção foi
80 retirado e inserido numa placa de Petri contendo meio de cultura Mandioca Mansa Dextrose
81 Ágar (MMDA) (Dados não publicados) a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e escuro contínuo por 7 dias.

82 Objetivando testar a melhor umidade para o crescimento do *Phytopythium* sp., foram
83 autoclavados frascos de vidro de 1000 mL contendo 250 g de areia branca e fubá de milho na
84 proporção de 3:1 (p/p) de areia lavada peneirada e fubá de milho. As condições de umidade
85 testada foram natural (sem a adição de água), 10% (25 mL de água/frasco contendo 250g) e
86 30% (75 mL de água/frasco contendo 250g). Estes foram autoclavados duas vezes por 1h a
87 121°C com intervalo de 24h. Após o resfriamento, foram adicionados em cada frasco, 50
88 discos de meio de cultura MMDA, com 6 mm de diâmetro, contendo micélio do patógeno. No
89 controle, foram adicionados 50 discos de meio de cultura MMDA, com 6 mm de diâmetro,
90 estéreis. Os frascos foram incubados por sete dias a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro e o crescimento
91 avaliado. Para confirmar, parte do micélio foi adicionado numa placa contendo meio MMDA
92 e incubado a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro contínuo por 7 dias. Em seguida, a morfologia da colônia foi
93 comparada para confirmar a presença do isolado.

94 O isolado de *Phytopythium* sp. foi crescido numa placa de Petri contendo meio de
95 cultura Mandioca Mansa Dextrose Ágar (MMDA) (Dados não publicados) a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e escuro
96 contínuo por sete dias.. Em seguida, a suspensão de esporos utilizada para imersão das raízes
97 foi preparada a partir da adição de 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri
98 contendo o patógeno, e os zoósporos foram liberados com auxílio de uma lâmina de bisturi. A

99 concentração dos zoósporos foi determinada pela contagem em microscópio ótico utilizando
100 um hemocítômetro (câmara de Neubauer) e posteriormente ajustada para 16×10^5
101 zoósporos/mL. Para o controle da inoculação (testemunha), foi utilizada somente água
102 destilada esterilizada.

103 O teste de patogenicidade do isolado foi realizado utilizando a metodologia de
104 inoculação de raízes inteiras propostas por Onyeka et al. (2005) e adaptadas por Oliveira et al.
105 (2013), em que as raízes foram lavadas e submetidas à desinfestação com hipoclorito de sódio
106 (0,5%), em seguida perfuradas em pontos equidistantes (6 mm de diâmetro) e adicionados
107 discos de meio de cultura MMDA (6 mm de diâmetro) contendo micélio do patógeno
108 *Phytophthium* sp. No controle, foram adicionados discos de meio de cultura MMDA (6 mm
109 de diâmetro) estéreis. Os locais de inoculação foram cobertos com parafilme para evitar
110 contaminação externa e garantir a umidade no local de inoculação. As raízes foram mantidas
111 em câmara úmida e temperatura 25 ± 2 °C por sete dias. No momento da avaliação, as raízes
112 foram cortadas transversalmente e longitudinalmente nas regiões onde foi realizada a infecção
113 e fotografadas.

114 Para a inoculação das plântulas com raízes adventícias, foram utilizadas duas
115 metodologias: a infestação do substrato e a imersão de raízes. As plântulas com raízes
116 adventícias foram plantadas em substrato inerte areia branca e vermiculita. O substrato areia
117 lavada e vermiculita foram misturados na proporção de 1:1 volume/volume e em seguida
118 ensacados e levados para o laboratório para esterilização. Os sacos contendo a mistura foram
119 autoclavados por 1h a 121°C duas vezes com intervalo mínimo de 24 horas. Para o cultivo
120 das plântulas, foi utilizada solução nutritiva proposta por Hoagland & Arnon (1950).

121 A infestação do substrato se deu pela mistura de 25g de areia e fubá de milho infestado
122 ao substrato areia e vermiculita esterilizado e irrigados com solução nutritiva. No tratamento
123 controle, foram adicionados 25 g de areia e fubá de milho estéril. A imersão de raízes, as

124 raízes adventícias das plântulas foram imersas em suspensão (16×10^5 zoósporos/mL) do
125 patógeno por 1 hora e depois plantadas em vasos de 0,8 L contendo 750 g de substrato (areia e
126 vermiculita) estéril e irrigados com 200 mL de solução nutritiva diluída (1/4 da força). As
127 plântulas controle foram imersos em água destilada autoclavada. Os procedimentos descritos
128 acima foram realizados tanto nas plântulas com raízes adventícias sem ferimento quanto nos
129 plântulas que tiveram suas raízes adventícias feridas com lâmina de bisturi estéril para
130 facilitar a ação do patógeno.

131 Para evitar a contaminação, os vasos foram cobertos com discos de EVA. Os vasos
132 foram pesados diariamente e seu peso completado com água destilada autoclavada para
133 equilibrar a concentração dos nutrientes em solução. As plantas com raízes adventícias foram
134 levadas para uma estrutura de ferro coberta com plástico transparente telado e mantidas lá até
135 o fim do experimento. As avaliações foram realizadas diariamente procurando observar sinais
136 característicos da doença. Foram coletadas ao final do experimento amostras do substrato para
137 re-isolamento do patógeno.

138 O inóculo para inoculação das plantas com raízes tuberizadas pelo método de
139 infestação do solo foi produzido em substrato areia e fubá de milho conforme descrito
140 anteriormente e com umidade de 30%. A mistura foi acondicionada em sacos plásticos
141 transparentes (Figura 1 A). Para promover o crescimento uniforme, os sacos contendo o
142 substrato areia-fubá infestado foram homogeneizados a cada dois dias e incubados a 28 ± 2 °C,
143 por 10 dias.

144 A metodologia utilizada para a inoculação foi a infestação do solo com uma mistura de
145 areia e fubá de milho (proporção 3:1) infestada com discos contendo micélio do patógeno.
146 Em cada vaso, foram distribuídos 100g da mistura areia e fubá infestado (Figura 1 B-D).
147 Como controle, foram distribuídos 100g da mistura areia e fubá estéril. As avaliações foram
148 realizadas com 7, 15 e 34 dias após a inoculação. No momento da avaliação, as raízes foram

149 cortadas transversalmente nas regiões onde foi realizada a infecção e fotografadas. Foram
150 coletadas amostras de raízes, caule e folhas e estas foram armazenadas a -80°C para estudos
151 posteriores de biologia molecular. Também foram coletadas amostras de solo e raízes para o
152 re-isolamento do patógeno

153

154

Resultados e discussão

155 O isolado de *Phytophthium* sp. apresentou-se como patogênico quando inoculado pelo
156 método de inoculação de raízes inteiras propostas por Onyeka et al. (2005) e adaptadas por
157 Oliveira et al. (2013), apresentando os sinais característicos da doença (Dados não
158 mostrados), mostrando-se que este estava adequado para realizar as inoculações.

159 Quanto à umidade necessária para o crescimento do *Phytophthium* sp. no substrato
160 areia e fubá das três umidades testadas a que apresentou melhor resultado foi com 30% de
161 umidade já que 7 dias após a inoculação apenas este apresentava crescimento do patógenos. O
162 re-isolamento do patógeno confirmou este resultado já que se observou colônias com
163 características do isolado CT084 . No controle não foram observadas formações de colônias,
164 comprovando que o meio estava estéril (dados não mostrados).

165 A inoculação a partir de plântulas com raízes adventícias seria uma alternativa rápida e
166 prática (Figura 2 A), no entanto não foram observados sinais característicos da doença nas
167 plântulas inoculadas. O desenvolvimento das mudas no vaso contendo substrato irrigado com
168 a solução nutritiva mostrou-se favorável até quinze dias após o início do experimento. Nessas
169 condições, as plantas controle e as inoculadas se mostravam saudáveis e com crescimento
170 radicular bem desenvolvido (Figura 2 B). Uma avaliação mais prolongada não pode ser
171 realizada aos vinte dias após a inoculação, pois as plantas começaram a apresentar sinais de
172 estresse de origem biótica e abiótica influenciados provavelmente pela concentração da
173 solução nutritiva e/ou limitações de crescimento influenciadas pelo tamanho do vaso (Figura

174 5 C). Dois meses após a inoculação, não se observou recuperação e nem crescimento nas
175 plantas controle e inoculadas. Também não se observou sintomas de podridão nas raízes
176 avaliadas (Figura 5 D) nos dois métodos testados.

177 Segundo Almeida et al. (2014), vasos pequenos podem limitar o desenvolvimento da
178 planta pelo volume de substrato neles contido. No entanto, essa limitação está diretamente
179 relacionada às espécies em desenvolvimento e ao tempo de avaliação. Alguns processos
180 fisiológicos podem ser afetados pelo tamanho do vaso, como por exemplo, absorção de água e
181 nutrientes, redução de assimilação líquida de carbono e, deste modo, o crescimento da parte
182 aérea (Andrade et al., 2012). A redução do crescimento da parte aérea, em função da restrição
183 ao crescimento radicular, decorre, principalmente, da aclimação da maquinaria
184 fotossintética, por um processo denominado retroinibição da fotossíntese (Macana, 2012).

185 A ineficiência do método de inoculação por imersão das raízes e infestação do solo
186 pode estar relacionada com a capacidade de regeneração do sistema radicular da mandioca. A
187 inoculação não foi suficiente para impedir o desenvolvimento de novas raízes pelo caule e,
188 conseqüentemente, a recuperação da planta inoculada. Outros fatores a serem analisados são a
189 concentração do inóculo e o tempo para colonização do solo e posterior penetração nas raízes.
190 Além disso, vale ressaltar que as espécies de fitopatógenos associadas à podridão radicular
191 das raízes em mandioca afetam principalmente as raízes tuberosas (Msikita et al., 2005;
192 Bandyopadhyay et al., 2006).

193 A metodologia da infestação do solo de vasos com plantas de mandioca com raízes
194 tuberosas possibilitou o aparecimento dos sintomas típicos de podridão radicular nas raízes
195 de armazenamento e que sofreram algum tipo de ferimento durante a inoculação. Não se
196 observaram lesões nas raízes das plantas controle, apesar de se observar ferimentos já
197 cicatrizados nestas (Figura 3 A-M).

198 Não foram observadas lesões nas raízes adventícias das plantas inoculadas, reforçando
199 assim o relato de que os patógenos associados à podridão radicular das raízes em mandioca
200 afetam principalmente as raízes de armazenamento (Msikita et al., 2005; Bandyopadhyay et
201 al., 2006). Nas raízes que não sofreram ferimentos, não se observou sinais característicos da
202 doença. É importante, no momento da inoculação, realizar aberturas nas raízes para facilitar a
203 infecção.

204 O método de infestação do solo de plantas com raízes tuberizadas foi suficiente e
205 possibilitou o desenvolvimento inicial da doença. Este método se mostrou promissor para
206 inocular raízes de mandioca e assim auxiliar nos estudos moleculares que necessitem de
207 material obtido em casa de vegetação. A metodologia que utiliza a mistura de fubá de milho
208 com areia para cultivo do patógeno, e em seguida, esta mistura infectada é adicionada ao solo
209 onde as plântulas serão transplantadas é bastante simples e tem sido utilizado com sucesso em
210 outros patossistemas (Klingelfuss et al., 2007; Silva et al., 2011).

211 Com as observações realizadas aos 34 dias após a inoculação, não foi possível
212 observar avanço da doença, pois comparando com as amostras de 15 dias, as lesões são bem
213 similares (Figura 4 A- F). Como foi possível re-isolar tanto das raízes quanto do solo o
214 patógeno (dados não mostrados), exclui-se a possibilidade da morte deste, porém as condições
215 climáticas podem não ter favorecido o seu desenvolvimento. É necessário realizar novos
216 estudos que busquem avaliar se a planta respondeu e conseguiu controlar o patógeno ou o
217 patógeno não estava em condições favoráveis para se desenvolver. Amostras foram coletadas
218 e estudos moleculares serão realizados posteriormente para maiores esclarecimentos.

219 **Conclusão**

220 Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o método de propagação rápida da
221 mandioca em casa de vegetação foi eficiente para a produção de mudas de mandioca e pode
222 auxiliar na produção de material vegetal para estudar a interação da mandioca com o

223 *Phytophytium* sp.. O protocolo que permitiu a reprodução da podridão radicular da mandioca
224 foi o que utilizou plantas de mandioca com raízes tuberizadas e solo infestado com o patógeno
225 *Phytophytium* sp..

226 **Agradecimentos**

227 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa; à
228 Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas do Pará (FAPESPA) e ao Conselho
229 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da
230 pesquisa; e à Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), à Embrapa Amazônia
231 Oriental e à Universidade Federal do Pará (UFPA) pelo apoio a pesquisa.

232

233 **Referências**

234 ALBUQUERQUE, A. S., & BRANDÃO, I. C. D. **Acessos BRS Mari e BRS Poti e medidas**
235 **de controle da podridão-mole da mandioca.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008.
236 24p. (Embrapa Amazônia Oriental, Documento, 326). Disponível em:
237 http://www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online. Acessado em: 11 out. 2015.

238

239 ALMEIDA, M. O. et al. **Influência do tamanho do vaso e época de avaliação sobre o**
240 **crescimento do picão preto em competição com milho e soja.** *Biosci. J.*, v. 30, n. 5, p.
241 1428-1437, 2014.

242

243 ANDRADE, F. R. et al. Formação de mudas de mamona em diferentes recipientes. **R. Bras.**
244 **Ci. Agr.**, v. 7, n. 2, p. 274-279, 2012.

245

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

248

249 BOARI, A. J., QUADROS, A. F. F., CUNHA, E. M., FERNANDES, A. F., & BARRETO, R.
250 W. First report of *Phytophthium* sp. causing storage root rot and foliage blight of cassava in
251 Brazil. *Plant Disease*, <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1449-PDN>, 2018

252

253 COCK, J.H; WHOLEY, D.; LOZANO J.C.; TORO, J.C. **Sistema rápido de propagación de**
254 **yuca.** Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1976. 12 p. (Serie ES: Centro
255 Internacional de Agricultura Tropical. Nº. 20). Disponível em [http://ciat-](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/CIAT/books/historical/147.pdf)
256 [library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/CIAT/books/historical/147.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/CIAT/books/historical/147.pdf). Acessado em: 15 out. 2015.

257

258 FAO. **Why cassava?** Disponível em http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcds/index_en.html
259 Acesso em 16 out 2017.

260

261 FUKUDA, W., & de CARVALHO, H. W. L. **Propagação rápida de mandioca no nordeste**
262 **brasileiro.** Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007. 6 p. (Embrapa Tabuleiros
263 Costeiros. Circular Técnica, 45). Disponível em
264 <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/372216>. Acessado em: 15 out. 2015.

265

266 HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil.**
267 California Agricultural Experiment Station, Circular, 347. 1950.

268

269 IBGE (2017). **Levantamento sistemático da produção agrícola.** Rio de Janeiro v.30 n.3
270 p.1-83 Março. 2017. Disponível em
271 [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201703.pdf)
272 [mensal\]/Fasciculo/lspa_201703.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201703.pdf) Acessado em 01 maio 2017.

273

274 KLINGELFUSS, LUIZA H., JOSÉ T. YORINORI, AND DEONISIO DESTRO. "Métodos
275 de inoculação para quantificação de resistência em soja à *Fusarium solani* f. sp. *glycines*,
276 em casa-de-vegetação." *Fitopatologia Brasileira* 32.1 (2007): 50-55.

277

278 MACANA, Y. A. M. Efeitos da disponibilidade de água e de luz no metabolismo
279 fotossintético em *Coffea arabica*. 2012. 46 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)
280 – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

281

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

285

286 NOTARO, K. A.; MEDEIROS, E. V.; SILVA, C. A. D.; BARROS, J. A. Prospecção de
287 fitopatógenos associados a podridão radicular da mandioca em Pernambuco,
288 Brasil. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 1832-1839, 2013.

289

290 OLIVEIRA, S. A. S. DE; HOHENFELD, C. S.; SANTOS, V. DA S.; HADDAD, F.;
291 OLIVEIRA, E. J. **Resistance to *fusarium* dry root rot disease in cassava accessions.**
292 Pesquisa agropecuaria brasileira (PAB), Brasília, v.48, n.10, p.1414-1417. 2013.

293

294 OLIVEIRA, M. C. F.; SOUZA JÚNIOR, J. A.; CRUZ, P. P. N.; SOUZA FILHO, J. D.
295 Climatologia urbana da cidade de Belém-Pará, através das precipitações e temperaturas do ar,
296 das normais climatológicas de 1941 a 1970, 1971 a 2000 e da normal provisória de 2001 a
297 2015. *Revista Brasileira de Geografia Física* v.09, n. 03, p. 803-819, 2016.

298

299 ONYEKA, T. J., DIXON, A. G. O., AND EKPO, E. J. A. **Assessment of laboratory**
300 **methods for evaluating cassava genotypes for resistance to root rot disease.**
301 *Mycopathologia*, v.159, p.461-467. 2005.

302

303 PIETROWSKI, V., RHEINHEIMER, A. R., MIRANDA, A. M., DA SILVA WENGRAT, A.
304 P. G., & BARILLI, D. R. (2014). Ocorrência de *Aleurothrixus aepim* (Goeldi, 1886) em
305 mandioca na região Oeste do Paraná. *Arquivos do Instituto Biológico*, 81(2), 186-188.

306

307 POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D.R.; SILVA, H. M.; ALBUQUERQUE, F. C.
308 Patógenos associados à podridão mole de raízes de mandioca no estado do Pará.
309 **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p.111-112, 1997.

310

311 POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R.;
312 CARDOSO, S. S. Incidência de *Fusarium solani* em mandioca no Estado do Pará.
313 **Fitopatologia Brasileira**, v. 5, p. 544. 2002.

314

315 SILVA, M. N.; CEREDA, M. P.; FIORINI, R.A. Multiplicação rápida de mandioca. In:
316 CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. São
317 Paulo: Fundação Cargill, 2002, p 187 a 197.

318

319 SILVA, A. dos S. et al. **Seleção de metodologias para inoculação da fusariose do**
320 **maracujazeiro causada por *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae***. Cruz das Almas:
321 Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 20p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 51).

322

- 323 VENTURINI, M. T., DA SILVA SANTOS, V., & DE OLIVEIRA, E. J. (2015).
324 Procedimentos para avaliar a tolerância de genótipos de mandioca à deterioração fisiológica
325 pós-colheita. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50(7), 562-570.
326
- 327 VILAS BOAS, S.A.; HOHENFELD, C.S.; OLIVEIRA, S.A.S.; SANTOS, V.S.; OLIVEIRA,
328 E.J. **Sources of resistance to cassava root rot caused by *Fusarium* spp.: a genotypic**
329 **approach.** *Euphytica*, 209: 237-251. 2016.
330
- 331 VIEIRA, E.A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G. SILVA, M. S. Caracterização
332 molecular de acessos de mandioca biofortificados com potencial de uso no melhoramento
333 genético. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 457-463, 2011.



Figura 1. Etapas de preparo do inóculo e inoculação das plantas com raízes tuberizadas. **(A)** Saco onde foram produzidos o inóculo para a infestação do solo infestado contendo discos do micélio do patógeno incubado a 25°C por 10 dias. **(B)** para a inoculação foram pesados 100g do inóculo e adicionados próximos às raízes tuberizadas **(C)** as plantas controle receberam 100g da mistura de areia e fubá de milho com discos de meio MDA estéreis incubado a 25°C por 10 dias. **(D)** Vasos com o substrato incorporado ao solo e umedecidos.

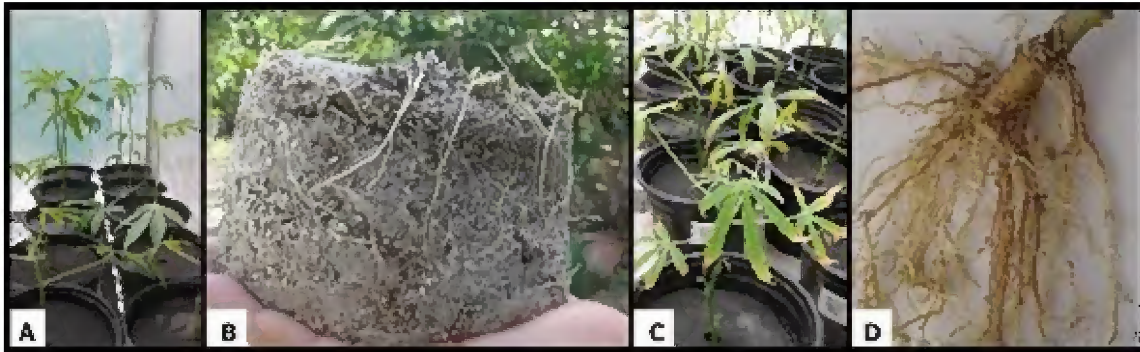


Figura 2. Inoculação das plântulas com raízes adventícias. Plântulas no substrato areia e vermiculita irrigados com solução nutritiva e 3 dias após o plantio (A). Raízes 15 dias após o plantio (B). Plantas após 20 dias de inoculação (C). Raízes das plantas inoculadas após 60 dias de inoculação (D).

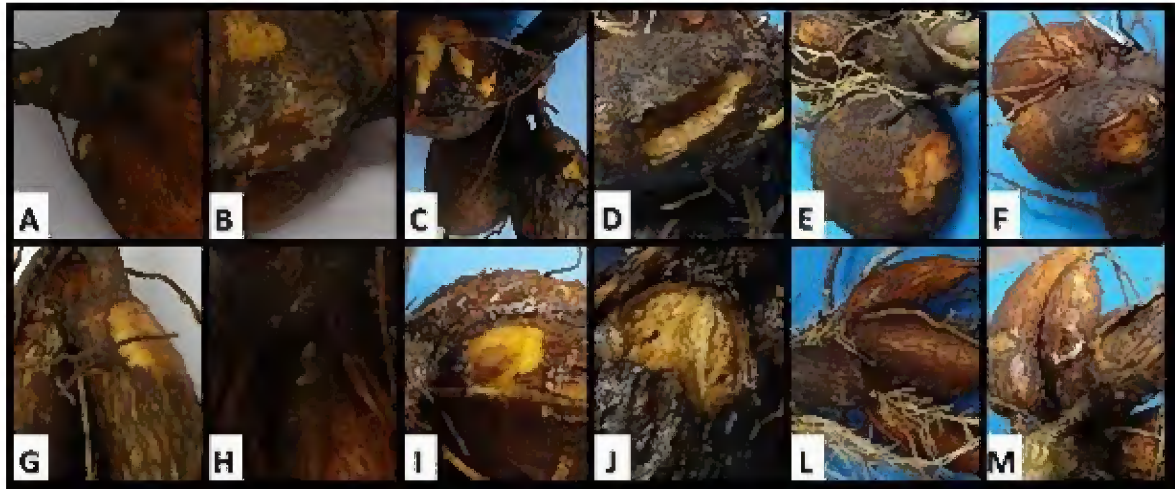


Figura 3: Lesões observadas nas raízes dos acessos de mandioca (*Manihot esculenta*) BRS Poti (A - F) e CPATU 530 (G-M). Amostras coletadas do acesso BRS Poti Controle aos 7 (A), 15 (C) e 34 dias (E) após a inoculação. Amostras coletadas do acesso BRS Poti inoculadas com *Phytophytium* sp. 7 (B), 15 (D) e 34 dias (F) após a inoculação. Amostras coletadas do acesso CPATU 530 controle com 7 (G), 15 (I) e 34 dias (L) dias após a inoculação. Amostras coletadas do acesso CPATU 530 inoculadas com *Phytophytium* sp com 7 (H), 15 (J) e 34 dias (M) após a inoculação.

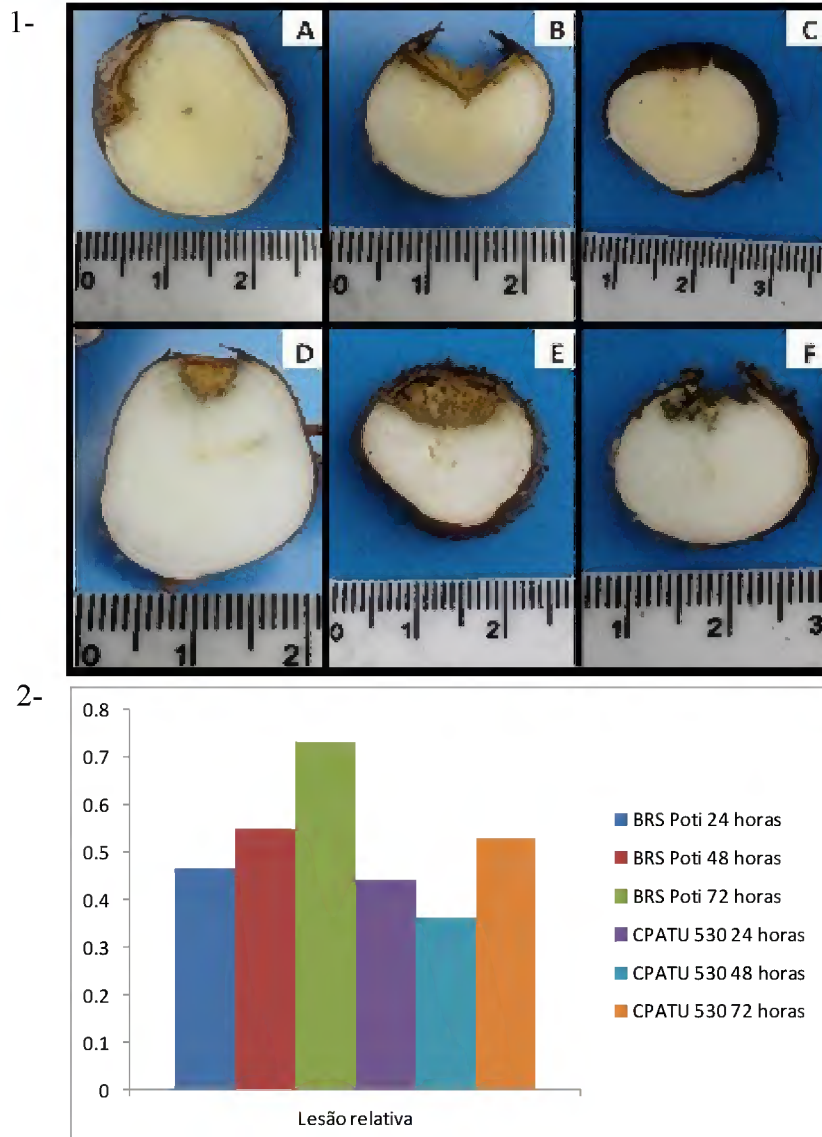


Figura 4. Área Lesionada nos cortes transversais nas raízes infectadas 1- Fotografia dos acessos BRS Poti (A - C) e CPATU 530 (D-F). A e D amostras coletadas com 7 dias. B e E amostras coletadas com 15 dias. C e F amostras coletadas com 34 dias. 2- Lesão relativa referente aos cortes transversais realizados nas raízes infectadas em relação ao controle.

Capítulo IV

PADRÕES DIFERENCIAIS DE EXPRESSÃO GÊNICA EM RAÍZES DE MANDIOCA INOCULADAS COM *Phytophthium* sp.

4. PADRÕES DIFERENCIAIS DE EXPRESSÃO GÊNICA EM RAÍZES DE MANDIOCA INOCULADAS COM *Phytophythium* sp.

RESUMO

A mandioca é cultivada em todo o mundo e um dos fatores que limitam a expansão da mandiocultura é a podridão radicular causada por *Phytophythium* sp. Portanto, este trabalho visa identificar e analisar a expressão de genes que codificam proteínas efetoras potencialmente envolvidas na resposta de defesa da mandioca. Raízes destacadas do acesso Caxuianá foram inoculadas com *Phytophythium* sp. e como controle foram utilizadas raízes sem o patógeno nas mesmas condições. As coletas do material foram realizadas com 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hai). Para a análise dos padrões de expressão foi extraído o RNA e realizados ensaios de RT-PCR semiquantitativo. Foram analisados 9 genes, onde sete genes apresentaram expressão diferenciada nas raízes de mandioca inoculadas com o patógeno. A análise da expressão também confirmou a ausência da deterioração pós colheita (PPD) no material, confirmando que o método utilizado foi eficiente para estudar a interação. Dentre os genes analisados destacam-se o gene que codifica uma cistatina de mandioca (*MeCPI*), que além de mostrar-se envolvidos na resposta negativa a PPD também mostrou-se favorável na resposta ao patógeno e os genes que codificam as enzimas Chalcona sintase (*MeCHS*) e Fenilalanina amônia-liase (*PAL*) pois estas apresentam expressam diferencial no tecido inoculado com 48 e 72 hai comparado com o controle. A identificação de genes de genes de resposta da mandioca ao agente causador da podridão radicular - *Phytophythium* sp. pode contribuir para no futuro se obter acessos resistentes.

ABSTRACT

The cassava is cultivate in almost all in the world and root rot caused by *Phytophythium* sp is a one factor that limite the expansion of mandiocultura. Therefore, the objective of this work is identify and analyze the expression of genes that coding effectors proteins potentially involved in the defense response of cassava to pathogen attack. Roots of the Caxuianá access were inoculated with *Phytophythium* sp. and as control were used roots without the pathogen in the same conditions. The collect of material were realized with 24, 48 e 72 hours after inoculation (HAI). For the analysis of expression patterns, RNA was extracted and p semiquantitative RT-PCR assays were realized. Nine genes were analyzed, where seven genes presented differentiated expression in cassava roots inoculated with the pathogen. Expression analysis also confirmed the absence of post-harvest deterioration (PPD) in the material,

confirming that the method used was efficient to study the interaction. Among the analyzed genes, the gene coding for a cassava cystatin (MeCPI), which in addition to being involved in the negative response to PPD, also showed to be favorable in the response to the pathogen and the genes coding for the enzymes Chalcone synthase (MeCHS) and Phenylalanine ammonia lyase (MePAL), since they present differential expression in the tissue inoculated with 48 and 72 hai compared to the control. The identification of genes in response to the cassava root rot agent - *Phytophthium* sp may contribute to the future of resistant accessions.

4.1 Introdução

As plantas estão expostas a vários e complexos tipos de interações no seu ambiente natural. No entanto, algumas condições extremas como seca, calor, salinidade, frio ou o ataque de patógenos e pragas tem impactos sobre o crescimento e o rendimento das plantas. Estas condições extremas, denominadas estresses bióticos e abióticos, são devastadoras quando ocorrem em culturas de importância econômica. As plantas, de modo geral, respondem a esses estresses de forma complexa, envolvendo adaptações fisiológicas, moleculares e celulares (FRAIRE-VELÁZQUEZ et al., 2011; REJEB et al., 2014; SUZUKI et al., 2014; GASSMANN et al., 2016).

A convivência das plantas com microrganismos resultou num complexo sistema de interação, onde mecanismos diferenciados de defesa que, quando são acionados traduzem essa percepção em uma resposta apropriada que vem se desenvolvendo ao longo do processo evolutivo. Os microrganismos patogênicos possuem a habilidade de reconhecer sinais da planta para iniciarem a infecção. Por outro lado, as plantas apresentam um complexo sistema de defesa para impedir a invasão dos patógenos e, em consequência, o desenvolvimento da doença. Esta interação planta- patógeno resulta em uma constante pressão de seleção entre os organismos envolvidos (DALIO, 2013; DALIO et al., 2014; GASSMANN et al., 2016).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um dos mais dinâmicos produtos da agricultura mundial, sendo cultivada em mais de cem países (ANDRE e SANTOS, 2012). Apesar de sua rusticidade vários fatores relacionados a estresse biótico e abiótico limitam a expansão da mandiocultura (OLIVEIRA et al., 2013; VENTURINI et al., 2015; VILAS-BOAS et al., 2016). Dentre os fatores bióticos limitantes para a cultura da mandioca, a podridão radicular é uma das doenças mais danosas por provocar queda progressiva na produtividade, inviabilizando ciclos subsequentes da cultura (NOTARO, 2013). Os patógenos

causadores da podridão radicular são habitantes do solo e atacam principalmente as raízes tuberosas, o principal produto para comercialização (VILAS-BOAS et al., 2016).

As formas mais indicadas de combate à podridão das raízes da mandioca são a rotação de culturas, o manejo físico do solo, o uso de microrganismos antagônicos, o plantio em áreas bem drenadas, a utilização de manivas provenientes de áreas sem ocorrência da doença e destruição do material vegetal originário de áreas infestadas (VIEIRA, 2011). Porém, a forma mais econômica e confiável para manejar as podridões radiculares da mandioca se baseia no plantio de variedades resistentes (VILAS-BOAS et al., 2016).

Uma ferramenta que pode acelerar o desenvolvimento de novas variedades é a prospecção de genes, que consiste na identificação e o isolamento de genes que confira características de interesse como, resistência a estresses bióticos e abióticos. Diversos genes relacionados ao estresse abiótico foram caracterizados em mandioca (LEE et al., 1999; REILLY et al., 2001; SHIN et al., 2005; de SOUZA et al., 2006; 2009; COSTA et al., 2011; REIS et al., 2012; SANTA BRÍGIDA et al., 2014), no entanto não existem estudos envolvendo a identificação de genes relacionados a interação Mandioca- *Phytophthium* sp.

A busca na literatura resultou em nove genes candidatos sendo estes, Superóxido dismutase tipo cobre e zinco (*MeCu/ZnSOD*), Proteínas abundantes na embriogênese tardia tipo 3 (*MeLEA-3*), Proteína de tumor controlada tradicionalmente (*MeTCTP*), Dedo de zinco –RING-H2 (*MeRZF*), Proteína alergênica Pt2L4 (*Mec1*), Ziper Básico de Leucina (*MebZIP*), Fitocistatinas (*MeCPI*), Chalcona sintase (*MeCHS*) e Fenilalanina amônio liase (*MePAL*). Portanto, este trabalho visa analisar a expressão de genes que codificam proteínas efetoras potencialmente envolvidas na resposta de *M. esculenta* ao patógeno *Phytophthium* sp. A identificação de genes de resposta da mandioca ao agente causador da podridão radicular pode contribuir para a obtenção de acessos de mandioca resistentes a este patógeno.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material vegetal e inoculação de raízes inteiras de mandioca com *Phytophthium* sp.

As raízes foram obtidas no Banco Ativo de Germoplasma da mandioca da Embrapa Amazônia Oriental (Belém-PA) a partir de plantas do acesso Caxuiã com 12 meses de idade. O acesso Caxuiã foi coletado no município de Caxuiã – Pará em área de produtor de mandioca e é susceptível à podridão radicular em condições de campo. O patógeno *Phytophthium* sp. foi obtido da Coleção do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa

Amazônia Oriental. O isolado foi repicado em placas de Petri contendo 20 mL de meio Mandioca-Dextrose-Agar (MDA), as placas foram mantidas a temperatura constante de 25 ± 2 °C em completa ausência de luminosidade durante doze dias (Dados não publicados).

A inoculação do patógeno nas raízes foi realizada seguindo a metodologia de inoculação de raízes inteiras propostas por Oliveira et al. (2013). As raízes foram lavadas com água destilada, sanitizadas com hipoclorito de sódio (0,5%) e em seguida perfuradas em três pontos equidistantes (6 mm de diâmetro). Discos de meio de cultura MDA (6 mm de diâmetro) contendo micélio do patógeno *Phytophthium sp* foram colocados nos pontos de perfuração. Para o controle, foram adicionados discos de meio de cultura MDA (6 mm de diâmetro) estéreis. Os locais de inoculação foram cobertos com parafilme para evitar contaminação externa e garantir a umidade no local de inoculação.

As raízes foram mantidas em câmara úmida e temperatura constante de 25 ± 2 °C até a coleta. As raízes foram retiradas da câmara após 12, 24 e 48 horas com base no teste de patogenicidade realizado (Dados não mostrados). No momento da avaliação, as raízes foram cortadas transversalmente nas regiões onde foi realizada a infecção e fotografadas. Em seguida o córtex foi separado e armazenado no ultrafreezer (-80°) para análises subsequentes.

4.2.2 Obtenção das sequências dos genes de interesse nos Bancos de dados e desenho dos iniciadores.

A seleção de genes candidatos para as análises de expressão gênica foi realizada em função de informações prévias da literatura que possam estar potencialmente associados com a resistência de plantas a patógenos (Tabela 1). As sequências para os genes de mandioca foram obtidas por meio das ferramentas de busca disponível no *Phytozome* (<http://www.phytozome.net/cassava>). A busca foi realizada utilizando palavras chaves e/ou às sequências obtidas na literatura. As sequências obtidas foram avaliadas quanto a presença dos domínios conservados através dos programas InterPro Scan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>) e CDD (*Conserved Domains Database*; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/docs/cdd_search.html) e quanto à similaridade com proteínas de estrutura resolvida depositadas nos bancos de dados, para tal foi utilizada a ferramenta BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov). O alinhamento das sequências de aminoácidos dos genes foi realizado com o auxílio do programa CLUSTALW utilizando os parâmetros padrões. O peso molecular e o ponto isoelétrico da sequência de aminoácidos deduzida foram previstos pelo ExPASy Proteomics Server (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html) e/ou confirmados com

dados da literatura. A predição da localização no cromossomo dos genes em estudo foi realizada por meio das ferramentas de busca disponível no *Phytozome*.

Os iniciadores específicos utilizados para amplificação dos genes em estudo foram obtidos na literatura e/ou desenhados a partir das sequências obtidas nas buscas utilizando-se o programa computacional *Vector NTI*. Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Genes avaliados na interação *Manihot esculenta* Crantz - *Phytophthium* sp. e sequências dos iniciadores utilizadas para amplificação destes.

Nome do Gene	Nome do Iniciador	Sequência (5' - 3')	Tam* (pb)	Referência
MeTUB	MeTub-F	ATCCTTCTCAAGGGCAGCAAGAT	370	Costa <i>et al.</i> , 2012
	MeTub-R	ACATGGAAAGTACATGGCCTGCTG		
MeCu/ZnSOD	MeSOD -F1	GGCTTCATGGGTTCCACGTCCATG	313	Este estudo
	MeSOD-R1	GCTACCCTGCCACCAGCATTTCAG		
MeLEA3	MeLEA-F	ATGGCTCGCTCTTTCTCAGACG	285	Costa <i>et al.</i> , 2012
	MeLEA-R	TTAATGCTTCTTCAACAGCATAGCCCT		
MeTCTP	MeTCTP-E-F1	TGCATATGTTGCTATATCAGGATTTGCTTACCG	504	Santa-Brígida <i>et al.</i> , 2014
	MeTCTP-E-R1	TACTCGAGGCATTTGACCTCCTTCAGAGCAT		
MeRZF	MeTub-F	TCCTTCTCAAGGGCAGCAAGAT3	370	Reis <i>et al.</i> , 2012
	MeTub-R	ACATGGAAAGTACATGGCCTGCTG		
Mec1	Mec1 ORF-F	ATGGCTACTGCTGAGGTAGTAACAG	534	de Souza <i>et al.</i> , 2006
	Mec 1 ORF-R	TTACTCAGTCTTCTCAGCTTCA		
MebZIP	MebZIP-F2	GAATTGCTTTCAAATAGAGAGTCAGCTAGACG	396	Cardoso, 2008
	BZ14	CGGACATAGGGTTATTTGGAGGCTGAT		
MeCPI	MeCPI-F1	CGCCGCCGTAGGTTCTGCTG	294	Este estudo
	MeCPI-R1	TACCCTTGCACAGGGACAAACGATG		
MeCHS	MeCHS-F1	TACTACTTTTCGGATCACCAATAGTGAGCACA	455	Este estudo
	MeCHS-R1	GAGCACACAACAAGAACACGAGCACC		
MePAL	MePAL-F1	CATTTGACACATAAATTGAAGCATCATCCTG	388	Este estudo
	MePAL-R1:	TAACAAGCTCAGAGAATTGAGCAAACATGAG		

*Tamanho esperado em pares de bases (pb)

4.2.3 Extração do RNA total e reação de RT-PCR semiquantitativa para detecção dos genes de interesse.

A extração de RNA total de raízes inoculadas e do controle foram realizada de acordo com a metodologia descrita por Jones *et al.* (1985), o material utilizado foi o cortex referentes a região entre dois pontos de infecção. As amostras de RNA foram visualizadas em gel de agarose contendo formaldeído, de acordo com Sambrook *et al.* (1989).

Os experimentos de reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foram realizados de acordo com Reis *et al.* (2012). Inicialmente, 10 µg do RNA total de cada amostra serão tratadas com DNase I (Invitrogen- USA) e utilizadas na síntese das moléculas de cDNA utilizando um iniciador dT e a enzima Transcriptase Reversa (Invitrogen- USA). As amostras contendo o RNA total e cDNA foram quantificadas por fluorimetria utilizando-se o flurímetro QUBIT (Invitrogen- USA).

Em seguida, 100 ng de cDNA provenientes de raízes de plantas infectadas e de plantas não infectadas (controle negativo) foram utilizadas como *template* em ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores específicos para as sequências de interesse. A Tubulina foi utilizada como gene constitutivo, para a padronização da concentração de cDNA utilizada para as outras amostras. As condições da PCR foram: um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 94° C, seguido diferentes ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 4 minutos. O número de ciclos da PCR foi estabelecido para os diferentes genes utilizando a amostra controle.

O produto da PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1% (P/V) corado com brometo de etídio (1mg/mL), visualizado na luz ultravioleta e fotografado. O programa ImageJ 1.44p (National Institutes of Saúde, EUA) foi utilizado para avaliar a intensidade dos produtos de RT-PCR. Está intensidade refere-se densitometria óptica de cada banda, contando cada microponto de tonalidade escura na foto. Em seguida, os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância e as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Tukey a nível de 1% de probabilidade.

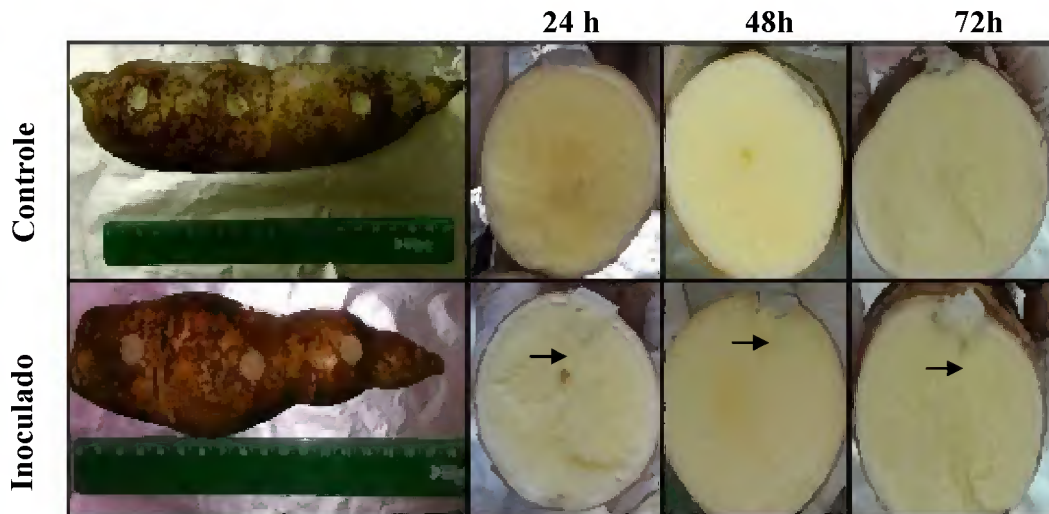
4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Material vegetal e extração do RNA total de raízes de mandioca

Neste trabalho, buscamos identificar transcritos de mandioca expressos em resposta a infecção por *Phytophytium* sp. para elucidar a interação a nível transcricional. O material para o estudo foi obtido a partir de amostras de raízes de mandioca destacadas do acesso Caxuiuanã inoculadas e não inoculadas com *Phytophytium* sp. com 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hai). A podridão radicular foi observada em todos os tempos de avaliação nas raízes inoculadas confirmando a patogenicidade do isolado utilizado neste trabalho. Os sintomas da podridão radicular observados foram lesões na polpa que foram evoluindo com as hai. Não foram observadas lesões nas raízes controle (Figura 1.).

A utilização de raízes de mandioca para inoculação é uma metodologia bastante utilizada, porém os sintomas da deterioração fisiológica pós-colheita (*Post-harvest physiological deterioration* - PPD) podem ser confundidos com os sintomas típicos causados pelos patógenos. Os resultados obtidos nas amostras com 24, 48 e 72 hai com e sem o patógeno confirmam a ausência PPD nas raízes deste estudo, pois não se observa sintomas como pontos escuros nas raízes nos tempos analisados (Figura 1.).

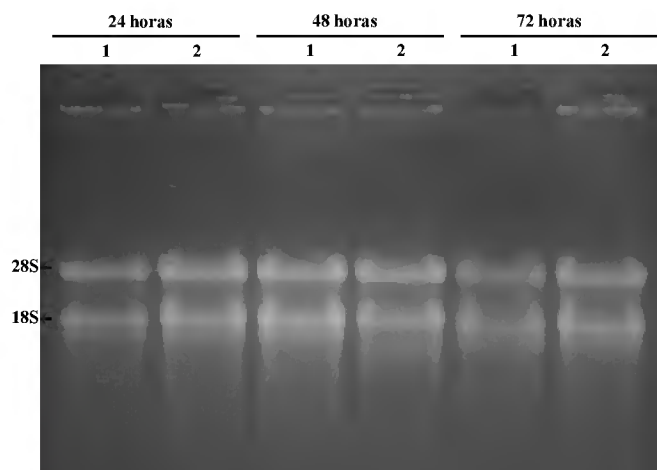
Figura 1. Raízes de Mandioca do acesso Caxuianá inoculadas com *Phytophthium* sp. com 24, 48 e 72 hai comparadas com as raízes controle sem o patógeno. As setas indicam as regiões onde ocorreram as lesões.



Fonte: Este estudo

O RNA extraído das raízes inoculadas e do controle, em todos os tempos de inoculação (24, 48, 72 horas), apresentou um padrão íntegro. A integridade do RNA foi avaliada pela comparação da intensidade das bandas 28S:18S do RNA ribossômico (rRNA), que indicou boa qualidade (Figura 2.).

Figura 2. Amostras de RNA total isoladas a partir de raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), em (1) amostras correspondentes ao Controle (não inoculadas) e em (2) amostras inoculadas com *Phytophthium* sp.. A extração tanto para o controle quanto para o inoculado foi realizada com 24, 48 e 72 hai.



Fonte: Este estudo

4.3.2. Caracterização dos genes a ser investigado.

A busca na literatura resultou em nove genes candidatos, todas as sequências obtidas foram avaliadas quanto à presença dos domínios conservados e à similaridade com proteínas

de estrutura resolvida depositadas nos bancos de dados confirmando assim a família a qual pertence. Além disso, foram preditas informações destes, tais como número de acesso, família, tamanho do gene em pares de base (pb), número de resíduos de aminoácidos (aa), massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (PI), e os resultados estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização molecular dos genes candidatos. Número de acesso, família, tamanho do gene pares de base (pb) Número de resíduos de aminoácidos (aa), massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (PI).

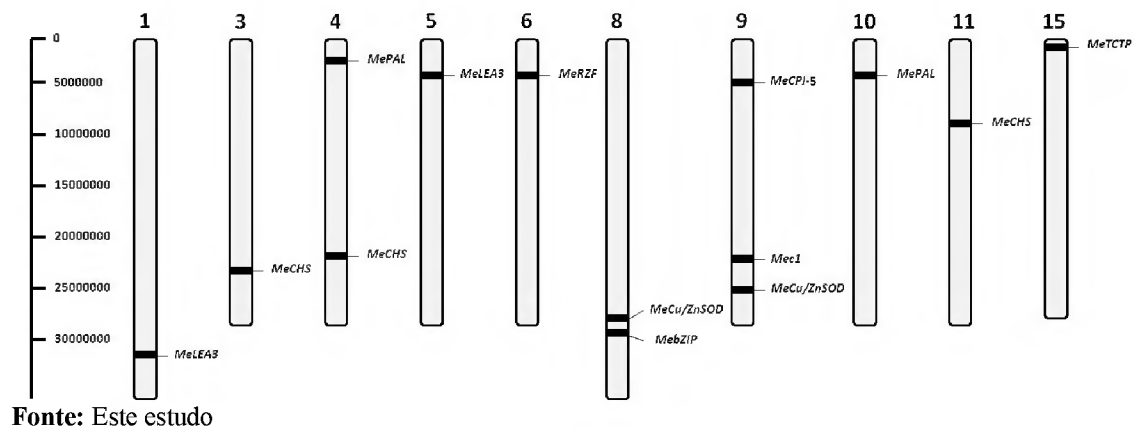
Nome do gene	Número de Acesso	Família	Tam. (pb)	Tam. (aa)	MM (kDa)	PI
<i>MeCu/ZnSOD</i>	Manes.08G125400	Superoxido Dismutase [CU-ZN]	855	152	15.1	5.42
	Manes.09G160400		1008	152	15.3	5.82
<i>MeLEA3</i>	GR421259	Abundantes na Embriogênese Tardia tipo 3 (LEA-3)	664	94	10	9.66
<i>MeTCTP</i>	JX855123	Proteína de tumor controlada traducionalmente (TCTP)	812	168	19	4.53
<i>MeRZF</i>	JN203495	Dedo de zinco- RING-H2	739	174	19.44	9.75
<i>Mec1</i>	AY101376	Proteína alergênica - Pt2L4	970	177	18.8	3.75
<i>MebZIP</i>	Manes.08G134500.1	Ziper básico de leucina	1728	439	47	5.98
<i>MeCPI</i>	DT883603	Fitocistatinas	528	111	12.1	9.52
<i>MeCHS</i>	XM_021753028	Chalcona sintase	1503	389	42.4	6.17
	XM_021753697		1553	395	43.3	6.18
	XM_021771783		1634	391	42.8	6.08
<i>MePAL</i>	AY036011	Fenilalanina amônio liase	2253	710	77.5	6.03
	XM_021755397		2453	715	77.7	6.06
	XM_021755398		2234	588	64.4	5.93

As plantas de mandioca são diploides ($2n = 36$ cromossomos), o sequenciamento de genomas completos possibilitou a análise da localização exata dos genes nos cromossomos. Através de buscas realizadas no *Phytozome* foi possível identificar que os nove genes utilizados neste estudo mostraram-se distribuídos em dez dos dezoito cromossomos da mandioca (Fig. 3). Possibilitando concluir que a maioria dos genes se encontram presentes mais de uma vez no genoma da mandioca. Foi levado em consideração apenas os genes nos quais os iniciadores eram capazes de amplificar, visto que estes genes possuem inúmeras isoformas no genoma. Por exemplo, já foram identificadas duas isoformas de Superóxido Dismutase tipo Cu/Zn em mandioca a primeira foi descrita por Lee et al. (1999) e denominada *mSOD1* e a segunda descrita por Shin et al. (2005) e denominada *mSOD2*.

Diversos estudos demonstram que genes isolados de outras espécies vegetais estão envolvidos tanto no estresse abiótico como no biótico, incluindo a resposta de defesa das plantas contra os patógenos (REJEB et al., 2014; NATH et al., 2017). Os genes *Mec 1*,

MeLEA3, *MeRZF*, e *MeTCTP* descrito por De Souza et al., (2004) estão relacionado à formação de raízes de armazenamento de mandioca e estudos posteriores demonstraram a relação dos três últimos com estresse salino (COSTA et al., 2011; REIS et al., 2012; SANTA BRÍGIDA et al., 2014).

Figura 3. Localização dos genes em estudo nos cromossomos da mandioca.



4.3.3 Reação de RT-PCR semiquantitativa para detecção dos genes de interesse.

Com os padrões de PCR utilizados foi possível observar uma banda única de 370 pb a partir das amostras de cDNA de raiz de mandioca controle e inoculado nos diferentes tempos. As concentrações foram ajustadas e os ensaios repetidos 5 vezes e as análises dos dados não apresentou diferença significativa entre os tratamentos e tempos analisados.

Os ensaios para determinar número de ciclos a serem utilizados para analisar a expressão dos genes foram realizados a partir da amostra controle, na Figura 3 estão os resultados obtidos e o número de ciclos utilizados para cada um dos genes em estudo. Sendo considerada a fase exponencial de amplificação, pois no método de RT-PCR semiquantitativo a análise dos transcritos só é realizada após a etapa de amplificação em termociclador, mediante a realização da eletroforese em gel de agarose. Dos dez genes analisados sete demonstraram que com 31 ciclos ainda estavam na fase exponencial de amplificação e para os outros três foram considerados 28 ciclos, pois estes já apresentavam sinais de saturação com 31 ciclos (Figura 4).

4.3.4 Genes relacionados na deterioração pós colheita e que se apresentam inalterados durante este estudo.

Os resultados obtidos nos ensaios de RT-PCR semiquantitativos demonstram que os genes *MeTCTP* e *Mec1* não apresentaram diferença significativa na expressão nos tempos e condições analisadas (Figura 5.) Este resultado confirma em nível molecular a ausência PPD nas raízes deste estudo. A nível molecular os genes *MeTCTP* e *Mec1* tiveram sua atividade reduzida em raízes de mandioca após a colheita (REILLY et al., 2007) validando a ausência de sintomas da PPD, pois estes se mantiveram estáveis em todos os tempos avaliados, tanto nas raízes infectadas com o *Phytophthium* sp. quanto naquelas sem o patógeno.

Figura 4. Padronização do número de ciclos utilizado para os diferentes genes em estudo. Gel de agarose mostrando amplificação feita a partir de amostras de cDNA de raiz de mandioca usando os iniciadores para os genes descritos na Tabela 1 com diferentes número de ciclos (25, 28, 31, 34 e 37) em triplicata.

Nome do Gene	Gel de agarose com os diferentes ciclos					Nº de ciclos utilizado
	25	28	31	34	37	
<i>MeTUB</i>						28
<i>MeCu/ZnSOD</i>						28
<i>MeLEA3</i>						31
<i>MeTCTP</i>						31
<i>MeRZF</i>						31
<i>Mec1</i>						31
<i>MebZIP</i>						31
<i>MeCPI</i>						28
<i>MePAL</i>						31
<i>MeCHS</i>						31

Fonte: Este estudo

O gene *MeTCTP* codifica a proteína de tumor controlada traducionalmente (TCTP). A proteína TCTP é altamente conservada em eucariotos, e está envolvida em vários processos celulares, como morte celular programada, crescimento celular e proteção contra diversos tipos de estresses (LI et al., 2013; SANTA BRÍGIDA et al., 2014; GUTIÉRREZ-GALEANO et al., 2014; WANG et al., 2015; de CARVALHO et al., 2017). O gene *TCTP* está relacionado à resposta de varias plantas contra patógenos, como na resposta ao patógeno *Pseudomonas syringae* (JONES et al., 2006), *Piper tuberculatum* à *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, causador da fusariose em Pimenteira-do-reino (NASCIMENTO et al., 2009), na resposta de trigo a *Erysiphe graminis*, o agente causal de oídios nas folhas (LI et al., 2010).

Apesar de seu papel ser conhecido, não se tem dados sobre a atuação a nível molecular da proteína TCTP.

Apesar do gene *MeTCTP* não apresentar alteração em ambos os tratamentos, ele é um candidato para ser utilizado em programas de melhoramento que visem o combate a PPD assim como o gene *Mec1* que codifica a proteína Pt2L4, rica em ácido glutâmico e diferencialmente expressa em raízes tuberosas de mandioca. A identificação e caracterização da região promotora deste gene podem viabilizar estudos de plantas transgênicas resistentes a patógenos e direcionar a expressão de genes de interesse para as raízes. Possibilitando no futuro a obtenção de plantas de mandioca resistentes aos estresses bióticos e abióticos (SOUZA *et al.* 2006; 2009).

4.3.5 Genes relacionados na deterioração pos colheita e que apresenta expressão diferencial em raízes destacadas inoculadas.

As cistatinas de plantas, também chamadas de fitocistatinas, são conhecidas por possuir papel importante na resposta da planta a estresses bióticos e abióticos (BENCHABANE *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2015; ZUST E AGRAWA *et al.*, 2017). Nas análises das raízes com e sem patógeno uma fitocistatina de mandioca apresentou um aumento da expressão foi significativamente maior nas plantas inoculadas com *Phytophytium* sp. com 24 e 48 hai quando comparado com as plantas sem o patógeno, não houve diferença significativa com 72 hai (Figura 5.). Fitocistatinas possuem potencial *in vivo* e *in vitro* de controlar o crescimento de patógenos, no entanto não se sabe o papel desta na defesa da planta, mas acredita-se que estas podem inibir proteases do patógeno (BENCHABANE *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2015).

Estudos tem demonstrado o potencial das fitocistatinas na defesa da planta frente aos ataque de patógenos. Plantas de tabaco superexpressando o gene *TcCYS4*, uma fitocistatina do cacão, demonstraram uma redução significativa nas lesões necróticas causadas nas folhas de tabaco inoculadas com o fungo *Moniliophthora perniciosa* (SANTANA *et al.*, 2014), além disso diversas fitocistatinas de plantas expressas em sistema bacteriano foram testadas *in vitro* contra fungos e oomicetos e demonstraram o potencial destas em controlar o crescimento de fitopatógenos (LIMA *et al.*, 2015).

A nível molecular uma cistatina da mandioca foi identificada em raízes após a colheita (REILLY *et al.*, 2007) e a expressão desta quando comparado com o controle foi reduzida. No entanto, neste trabalho a expressão deste mesmo gene aumentou o que valida mais uma vez à

ausência de PPD neste estudo. Sugerindo que este gene possa estar envolvido na resposta a deterioração pós-colheita e também na resposta ao ataque do patógeno.

2.3.6 Genes apresentam expressão diferencial durante este estudo e tem potencial para participar dos mecanismos de defesa.

As proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA- *late embryogenesis abundant*) do grupo 3, são α - hélices anfipáticas e foram definidas como sequestradoras de íons concentrados e proteção da estrutura de proteínas e membranas durante a desidratação (COSTA et al., 2011; LIU et al., 2013). Diversos estudos tem demonstrado o papel das proteínas LEA no estresse abiótico, no entanto são poucos os estudos que relatam o papel deste no estresse biótico. O gene *MeLEA3* foi identificado na mandioca e codifica uma proteína LEA do grupo 3 e teve sua expressão aumentada em folhas de mandioca destacadas tratadas com NaCl (COSTA et al., 2011).

O gene *ZmLEA3*, codifica uma proteína LEA do grupo 3 em milho, e quando este foi expressa em tabaco transgênico aumentou significativamente a reação de hipersensibilidade desencadeada *Pseudomonas syringae* e também aumentou a expressão de PR1a, PR2 e PR4 quando comparado com o tipo selvagem (LIU et al., 2013). No presente estudo, o gene *MeLEA3* demonstrou uma aumento significativo na expressão nas raízes inoculadas com *Phytophthium* em comparação com o controle 48 hai (Figura 5.), no entanto não é possível inferir o seu papel.

Os fatores de transcrição regulam expressão gênica são usualmente definidos como proteínas contendo domínio de ligação, conhecidos como *DNA-Binding domain* que reconhecem sequências específicas de DNA. Os fatores de transcrição podem ser agrupados em diferentes classes ou famílias onde apresentam estruturas relacionadas e estes desempenham papel importante durante a defesa vegetal (MITSUDA e OHME-TAKAGI, 2009; ALVES et al., 2013; FRANCO-ZORRILLA et al., 2014).

Os genes *MebZIP* e *MeRZF* apresentaram sua expressão aumentada 48 hai em comparação as raízes controle, no entanto com 24 e 72 hai a expressão do controle foi significativamente superior ao inoculado (Figura 5.), padrão de expressão esperado para uma proteína reguladora, que geralmente são expressas nas primeiras horas de infecção antes dos seus genes alvos (FRANCO-ZORRILLA et al., 2014).

A predição da estrutura tridimensional da proteína MeRZF revela um motivo RING *zinc finger* na sua região C-terminal e um resíduo de histidina no quinto sítio do domínio,

sugerindo assim que faz parte do subgrupo RING-H2 e o gene *MeRZF* teve sua expressão aumentada em folhas de mandioca destacadas tratadas com NaCl (REIS et al., 2012). Em arroz foi identificado o gene *OsBIRF1*, que codifica uma proteína do subgrupo RING-H2, as plantas de tabaco expressando este gene apresentam resistência contra o vírus do mosaico do tabaco e *Pseudomonas syringae* e níveis de expressão elevados de genes relacionados à defesa, por exemplo as proteínas relacionadas a patogênese - PR-1, PR-2, PR-3 e PR-5 (LIU et al., 2008). O aumento da expressão do gene *MeRZF* nos fornece indícios da participação das proteínas codificadas na resposta da mandioca ao estresse biótico causado por *Phytophytium* sp..

Nas plantas, os zíper de leucina básico (bZIP – *basic leucine zipper*) são reguladores de muitos processos fisiológicos e de desenvolvimento, incluindo morfogênese, formação de sementes e respostas de estresse abiótico e biótico (ALVES et al., 2013). Cardoso (2008) isolou uma sequência de cDNA que codifica para uma proteína do tipo bZIP de mandioca, denominada MebZIP, que apresenta significativa identidade com proteínas bZIP de outras espécies vegetais, entre elas a G/HBF-1 de soja, a BZI-1 de fumo e a CPRF-2 de salsa. A presença dessas regiões indica que o MebZIP é um fator de transcrição relacionado ao CPRF-2 e esta pode desempenhar um papel na expressão do gene da chalcona sintase (CHS), pois esta relação já foi demonstrada para outras bZIPs (YOSHIDA et al., 2008).

Em plantas de *Arabidopsis* sob o ataque de patógenos ocorre o aumento de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*- ROS). Essas ROS promovem a mudança conformacional da proteína reguladora NPR1, relacionada à resposta de defesa em plantas via ácido salicílico, e essa mudança promove a translocação da proteína para o núcleo através de proteínas de poro nuclear, onde a NPR1 interage com membros da família TGA (bZIP) se ligando posteriormente à regiões promotoras de genes relacionados a indução de defesa (PIETERSE et al., 2012). Demonstrando assim que a Proteína MebZIP pode desempenhar papel semelhante na indução de defesa da mandioca em resposta a *Phytophytium* sp.

O Gene *MeCu/ZnSOD* apresentou expressão *up-regulated* 48 e 72 hai as raízes serem inoculadas com *Phytophytium* sp. em comparação com o controle, com 24 hai não se observa diferença (Figura 5.). Plantas sob ataque de patógenos respondem de forma rápida com uma “explosão oxidativa”, que constituem na produção de ROS principalmente ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o acúmulo destes é tóxico para a planta (HU et al., 2009; LÓPEZ- CRUZ et al., 2017).

A superóxido dismutase (SOD) pertence a uma família de enzimas que neutralizam os efeitos de ROS ao catalisar a conversão ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio

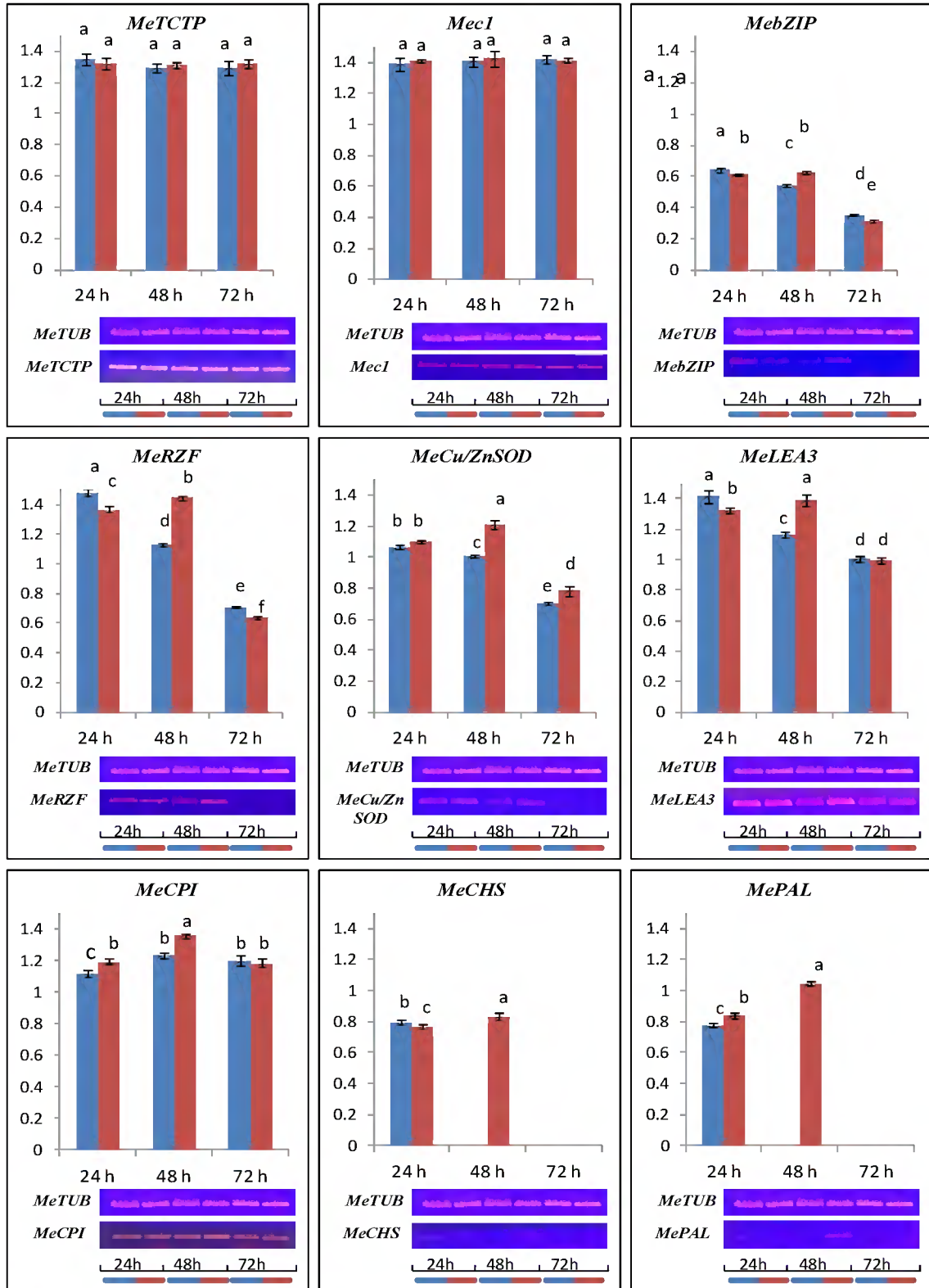
(H₂O₂), esta mudança no equilíbrio de ROS é importante para ativar a respostas de defesa da planta (LÓPEZ- CRUZ et al., 2017). Este aumento na expressão de *MeCu/ZnSOD* após 48 hai pode estar relacionado a necessidade da planta decompor ânions superóxidos em peróxido de hidrogênio durante a explosão oxidativa que ocorre nas primeiras horas de infecção, causando assim uma mudança no equilíbrio de ROS e ativando o sistema de defesa, o que torna este gene um candidato a programas de melhoramento.

Após a planta reconhecer o patógeno inicia-se o processo de defesa, dentre estes processos ocorre a síntese de barreiras físicas, aumento da lignificação da parede celular e a síntese de compostos fenólicos secundários de defesa, dentre os quais se destacam as enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) e Chalcona sintase (CHS), estes desempenham um importante papel na defesa vegetal (DAO et al., 2011; CASS et al., 2015). Neste estudo foi possível observar que os genes *MePAL* e *MeCHS* foram diferencialmente expressos nas plantas inoculadas comparadas com as plantas controle 48 hai, não apresentando expressão com 72 horas, demonstrando que estes genes estão possivelmente envolvidos nos mecanismos de defesa da planta nas primeiras horas de infecção (Figura 5.). A cinética do mRNA de PAL induzido pelo elicitador é bastante relacionada à observada para o mRNA de CHS.

Estes genes apresentaram diferenças na expressão gênica com 24 horas, sendo que para a *MePAL* os níveis de expressão no material inoculado foi significativamente maior que nas plantas controle (Figura 5.). Por outro lado a expressão do gene *MeCHS* foi significativamente maior no controle do que no material inoculado. A produção destas enzimas é controlada durante o crescimento vegetal, mas também é induzida em células vizinhas ao local de infecção por vários estímulos ambientais, como infecção, ferimentos, contaminação por metais pesados, luz e reguladores de crescimento (RAHMAN e PUNJA, 2005; DAO et al., 2011; DEGHAN et al., 2014; CASS et al., 2015) . Esta presença no material sem o patógeno com 24 hai pode ser devido à indução pelo ferimento realizado nas raízes.

Os resultados obtidos com os padrões diferenciais de expressão gênica em raízes de mandioca inoculadas com o agente causador da podridão radicular irão contribuir para o entendimento da interação Mandioca - *Phytophthora* sp. sendo estes os primeiros dados moleculares do mecanismo de resposta da mandioca a estresse biótico.

Figura 5. Quantificação do mRNA dos genes em estudo. O gráfico refere-se a quantificação relativa do gene em estudo comparado com o controle interno (tubulina), as imagens referem-se a géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo. Os resultados referem-se ao controle (sem patógeno) estão representados em azul e os em vermelho claro referem-se ao material inoculado (com patógeno) nos diferentes tempos coletados 24, 48 e 72 hai.



Fonte: Este estudo.

2.4 Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho nos permite concluir que:

- Foi possível realizar a inoculação de tecidos destacados de mandioca e a partir deste extrair RNA de qualidade e quantidade para estudar os genes a nível molecular.
- A ausência da PPD foi confirmada molecularmente e visualmente, confirmando que o método foi eficiente e nos permitiu avaliar a expressão diferencial dos genes em resposta ao patógeno.
- Dos nove genes identificados sete tem potencial para contribuir no melhoramento genético de mandioca para no futuro se obter acessos resistentes.
- Dentre os genes analisados destacam-se o gene que codifica uma cistatina de mandioca (*MeCPI*), que além de mostrar-se envolvidos na resposta negativa a PPD também mostrou-se favorável na resposta ao patógeno e os genes que codificam as enzimas Chalcona sintase (*MeCHS*) e Fenilalanina amônia-liase (*PAL*) pois estas apresentam expressão diferencial no tecido inoculado com 48 e 72 hai comparado com o controle.

Referências

ALVES, M. S.; DADALTO, S. P.; GONÇALVES, A. B.; DE SOUZA, G. B.; BARROS, V. A.; FIETTO, L. G. Plant bZIP transcription factors responsive to pathogens: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 1, n.4, p. 7815-7828, 2013.

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

BENCHABANE, M.; SCHLÜTER, U.; VORSTER, J.; GOULET, M. C.; MICHAUD, D. Plant cystatins. **Biochimie**, v. 92, n. 11, p. 1657-1666, 2010.

CASS, C. L.; PERALDI, A.; DOWD, P. F.; MOTTIAR, Y.; SANTORO, N.; KARLEN, S. D.; MOSKVIN, O. V. Effects of PHENYLALANINE AMMONIA LYASE (PAL) knockdown on cell wall composition, biomass digestibility, and biotic and abiotic stress responses in *Brachypodium*. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 14, p. 4317-4335, 2015.

COSTA, C. N.M.; SANTA-BRÍGIDA, A. B.; BORGES, B. N.; MENEZES-NETO, M. A.; CARVALHO, L. J. C. B.; DE SOUZA C. R. B. Levels of MeLEA3, a cDNA sequence coding for an atypical late embryogenesis abundant protein in cassava, increase under in vitro salt stress treatment. **Plant Molecular Biology Report**, v. 29, p. 997–1005, 2011.

DALIO R. J. D. **Deciphering mechanisms of pathogenicity and resistance induction in the interaction between *Phytophthora* spp. and European beech (*Fagus sylvatica* L.)**. Ph.D. Thesis. Technische Universitaet Muenchen (TUM), Freising, Germany. 2013, 188p.

DALIO, R. J.; FLEISCHMANN, F.; HUMEZ, M. & OSSWALD, W. Phosphite protects *Fagus sylvatica* seedlings towards *Phytophthora plurivora* via local toxicity, priming and facilitation of pathogen recognition. **Plos One**, v. 9, n.1, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087860>, 2014.

DAO, T. T. H.; LINTHORST, H. J. M.; VERPOORTE, R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochemistry Reviews**, v.10, n. 3, p. 397-412, 2011.

DE CARVALHO, M.; ACENCIO, M. L.; LAITZ, A. V. N.; DE ARAÚJO, L. M.; ARCURI, M. D. L. C.; DO NASCIMENTO, L. C.; MAIA, I. G. Impacts of the overexpression of a tomato translationally controlled tumor protein (TCTP) in tobacco revealed by phenotypic and transcriptomic analysis. **Plant Cell Reports**, v. 36, n. 6, p. 887-900, 2017.

DE SOUZA, C. R.; CARVALHO, L. J.; DE ALMEIDA, E. R.; GANDER, E. S. A cDNA sequence coding for a glutamic acid-rich protein is differentially expressed in cassava storage roots. **Protein Peptide Letters**, v.13, p. 653-657, 2006.

DE SOUZA, C. R.; ARAGÃO, F. J.; MOREIRA, E. C.; COSTA, C. N.; NASCIMENTO, S. B.; CARVALHO, L. J. Isolation and characterization of the

promoter sequence of a cassava gene coding for Pt2L4, a glutamic acid-rich protein differentially expressed in storage roots. **Genetics and molecular research** v. 8, p. 334–344, 2009.

DE SOUZA, C. R. B.; CARVALHO, L. J. C. B.; CASCARDO, J. C. M. Comparative gene expression study to identify genes possibly related to storage root formation in cassava. **Protein Peptide Letters** V. 11, p. 577–582, 2004.

DEHGHAN, S.; SADEGHI, M.; PÖPPEL, A.; FISCHER, R.; LAKES-HARLAN, R.; KAVOUSHI, H. R.; RAHNAMAEIAN, M. Differential inductions of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during wounding, salicylic acid treatment, and salinity stress in safflower, *Carthamus tinctorius*. **Bioscience reports**, v.34, n.3, doi 10.1042/BSR20140026, 2014.

FRAIRE-VELÁZQUEZ, S.; RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; SÁNCHEZ-CALDERÓN, L. **Abiotic and Biotic Stress Response Crosstalk**. In Plants-Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives; In Shanker, A., Ed.; InTech Open Access Company: Rijeka, Croatia, 2011; pp. 1–26.

FRANCO-ZORRILLA, J. M.; LÓPEZ-VIDRIERO, I.; CARRASCO, J. L.; GODOY, M.; VERA, P.; SOLANO, R. DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 6, p. 2367-2372, 2014.

GASSMANN, W.; APPEL, H. M.; OLIVER, M. J. The interface between abiotic and biotic stress responses. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 7, p. 2023-2024, 2016.

GUTIÉRREZ-GALEANO, D. F.; TOSCANO-MORALES, R.; CALDERÓN-PÉREZ, B.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B.; RUIZ-MEDRANO R. Structural divergence of plant TCTPs. **Frontiers Plant Science**, v. 5, n. 361, doi: 10.3389/fpls.2014.00361, 2014.

HU, Z.; SHEN, Y.; SHEN, F.; SU, X. Effects of feeding *Clostera anachoreta* on hydrogen peroxide accumulation and activities of peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase in *Populus simonii* x *P. pyramidalis* ‘Opera 8277’ leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 995-1002, 2009.

JONES, J. D. G.; DUNSUMUIR, P.; BEDBROOK, J.; High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. **EMBO Journal**, v. 4, p. 2411-2418, 1985.

JONES, A. M., THOMAS, V., BENNETT, M. H., MANSFIELD, J., & GRANT, M. Modifications to the Arabidopsis defense proteome occur prior to significant transcriptional change in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. **Plant physiology**, v. 142, n. 4, p. 1603-1620, 2006.

LEE, H. S.; KIM, K.Y.; YOU, S. H.; KWON, S. Y.; KWAK, S. S. Molecular characterization and expression of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase

from cultured cells of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), **Molecular Genomic Genetic**, v. 262, p. 807–814, 1999.

LI, G.; LIU, X.; LI, X.; WANG, Z. Cloning of a TCTP gene in wheat and its expression induced by *Erysiphe graminis*. **Bulletin of Botanical Research**, v. 30, n. 4, p. 441-447. 2010.

LI, D.; DENG, Z.; LIU, X.; QIN, B. Molecular cloning, expression profiles and characterization of a novel translationally controlled tumor protein in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 497–504, 2013.

LIMA, A. M.; REIS, S. P.; DE SOUZA, C. R. Phytocystatins and their potential to control plant diseases caused by fungi. **Protein Peptide Letters**, v. 22, n. 2, p. 104-111, 2015.

LIU, H.; ZHANG, H.; YANG, Y.; LI, G.; YANG, Y.; WANG, X. E.; SONG, F. Functional analysis reveals pleiotropic effects of rice RING-H2 finger protein gene OsBIRF1 on regulation of growth and defense responses against abiotic and biotic stresses. **Plant molecular biology**, v. 68, n.1-2, p.17-30, 2008.

LIU, Y.; WANG, L.; XING, X.; SUN, L.; PAN, J.; KONG, X.; LI, D. ZmLEA3, a multifunctional group 3 LEA protein from maize (*Zea mays* L.), is involved in biotic and abiotic stresses. **Plant and cell physiology**, v. 54, n. 6, p. 944-959, 2013.

LÓPEZ-CRUZ, J.; ÓSCAR, C. S.; EMMA, F. C.; PILAR, G. A.; CARMEN, G. B. Absence of Cu–Zn superoxide dismutase BCSOD1 reduces *Botrytis cinerea* virulence in *Arabidopsis* and tomato plants, revealing interplay among reactive oxygen species, callose and signalling pathways. **Molecular plant pathology**, v. 18, n. 1, p. 16-31, 2017.

MITSUDA N.; OHME-TAKAGI M.; Functional Analysis of Transcription Factors in *Arabidopsis*. **Plant e Cell Physiology**, v.50, n.7, p. 1232–1248, 2009.

NATH, M.; BHATT, D.; PRASAD, R.; TUTEJA, N. **Reactive Oxygen Species (ROS) Metabolism and Signaling in Plant-Mycorrhizal Association Under Biotic and Abiotic Stress Conditions**. In: *Mycorrhiza-Eco-Physiology, Secondary Metabolites, Nanomaterials*. Springer, Cham, 2017, p. 223-232.

NASCIMENTO, S. B.; CASCARDO, J. C. M.; MENEZES, I. C.; DUARTE, M. L. R.; HARADA, M. L.; DARNET, S.; DE SOUZA, C. R. B. Identifying Sequences Potentially Related to Resistance Response of *Piper tuberculatum* to *Fusarium solani* f. sp. *piperis* by Suppression Subtractive Hybridization. **Protein Peptide Letters**, v. 12, p.1429-1434, 2009.

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

OLIVEIRA, S. A. S. 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, n. 10, p. 1414-1417, 2013.

ONYEKA, T. J.; DIXON, A. G. O.; AND 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.

PIETERSE, C. M. J.; VAN DER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; LEON-REYES, A.; VAN WEES, S. C. M. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 489–521, 2012.

RAHMAN, M.; PUNJA, Z. K. Biochemistry of ginseng root tissues affected by rusty root symptoms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 1102-1114, 2005.

REILLY, K.; HAN, Y.; TOHME, J.; BEECHING, J. R. Isolation and characterisation of a cassava catalase expressed during post-harvest physiological deterioration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1518, n. 3, p. 317-323, 2001.

REILLY, K.; BERNAL, D.; CORTÉS, D. F.; GÓMEZ-VÁSQUEZ, R.; TOHME, J.; BEECHING, J. R. Towards identifying the full set of genes expressed during cassava post-harvest physiological deterioration. **Plant Molecular Biology**, v. 64, p. 187-203, 2007.

REIS, S.P.; TAVARES, L. S.C.; COSTA, C. N. M.; SANTA-BRIGIDA, A. B.; de SOUZA, C. R. B. Molecular cloning and characterization of a novel RING zinc-finger protein gene up-regulated under *in vitro* salt stress in cassava. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 6513-6519, 2012.

REJEB, I. B.; PASTOR, V.; MAUCH-MANI, B. Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. **Plants**, v.3, n. 4, p. 458-475, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1989

SANTA BRIGIDA, A. B.; REIS, S. P.; COSTA, C. N. M.; CARDOSO, C. M.; LIMA, A. M. DE SOUZA C.R.B. Molecular cloning and characterization of a cassava translationally controlled tumor protein gene potentially related to salt stress response. **Molecular Biology Report**. v. 41, p. 1787–1797, 2014.

SANTANA, L. S.; COSTA, M.; PIROVANI, N. M.; ALMEIDA, A. F.; ALVIM, F. C.; PIROVANI, C. P. TcCYS4, a cystatin from cocoa, reduces necrosis triggered by MpNEP2 in tobacco plants. **Genetic Molecular Research**, v.13, n. 3, p. 7636-48, 2014.

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

SHIN, S. Y.; LEE, H. S.; KWON, S. Y.; KWON, S. T.; KWAK, S. S. Molecular characterization of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of *Manihot esculenta*. **Plant physiology and biochemistry**, v. 43, n.1, p. 55-60, 2005.

SUZUKI, N.; RIVERO, R. M.; SHULAEV, V.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 32-43, 2014.

WANG, Z. Q.; LI, G.Z.; GONG, Q.Q.; LI, G. X.; ZHENG, S. J. OsTCTP, encoding a translationally controlled tumor protein, plays an important role in mercury tolerance in rice. **BMC Plant Biology**, v. 15, doi: 10.1186/s12870-015-0500-y, 2015.

VENTURINI, M. T.; DA SILVA SANTOS, V.; DE OLIVEIRA, E. J. Procedimentos para avaliar a tolerância de genótipos de mandioca à deterioração fisiológica pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, p. 562-570, 2015.

VIEIRA, E.A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F.G.; BELLON, G. SILVA, M.S. Caracterização molecular de acessos de mandioca biofortificados com potencial de uso no melhoramento genético. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 457-463, 2011.

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.

ZUST, T.; AGRAWAL, A. A. Trade-Offs Between Plant Growth and Defense Against Insect Herbivory: An Emerging Mechanistic Synthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 68, p. 513-534, 2017.

Capítulo V

**PHYTOCYSTATINS AND THEIR POTENTIAL TO CONTROL PLANT
DISEASES CAUSED BY FUNGI**

Artigo publicado

Phycystatins and their Potential to Control Plant Diseases Caused by Fungi

Aline M. Lima^{1,2}, Sávio P. dos Reis^{1,3} and Cláudia R.B. de Souza^{1,*}

¹Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 66075-110, Brazil ²Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, 66077-530, Brazil ³Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 66075-110, Brazil



Abstract: Plant cystatins, also called phycystatins, constitute a family of specific cysteine protease inhibitors found in several monocots and dicots, where they can be involved in the regulation of several endogenous processes and in defense against pests and pathogens, as well as in response to abiotic stress. In this mini-review we aimed to present isolated and characterized phycystatins with potential use in control of plant disease caused by fungi.

Keywords: Cysteine protease inhibitors, phytopathogenic fungi, plant cystatin, plant disease, plant-pathogen interaction.

#Author profile: Cláudia Regina Batista de Souza is a professor at the Universidade Federal do Pará, Brazil, since 2003, where she works with proteins expressed in plants in response to abiotic and biotic stress, including phycystatins from black pepper.

INTRODUCTION

Proteases are enzymes that catalyze the hydrolytic cleavage of peptide bonds, and they are classified according to their catalytic sites into: serine-, threonine-, aspartic-, metallo-, and cysteine proteases [1]. Proteases are also classified in evolutionary families and clans in the MEROPS database [2].

Cysteine proteases are proteins showing molecular mass about 21–30 kDa with proteolytic activity conferred by the presence of a cysteine residue in their active site that acts as a nucleophile in the first step of proteolysis [3]. These proteases are found in a large variety of organisms, such as virus, prokaryotes and plants [4], where they are involved in many physiological processes requiring metabolic degradation of peptides and proteins.

The papain family constitutes the best characterized family of cysteine proteases and contains peptidases, which are structurally related to papain, isolated from *Carica papaya* and the first cysteine protease with its structure identified [5]. Another cysteine protease family is the legumain family constituted by Asn-specific cysteine proteases found in animals and plants able to cleave the asparaginyl bonds [6, 7].

The activity of cysteine proteases in the cell can be regulated at transcriptional level, by the rate of protease synthesis and degradation, as well as by their specific inhibitors, known as cysteine protease inhibitors or cystatins. Inhibition process involves specific and reversible interaction of

protease inhibitor with the catalytic site of target protease by competition with substrate [8, 9]. Maintenance of equilibrium between free cysteine proteases and their complexes with inhibitors is necessary for adequate functioning of all living systems. In Fig. 1 the molecular modeling of the interaction between cathepsin B HvPap-19, a cysteine protease, and its inhibitor from barley, is shown as reported by Martinez *et al.* [9].

Cysteine protease inhibitors are grouped into the cystatin superfamily, which includes animal cystatins (stefins, cystatins and kininogens) [10] and plant cystatins, also called phycystatins [11]. Phycystatins have been identified in several monocots and dicots, where they can be involved in the regulation of several endogenous processes and in defense against pests and pathogens, as well as response to abiotic stress [12, 13].

In the last 15 years significant advances on identification of phycystatins showing potential to control phytopathogenic fungi were obtained. Despite some literature available on phycystatins, most of them are focused in their application in control of insects and pests. On the other hand, phytopathogenic fungi are one of the most important biotic factors affecting the agriculture in the world. Therefore, in this mini-review we aimed to present isolated and characterized phycystatins with potential use in control of plant disease caused by fungi.

MAIN FEATURES OF PHYCYSTATINS

Phycystatins (PhyCys) constitute a family of specific cysteine protease inhibitors found only in plants, comprising more than 80 members [14].

*Address correspondence to this author at the Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 66075-110, Brazil; Tel/Fax: 55 91 320 17585; E-mail: bsouza@ufpa.br

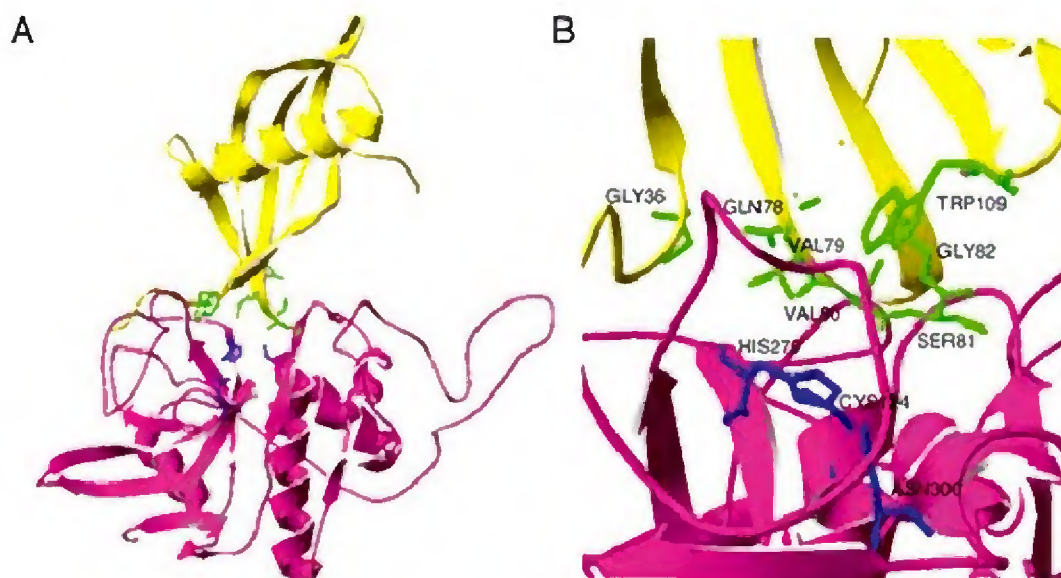


Figure 1. Molecular modeling of interaction between the cathepsin B HvPap-19 (pink) and the cystatin HvCPI-6 (yellow) from barley. Amino acids residues involved in the catalytic site of protease are colored in blue, while residues related to the protease inhibitory activity of cystatin are in green. (A) Whole protease-cystatin interaction model. (B) Details of the predicted region of interaction between protease and cystatin. Note: This figure has been previously published in *Physiologia Plantarum* (145:85-94, 2012) and was kindly provided by Dr Isabel Diaz from the Universidad Politécnica de Madri, with permission of John Wiley and Sons (License number: 2936571224920).

The first identified and also the better characterized PhyCys were the oryzacystatin I [15] and oryzacystatin II [16], proteins considered important to regulation of storage protein during developing and germinating of rice seeds. Since then, many other PhyCys have been isolated and characterized from different crops, such as cowpea [17], potato [18], corn [19], soybean [20, 21], cabbage [22], carrot [23], Pearl Millet [24], wheat [25], apple [26], pineapple [27], kiwifruit [28], strawberry [29], cacao [30], and latex tree [31].

Studies have showed that PhyCys may be involved in many physiological process, including programmed cell death [32], fruit development [33, 34], developing and germinating seeds [15, 21, 35-39], and defense against biotic and abiotic stress [24, 30, 36, 40-53]. The Arabidopsis genome encodes for seven PhyCys isoforms, named AtCYS1 to AtCYS7, comprising two distantly related gene clusters [54]; among them AtCYS3 and AtCYS6 are involved in resistance to salt and drought stresses, as well as oxidative and cold stresses [55].

The PhyCys have been grouped according to the presence of conserved domains and their molecular weight. The group-1 represent the most PhyCys and is constituted by proteins containing only 1 cystatin domain with about 100 residues and molecular weight ranging between 12 and 16 kDa, such as those found in chestnut and sugarcane [41, 44]. The group-2 is constituted by PhyCys showing a highly conserved cystatin domain at the amino-terminal and an extended cystatin-like domain at the carboxy-terminal, and a molecular weight about 23 kDa [21, 29, 30, 47]. The group-3 is constituted by proteins with high molecular weight, such as the 86 kDa phycystatin expressed in potato tuber, also known as a multicystatin, since this protein contains eight cystatin-like domains [18]. Some examples of PhyCys with

their number of amino acid residues and molecular weights are shown in Table 1.

One of the main features of PhyCys, is that these proteins contain neither sulfite bridges nor putative site of glycosylation. In addition to the three motifs common to all cystatins (a conserved amino-terminal glycine residue, a highly conserved QXVXG motif in the central loop region and a P/AW near the carboxy-terminal) all PhyCys contain an amino-terminal conserved motif [LVI]-[AGT]-[RKE]-[FY]-[AS]-[VI]-X-[EDQV]-[HYFQ]-N, also known as LARFAV-like motif (Fig. 2) that comprises the α -helix in the cystatin structure [55, 59-61]. Studies have showed that the three motifs common to all cystatins are important to their functional roles and ability of interaction with their target-proteases, since changes in specific amino acid residues have decreased drastically their inhibitory activity [45]. Also, in pineapple a cystatin containing an extended amino-terminal trunk of 63 residues rich in alanine and glutamate important to its inhibitory activity was identified [34]. Furthermore, some PhyCys may contain an amino-terminal signal peptide (Fig. 2) for transport into the lumen of the endoplasmic reticulum [29, 30, 47].

The main targets of PhyCys are the papain-like proteases; however group-2 PhyCys showing an extended region at carboxy-terminal contain the motif SNSL, which has been involved in the inhibition of legumain-like proteases [6]. In addition, a recent study reported by Chu *et al.* [61] showed that the inhibition role of the conserved amino-terminal cystatin domain of tarocystatin, a group-2 phycystatin isolated from corn of taro (*Colocasia esculenta*), might be increased by its carboxy-terminal cystatin-like extension during interaction with the papain. In Fig. 2 the alignment between Phy-

Table 1. Number of amino acid (aa) residues and theoretical molecular weight (Mw) of PhyCys.

Organism	Protein name	Length (aa)	Mw (kDa)	References
<i>Fragaria ananassa</i>	Fa-CPI-1	235	23.1*	[29]
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	AbCPI	247	28*	[47]
<i>Theobroma cacao</i>	TcCYS-1	185	21.5*	[30]
	TcCYS-2	127	14.1	
	TcCYS-3	100	11.6*	
	TcCYS-4	205	22.8	
<i>Castanea sativa</i>	ND**	102	11.4	[41]
<i>Colocasia esculenta</i>	CeCPI	205	29	[56]
<i>Saccharum officinarum</i>	Canecystatin	106	11.9	[44]
<i>Solanum tuberosum</i>	Potato multicystatin	756	86.8	[18]
<i>Glycine max</i>	Soyacystatin	245	26	[21]
<i>Triticum aestivum</i> L. cv. Chihoku	mTaMDC1	243	23*	[57]
<i>Dianthus caryophyllus</i> L. cv. Reiko	rDC-CPIIn	98	10.8	[58]
<i>Hordeum vulgare</i>	HvCPI-1	107	11.8	[36]
<i>Actinidia deliciosa</i>	KCPI-1	116	11	[28]
<i>Sesamum indicum</i>	SiCYS	199	22	[53]

* Predicted signal peptides were not included in the analysis. **ND: not designed.

Cys highlighting their main conserved motifs/elements and their predicted secondary structure is depicted.

EXPLOITING THE PHYTOCYSTATINS' ANTIFUNGAL ACTIVITY TO CONTROL PLANT DISEASES

Among diverse factors that affect the growth and development of plants, phytopathogenic fungi are one of the most damaging plant parasitic organisms. Worldwide, the diseases caused by fungi in important crops greatly and negatively impact agricultural production and the environment [62], including the Brazilian Amazon region, where the production of black pepper (*Piper nigrum* L.) and cassava (*Manihot esculenta* Crantz) has been severely damaged by disease caused by *Fusarium solani* f. sp. *piperis* and *Phytophthora drechsleri*, respectively [63, 64].

The main control methods used to combat plant pathogens and pests are those based on the use of chemical products (fungicides and insecticides), which increases cost and can lead to environment contaminations. Since many studies have reported the important roles played by PhyCys in plant defense response, their utilization in control of pathogen and pests has emerged as a powerful biotechnological tool.

For this purpose, many PhyCys have been recombinantly produced by expression in bacteria, followed by evaluation of their ability to inhibit the pathogen growth *in vitro* assays. PhyCys exhibiting high antifungal activity have included those identified in pearl millet [24], chestnut [41], tomato

[42], sugarcane [44], carnation [65], barley [45], taro [56], strawberry [29], wheat [57], cacao [30], amaranth [47], kiwi-fruit [52] and sesame [53].

In Table 2 some antifungal PhyCys showing differences on their inhibitory activity, where a specific phytocystatin may inhibit different fungi species, at equal or different concentration of recombinant protein, are listed. For example, the FaCPI-1 from strawberry (*Fragaria ananassa*) is able to inhibit *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum* at a concentration of 1.9 μ M and 2.28 μ M, respectively [29]. Another example is the CeCPI from taro that inhibits *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria brassicae* and *Pythium aphanidermatum* at 80 μ g/mL, while *F. oxysporum* and *Glomerella cingulata* are inhibited at 200 μ g/mL [56]. Regarding the action spectrum of phytocystatins listed on Table 2, most of them showed inhibitory activity against at least two fungal species. The CeCPI, for example, could be considered a candidate to control different plant diseases, since showed inhibitory activity against more than five fungal species.

Moreover, data shown here confirm the potential use of PhyCys in control of phytopathogenic fungi with importance to agriculture. Among them, the fungus *B. cinerea* can infect more than 200 plant species and ranks the second place in the Top 10 fungal plant pathogen list based on scientific/economic importance, according to international community of plant mycologists [66]. Also included on this fungal plant pathogen list, *F. oxysporum* is a soil-borne pathogen causing vascular wilt on a wide range of plants, and gen-

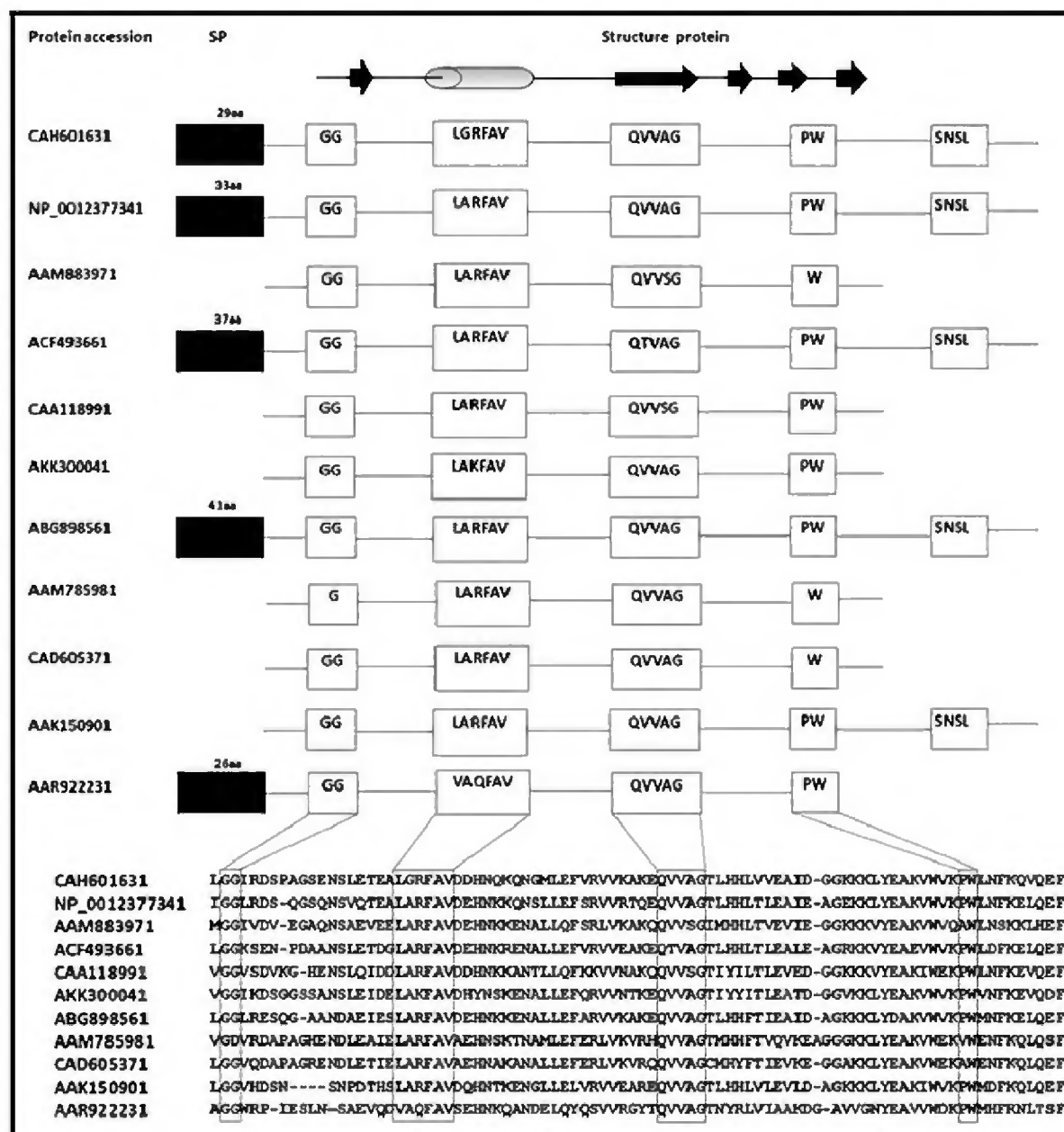


Figure 2. Alignment of PhyCys highlighting the G/GG residue at the N-terminal sequence, the LARFAV-like motif, a conserved region found in all PhyCys that comprises the α -helix (○) in the cystatin structure, the QXVXG sequence in central part, and the P/PW sequence at the C-terminal end. Also is shown the SNSL domain found in the C-terminal end of PhyCys from group-2. SP: signal peptide. CAH60163.1: Fa-CPI-1 from *Fragaria ananassa*, NP_001237734.1: Soyacystatin from *Glycine max*, AAM88397.1: CeCPI from *Colocasia esculenta*, ACF49366.1: mTaMDC1 from *Triticum aestivum* L. cv. Chihoku, CAA11899.1: PhyCys from *Castanea sativa*, AAK30004.1: rDC-CPI from *Dianthus caryophyllus* L. cv. Reiko, ABG89856.1: AhCPI from *Amaranthus hypochondriacus*, AAM78598.1: Canecystatin from *Saccharum officinarum*, CAD60537.1: HvCPI-1 from *Hordeum vulgare*, AAK15090.1: SiCYS from *Sesamum indicum* and AAR92223.1: KCPI-1 from *Actinidia deliciosa*.

erating severe losses in crops such as melon, tomato, cotton and banana [66]. Then, taking into account the action spectrum of phytocystatins listed on Table 2, the FaCPI-1 could be a candidate to control plant diseases caused by these two important pathogens. Interestingly, besides the control of diseases in agriculturally important crops, the potential use of PhyCys as an antifungal agent could be extended to hu-

man health, since studies have shown that *F. oxysporum* is able to infect immune compromised patients [67].

Since the first studies revealing the potential use of PhyCys in control of pest and pathogens, one of the most challenges of researchers has been to understand the mechanism of PhyCys action against different organisms. In pests, for example, it is known that PhyCys inhibit proteases

Table 2. **PhyCys** with *in vitro* inhibitory activity against different fungi.

Fungi	PhyCys name*	Concentration	References
<i>Botrytis cinerea</i>	FaCPI-1	1.9 μ M	[29]
	Hv-CPI	3 μ M	[45]
	rDC-CPI _n	5 μ M	[65]
	KCPI-1	5.8 μ M	[52]
<i>Fusarium oxysporum</i>	FaCPI-1	2.28 μ M	[29]
	AhCPI	17 μ M	[47]
	CeCPI	200 μ g/mL	[56]
<i>Sclerotium cepivorum</i>	AhCPI	5 μ M	[47]
<i>Rhizoctonia solani</i>	AhCPI	10 μ M	[47]
	CeCPI	80 μ g/mL	[56]
<i>Colletotrichum graminicola</i>	Hv-CPI	1.5 μ M	[45]
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	Hv-CPI	6 μ M	[45]
<i>Trichoderma viride</i>	Hv-CPI	6 μ M	[45]
<i>Trichoderma reesei</i>	Canecystatin	200 μ g/mL	[44]
	SiCYS	45 μ g/mL	[53]
<i>Sclerotium rolfisii</i>	CeCPI	80 μ g/mL	[56]
<i>Alternaria brassicae</i>	CeCPI	80 μ g/mL	[56]
<i>Glomerella cingulata</i>	CeCPI	200 μ g/mL	[56]
<i>Pythium aphanidermatum</i>	CeCPI	80 μ g/mL	[56]
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	TcCYS-1	5 μ M	[30]
	TcCYS-2		
	TcCYS-3		
	TcCYS-4		
<i>Microdochium nivale</i>	mTaMDC1	50 μ g/mL	[57]
<i>Sclerotiana sclerotium</i>	rDC-CPI _n	10 μ M	[65]
<i>Phytophthora nicotianae</i>	rDC-CPI _n	2.5 μ M	[65]
<i>Aspergillus sydowii</i>	SiCYS	45 μ g/mL	[53]
<i>Helminthosporium sesamum</i>	SiCYS	45 μ g/mL	[53]
<i>Alternaria radicina</i>	KCPI-1	11,6 μ M	[52]

*These PhyCys are the same cited on the Table 1.

interfering in dietary protein assimilation and causing growth delays and mortality [68]; moreover, in this case, PhyCys can be considered anti-metabolite molecules, because they produce a deficiency of protein in those organisms. Although the mechanism by which PhyCys inhibit fungi growth is not yet elucidated, it has been suggested to be related to the direct inhibition of fungal cysteine protease [47, 56]. Likewise, Wang *et al.* [46] showed that the N-terminus of CeCPI, produced by heterologous expression in bacteria, is implicated in papain-inhibitory activity as well as antifungal activity against *S. rolfisii*. In contrast, other studies have indicated that antifungal activity of PhyCys could involve a different

mechanism. For example, Martinez *et al.* [45] reported that inhibition of *B. cinerea* by the barley cystatin Hv-CPI is not associated with its cysteine-proteinase inhibitory properties, and correlates with the absence of intra- and extra-cysteine protease activity in this fungus. Also, the same authors [45] have suggested that action of PhyCys could involve changes in the permeability of fungal membrane, in a similar mechanism to inhibition of *Sclerotiana sclerotium* by the trypsin inhibitor SAP16 from *Helianthus annuus* [69]. Other studies have also corroborated that antifungal activity of PhyCys cannot be directly related to their enzymatic activity. As reported by Cheng *et al.* [53] the whole PhyCys from

sesame seeds (SiCYS), as well as its N- and C-terminal domains (SiCYS-N and SiCYS-C, respectively), recombinantly produced by expression in bacteria, showed comparable ability to inhibit spore germination of *Trichoderma reesei*, *Aspergillus sydowii*, and *Helminthosporium sesamum*. On the other hand, SiCYS exhibited more effective papain-inhibitory activity than SiCYS-N while SiCYS-C had almost no inhibitory activity, indicating no correlation between antifungal and papain-inhibitory activities for this PhyCys.

In addition to *in vitro* studies, transgenic approaches have also contributed in understanding of mechanisms by which plants over-expressing or silencing PhyCys genes respond to attacks by insects and pathogens. Enhanced resistance against insects in transgenic plants over-expressing PhyCys genes has been shown [70, 71]. In Arabidopsis the over-expression of PhyCys gene from barley increased the resistance against two aphid species [70]. In fungi, however, it has been shown that PhyCys can inhibit their growth when *in vitro* conditions, but not in transgenic plants [72]. As reported by Carrillo *et al.* [72] HvCPI from barley inhibited the *in vitro* growth of some phytopathogenic fungi, including *Magnaporthe oryzae*, but Arabidopsis plants over-expressing this PhyCys showed no differences in fungal resistance levels in comparison to non-transformed plants. On the other hand, another study on *in vitro* and *in vivo* PhyCys antifungal properties revealed a kiwifruit cystatin able to prevent artificial infection of apple and carrot by spore suspension of *B. cinerea* and *Alternaria radicina*, respectively [73]. This purified cystatin was also able to inhibit the *in vitro* growth of these two fungal species [73]. In addition, a recent study reported by van der Linde *et al.* [74] revealed an interesting role of cystatin-9 from maize during interaction with biotrophic pathogen *Ustilago maydis*. Transgenic plants by silencing of the cystatin-9 gene resulted in reduced infection by *U. maydis*, showing that this PhysCys suppresses host immunity by inhibition of apoplastic cysteine proteases [74].

CONCLUSION

In the last years several PhyCys with antifungal properties have been isolated and characterized; however, taking into account the whole immense plant diversity in the world, many PhyCys remain yet unexploited. A potential application of these antifungal PhyCys is their use in stable transformation of plants to control phytopathogenic fungi with importance to agriculture, since the development of genetically engineered plants by the over-expression and/or the silencing of specific genes has been the more viable option to the production of pathogen resistant crops. Despite significant advances on PhyCys studies, our knowledge about mechanism of their action against fungi is yet limited. Therefore, further studies are necessary to a better understanding of plant defense systems, including the elucidation of functional roles of PhyCys in inhibition of fungal growth that will help us in development of new strategies to control plant diseases caused by these pathogens.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), Universidade Federal Rural de Amazônia (UFRA) and Universidade Federal do Pará (UFPA), Brazil. Special thanks to Dr. Isabel Diaz from the Universidad Politécnica de Madri (Spain), who kindly provided us the Figure 1 shown in this paper.

REFERENCES

- [1] Barrett, A.J.; Rawlings, N.D.; Woessner, J.F. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2nd edition; Academic Press: London, **2004**.
- [2] Rawlings, N.D.; Barrett, A.J.; Bateman, A. *MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res.*, **2012**, *40*, 343-350.
- [3] Powers, J.C.; Akgian, J.L.; Ekici, O.D.; James, K.E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 4639-4750.
- [4] Otto, H.H.; Schirmeister, T. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 133-171.
- [5] Drenth, J.; Jansonius, J.; Koekoek, R.; Swen, H.; Wolters, B. Structure of Papain. *Nature*, **1968**, *218*, 929.
- [6] Martínez, M.; Diaz-Mendoza, M.; Carrillo, L.; Diaz, I. Carboxy terminal extended phycystatins are bifunctional inhibitors of papain and legumain cysteine proteinases. *FEBS Lett.*, **2007**, *581*, 2914-2918.
- [7] Esteban-Garcia, B.; Garrido-Cardenas, J.A.; Lopez-Alonso, D.; Garcia-Maroto, F. A distinct subfamily of papain-like cysteine proteinases regulated by senescence and stresses in *Glycine max*. *J. Plant Physiol.*, **2010**, *167*, 1101-1108.
- [8] Rzychon, M.; Chmiel, D.; Stec-niemczyk, J. Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochim. Pol.*, **2004**, *51*, 861-873.
- [9] Martínez, M.; Cambra, I.; González-Melendi, P.; Santamaría, M.E.; Diaz, I. C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. *Physiol. Plant*, **2012**, *145*, 85-94.
- [10] Barrett, A. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *Trends Biochem. Sci.*, **1987**, *12*, 193-196.
- [11] Kondo, H.; Abe, K.; Emori, Y.; Arai, S. Gene organization of oryzacystatin II, a new cystatin superfamily member of plant origin, is closely related to that of oryzacystatin-I but different from those of animal cystatins. *FEBS Lett.*, **1991**, *278*, 87-90.
- [12] Abraham, Z.; Martínez, M.; Carbonero, P.; Diaz, I. Structural and functional diversity within the cystatin gene family of *Hordeum vulgare*. *J. Exp. Bot.*, **2006**, *57*, 4245-4255.
- [13] Grudkowska, M.; Zagdanska, B. Multifunctional role of plant cysteine Proteinases. *Acta Biochim. Pol.*, **2004**, *51*, 609-624.
- [14] Bateman, A.; Birney, E.; Cerutti, L.; Burbin, R.; Eddy, S.R.; Griffiths-Jones, S.; Howe, K.L.; Marsahall, M.; Sonnhammer, E.L. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, 276-280.
- [15] Abe, K.; Emori, Y.; Kondo, H.; Suzuki, K.; Arai, S.; Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 16793-16797.
- [16] Kondo H.; Abe, K.; Nishinura, I.; Watanabe, H.; Emori, Y.; Arai, S. Two Distinct Cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteases. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 15832- 15837.
- [17] Fernandes, K.V.S.; Sabelli, P.A.; Barratt, D.H.P.; Richardson, M.; Xavier-Filho, J.; Shewry, P.R. The resistance of cowpea seeds tobruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase - inhibitors. *Plant Mol. Biol.*, **1993**, *23*, 215-219.
- [18] Waldron, C.; Wegrich, L.M.; Merlo, P.A.; Walsh, T.A. Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor. *Plant Mol. Biol.*, **1993**, *23*, 801-812.

- [19] Abe, M.; Abe, K.; Domoto, C.; Arai, S. Two distinct species of corn cystatin in corn kernels. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1995**, *59*, 756-758.
- [20] Hines, M.E.; Osuala, C.I.; Nielsen, S.S. Isolation and partial characterization of soybean cystatin cysteine proteinase inhibitor of coleopteran digestive proteolytic activity. *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, *39*(8), 1515-1520.
- [21] Misaka, T.; Kuroda, M.; Iwabuchi, K.; Abe, K.; Arai, S. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. *Eur. J. Biochem.*, **1996**, *240*, 609-614.
- [22] Lim, C.O.; Lee, S.I.; Chung, W.S.; Park, S.H.; Hwang, I.; Cho, M. J. Characterization of a cDNA encoding cysteine proteinase inhibitor from Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) flower buds. *Plant Mol. Biol.*, **1996**, *30*, 373-379.
- [23] Ojima, A.; Shiota, H.; Higashi, K.; Kamada, H.; Shimma, Y.I.; Wadamasata, P.; Satoh, S. An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteases in cell cultures and seeds of carrot. *Plant Mol. Biol.*, **1997**, *34*, 99-109.
- [24] Joshi, B.N.; Sainani, M.N.; Bastawade, K.B.; Gupta, V.S.; Ranjekar, P.K. Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1998**, *246*, 382-387.
- [25] Kuroda, M.; Kiyosaki, T.; Matsumoto, I.; Misaka, T.; Arai, S.; Abe, K. Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2001**, *65*, 22-28.
- [26] Ryan, S.N.; McManus, M.T.; Laing, W.A. Identification and characterization of proteinase inhibitors and their genes from seeds of apple (*Malus domestica*). *J. Biochem.*, **2003**, *134*, 31-42.
- [27] Shyu, D.J.H.; Chyan, C.L.; Tzen, J.T.C.; Chou, W.M. Molecular cloning, expression, and functional characterization of a cystatin from pineapple stem. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, *68*, 1681-1689.
- [28] Rassam, M.; Laing, W.A. Purification and characterization of phyto-cystatins from kiwifruit cortex and seeds. *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 19-30.
- [29] Martinez, M.; Abraham, Z.; Gambardella, M.; Echaide, M.; Carbonero, P.; Diaz, I. The strawberry gene Cyl1 encodes a phyto-cystatin with antifungal properties. *J. Exp. Bot.*, **2005**, *56*, 1821-1829.
- [30] Pirovani, C.P.; Santiago, A.S.; Santos, L.S.; Micheli, F.; Margis, R.; Gesteira, A.S.; Alvim, F.C.; Pereira, G.A.G.; Cascardo, J.C.M. *Theobroma cacao* cystatins impair *Monilophthora perniciosa* mycelial growth and are involved in postponing cell death symptoms. *Planta*, **2010**, *232*, 1485-1497.
- [31] Bangrak, P.; Chotigeat, W. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cystatin from *Hevea* rubber latex. *Plant Physiol. Biochem.*, **2011**, *49*, 244-250.
- [32] Belenghi, B.; Acconcia, F.; Trovato, M.; Perazzolli, M.; Bocedi, A.; Polticelli, F.; Ascenzi, P.; Delledonne, M. AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. *Eur. J. Biochem.*, **2003**, *270*, 2593-2604.
- [33] Ryan, S.N.; Laing, W.A.; McManus, M.T. A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit. *Phytochemistry*, **1998**, *49*, 957-963.
- [34] Neuteboom, L.W.; Matsumoto, K.O.; Christopher, D.A. An extended AE-rich N-terminal trunk in secreted pineapple cystatin enhances inhibition of fruit bromelain and is posttranslationally removed during ripening. *Plant Physiol.*, **2009**, *151*, 515-527.
- [35] Bolter, C.J. Methyl jasmonate induces papain inhibitor(s) in tomato leaves. *Plant Physiol.*, **1993**, *103*, 1347-1353.
- [36] Gaddour, K.; Vicente-Carbajosa, J.; Lara, P.; Isabel-Lamoned, I.; Diaz, I.; Carbonero, P. A constitutive cystatin-encoding gene from barley (*Icy*) responds differentially to abiotic stimuli. *Plant Mol. Biol.*, **2001**, *45*, 599-608.
- [37] Hong, J.K.; Hwang, J.E.; Lim, C.J.; Yang, K.A.; Jin, Z.-L.; Kim, C.Y.; Koo, J.C.; Chung, W.S.; Lee, K.O.; Lee, S.Y.; Cho, M.J.; Lim, C.O. Over-expression of Chinese cabbage phyto-cystatin 1 retards seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Sci.*, **2007**, *172*, 556-563.
- [38] Hwang, J.E.; Hong, J.K.; Je, J.H.; Lee, K.O.; Kim, D.Y.; Lee, S.Y.; Lim, C.O. Regulation of seed germination and seedling growth by an *Arabidopsis* phyto-cystatin isoform, AtCYS6. *Plant Cell Rep.*, **2009**, *28*, 1623-1632.
- [39] Martinez, M.; Cambra, I.; Carrillo, L.; Diaz-Mendoza, M.; Diaz, I. Characterization of the entire cystatin gene family in barley and their target cathepsin L-like cysteine-proteases, partners in the hormone mobilization during seed germination. *Plant Physiol.*, **2009**, *151*, 1531-1545.
- [40] Koiwa, H.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci.*, **1997**, *2*, 379-384.
- [41] Pernas, M.; López-Solanilla, E.; Sanchez-Monge, R.; Salcedo, G.; Rodríguez-Palenzuela, P. Antifungal activity of a plant cystatin. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **1999**, *12*, 624-627.
- [42] Siqueira-Junior, C.L.; Fernandes, K.V.S.; Machado, O.L.T.; Da Cunha, M.; Gomes, V.M.; Moura, D.; Jacinto, T. 87 kDa tomato cystatin exhibits properties of a defense protein and forms protein crystals in prosoybean overexpressing transgenic plants. *Plant Physiol. Biochem.*, **2002**, *40*, 247-254.
- [43] Delledonne, M.; Allegro, G.; Belenghi, B.; Balestrazzi, A.; Picco, F.; Levine, A.; Zelascio, S.; Calligaris, P.; Confalonieri, M. Transformation of white poplar (*Populus alba* L.) with a novel *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance. *Mol. Breed.*, **2001**, *7*, 35-42.
- [44] Soares-Costa, A.; Beltrami, L.M.; Thiemann, O.H.; Henrique-Silva, F. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2002**, *296*, 1194-1199.
- [45] Martinez, M.; López-Solanilla, E.; Rodríguez-Palenzuela, P.; Carbonero, P.; Diaz, I. Inhibition of plant-pathogenic fungi by the barley cystatin Hv-CPI (gene *Icy*) is not associated with its cysteine-proteinase inhibitor properties. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **2003**, *16*, 876-883.
- [46] Wang, K.M.; Kumar, S.; Cheng, Y.S.; Venkatagiri, S.; Yang, A.H.; Yeh, K.W. Characterization of inhibitory mechanism and antifungal activity between group-1 and group-2 phyto-cystatins from taro (*Colocasia esculenta*). *FEBS J.*, **2008**, *275*, 4980-4989.
- [47] Valdes-Rodríguez, S.; Cedro-Tanda, A.; Aguilar-Hernandez, V.; Cortes-Onofre, E.; Blanco-Labra, A.; Guerrero-Rangel, A. Recombinant amaranth cystatin (AhCPI) inhibits the growth of phytopathogenic fungi. *Plant Physiol. Biochem.*, **2010**, *48*, 469-475.
- [48] de Souza, C.R.B.; Santa-Brígida, A.B.; Santos, R.C.; Costa, C.N.M.; Darnet S.H.; Harada, M.L. Identification of sequences expressed during compatible black pepper-*Fusarium solani* f. sp. *piperis* interaction. *Acta Physiol. Plant.*, **2011**, *33*, 2553-2560.
- [49] Lima, A.M. *Isolamento e caracterização de genes de cistatinas de pimenta-do-reino (Piper nigrum) durante interação com o Fusarium solani f. sp. piperis*. Master's degree dissertation, Federal University of Pará, Belém, March 2012.
- [50] Diop, N.N.; Kidric, M.; Repellin, A.; Gareil, M.; d'Arcy-Lameta, A.; Pham Thi, A.T.; Zully-Fodil, Y. A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. *FEBS Lett.*, **2004**, *577*, 545-550.
- [51] Hwang, J.E.; Hong, J.K.; Lim, C.J.; Chen, H.; Je, J.; Yang, K.A.; Kim, D.Y.; Choi, Y.J.; Lee, S.Y.; Lim, C.O. Distinct expression patterns of two *Arabidopsis* phyto-cystatin genes, AtCYS1 and AtCYS2, during development and abiotic stresses. *Plant Cell Rep.*, **2010**, *29*, 905-915.
- [52] Popovic, M.; Andjelkovic, U.; Burazer, L.; Lindner, B.; Petersen, A.; Gavrovic-Jankulovic, M. Biochemical and immunological characterization of a recombinantly produced antifungal cysteine proteinase inhibitor from green kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Phytochemistry*, **2013**, *94*, 53-59.
- [53] Cheng, M.-L.; Tzen, J.T.C.; Shyu, D.J.H.; Chou W.-M. Functional characterization of the N-terminal and C-terminal domains of a sesame group II phyto-cystatin. *Bot. Stud.*, **2014**, *55*(18), 1-10.
- [54] Martinez, M.; Abraham, Z.; Carbonero, P.; Diaz, I. Comparative phylogenetic analysis of cystatin gene families from *Arabidopsis*, rice and barley. *Mol. Genet. Genomics*, **2005**, *273*, 423-432.
- [55] Zhang, X.; Liu, S.; Takano, T. Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. *Plant Mol. Biol.*, **2008**, *68*, 131-143.
- [56] Yang, A.H.; Yeh, K.W.C. Molecular cloning, recombinant gene expression and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung no.1). *Planta*, **2005**, *221*, 493-501.
- [57] Christova, P.K.; Christov, N.K.; Imai, R. A cold inducible multi-domain cystatin from winter wheat inhibits growth of the snow mold fungus, *Microdochium nivale* *Planta*, **2006**, *223*, 1207-1218.
- [58] Sugawara, H.; Shibuya, K.; Yoshioka, T.; Hashiba, T.; Satoh, S. Is a cysteine proteinase inhibitor involved in the regulation of petal wilting in senescing carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers? *J. Exp. Bot.*, **2002**, *53*, 407-413.

- [59] Margis, R.; Reis, E.M.; Villeret, V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1998**, *359*, 24-30.
- [60] Reis, E.M.; Margis, R. Sugarcane phytocystatins: Identification, classification and expression pattern analysis. *Genet. Mol. Biol.*, **2001**, *24*, 291-296.
- [61] Chu, M.H.; Liu, K.L.; Wu, H.Y.; Yeh, K.W.; Cheng, Y.S. Crystal structure of tarocystatin-papain complex: implications for the inhibition property of group-2 phytocystatins. *Planta*, **2011**, *234*, 243-254.
- [62] Gonzalez-Fernandez, R.; Jorin-Novo, J.V. Contribution of Proteomics to the Study of Plant Pathogenic Fungi. *J. Proteome Res.*, **2012**, *11*(1), 3-16.
- [63] Duarte, M.L.R.; Archer, S.A. *In vitro* toxin production by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. *Fitopatol. Bras.*, **2003**, *28*, 229-235.
- [64] Muniz, M.F.S.; Andrade, F.W.R.; Queiroz, F.M.; Moura-Filho, G.; Menezes, M. Characterization of *Phytophthora drechsleri*, the causal agent of cassava soft root rot. *Fitopatol. Bras.*, **2006**, *31*, 195-198.
- [65] Sugawara, H.; Yoshioka, T.; Hashiba, T.; Satoh, S. Antifungal activity of a recombinant carnation cystatin, rDC-CPln. *Plant Biotechnol.*, **2002**, *19*(3), 207-209.
- [66] Dean, R.; Van Kan, J.A.L.; Pretorius, Z.A.; Hammond-Kosack, K.E.; Pietro A.D.; Spanu, P.D.; Rudd, J.J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; Foster, G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant. Pathol.*, **2012**, *13*(4), 414-430.
- [67] Nucci, M.; Anaissie, E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2007**, *20*, 695-704.
- [68] Benchabane, M.; Schliiter, U.; Vorster, J.; Goulet, M.C.; Michaud, D. Plant cystatins. *Biochimie*, **2010**, *92*, 1657-1666.
- [69] Giudici, A.M.; Regente, M.C.; Canal, L. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. *Plant Physiol. Biochem.*, **2000**, *38*, 881-888.
- [70] Carrillo, L.; Martinez, M.; Alvarez-Alfageme, F.; Castañera, P.; Smaghe, G.; Diaz, I.; Ortego, F. A barley cysteine-proteinase inhibitor reduces the performance of two aphid species in artificial diets and transgenic *Arabidopsis* plants. *Transgenic Res.*, **2011**, *20*, 305-319.
- [71] Zhang, B.; Chen, M.; Zhang, X.; Luan, H.; Diao, S.; Tian, Y.; Su, X. Laboratory and field evaluation of the transgenic *Populus alba* × *Populus glandulosa* expressing double coleopteran-resistance genes. *Tree Physiol.*, **2011**, *31*, 567-573.
- [72] Carrillo, L.; Herrero, I.; Cambra, I.; Sánchez-Monge, R.; Diaz, I.; Martinez, M. Differential *in vitro* and *in vivo* effect of barley cysteine and serine protease inhibitors on phytopathogenic microorganisms. *Plant Physiol. Biochem.*, **2011**, *49*, 1191-1200.
- [73] Popovic, M. M.; Bulajic, A.; Ristic, D.; Krstic, B.; Jankov, R.M.; Gavrovic-Jankulovic, M. *In vitro* and *in vivo* antifungal properties of cysteine proteinase inhibitor from green kiwifruit. *J. Sci. Food Agric.*, **2012**, *92*, 3072-3078.
- [74] van der Linde, K.; Hemetsberger, C.; Kastner, C.; Kaschani, F.; Renier, A.L.; Hoom, V.D.; Jochen, K.; Doehlemann, G. A maize cystatin suppresses host immunity by inhibiting apoplastic cysteine proteases. *Plant Cell*, **2012**, *24*, 1285-1300.

CAPÍTULO VI
A FAMÍLIA DE GENES DE FITOCISTATINAS EM MANDIOCA:
CARACTERIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

6. A FAMÍLIA DE GENES DE FITOCISTATINAS EM MANDIOCA: CARACTERIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

RESUMO As fitocistatinas são moléculas com atividade antifúngica amplamente reconhecida, tornando-a com isso uma alternativa viável no combate a patógenos. Estudos relataram uma fitocistatina da mandioca down-regulation durante a deterioração pós-colheita. Esta fitocistatina foi posteriormente identificada como potencialmente envolvida na defesa da mandioca ao ataque de *Phytophythium* sp. Este trabalho tem como objetivo caracterizar *in silico* a família de genes de fitocistatinas da mandioca sob aspecto evolutivos relacionando-os com a diversidade funcional das mesmas. Pesquisas foram realizadas no genoma da mandioca através do banco de dados Phytozome e as sequencias obtidas foram analisadas por bioinformática. A busca resultou em nove sequências e as análises computacionais revelaram ampla conservação dos motivos principais característicos das fitocistatinas de planta. Sendo possível identificar e caracterizar nove sequencias genômicas de fitocistatinas distribuídas em 7 cromossomos, com padrões diferenciados de organização de introns e exons. Foram identificadas fitocistatinas dos grupos I e do grupo II com pesos moleculares diferentes, e com diferentes localizações subcelular. O potencial destas fitocistatinas do grupo II em inibir papaína e legumaina foi predito por meio das análises da possível estrutura tridimensional, bem como o potencial da fitocistatinas do grupo I em inibir papaína. Os resultados nos permite concluir que a família de fitocistatinas possuem nove isoformas e que estas podem atuar em diferentes processos celulares, inclusive nos mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos já demonstrado para PnCPI-5, indicando a necessidade de conhecer suas atividades enzimáticas e biológicas.

ABSTRACT

Phytocystatins are molecules with antifungal activity widely recognized, thus they are an alternative for combat against pathogens. Studies related one Mandioca's Phytocystatins down-regulation under post-harvest deterioration, this Phytocystatin was posteriorly recognized with potentially involved in the defense of mandioca against *Phytophythium* sp. This research aims to characterize *in silico* the Phytocystatin gene family of mandioca under evolutionary aspects relating them to their functional diversity. Research were done in the mandioca genome through the Phytozome database

and the sequences obtained were analyzed by bioinformatics. The search resulted in nine sequences and the computational analyzes revealed wide conservation of the main characteristic motifs of plant phytocystatin. It is possible to identify and characterize nine genomic sequences of phytochistides distributed in 7 chromosomes, with differentiated patterns of organization of introns and exons. Phytotic agents of groups I and II with different molecular weights and with different subcellular locations were identified. The potential of these group II phytotic agents to inhibit papain and legumaine was predicted by analyzing the possible three-dimensional structure as well as the potential of group I phytotic agents to inhibit papain. The results allow us to conclude that the phytochistatin family has nine isoforms and that these can act in different cellular processes, including the mechanisms of defense against the pathogen attack already demonstrated for PnCPI-5, indicating the need to know its enzymatic and biological activities.

6. 1. Introdução

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de proteção que lhes permitiram resistir com sucesso a diferentes tipos de condições desfavoráveis, incluindo insetos e microrganismos fitopatogênicos. Dentre estes mecanismos podemos citar os inibidores de proteases, uma vez que tanto os insetos como os microrganismos patogênicos usam enzimas proteolíticas para penetrar no tecido da planta hospedeira (WAR et al., 2012; PANDEY et al., 2016; ZUST e AGRAWA, 2017).

As cistatinas são inibidores competitivos de proteases cisteínicas que, interagindo com o sítio ativo das enzimas-alvo, bloqueiam o acesso ao substrato. Foi identificada primeiramente em animais (em clara de ovo de galinha (FOSSUM e WHITAKER, 1968)). Alguns anos após a identificação de cistatinas em animais verificou-se que estes inibidores de proteases cisteínicas também estavam presentes em plantas, através do isolamento e caracterização de uma cistatina em arroz (ABE et al., 1987).

Fitocistatinas (PhyCys) são inibidores de proteases da família C1A, composta principalmente por proteases do tipo papaína e integradas em uma subfamília independente na árvore filogenética da cistatina (MARTINEZ e DIAZ, 2008; MARTINEZ et al., 2009; RAWLINGS et al., 2016). Adicionalmente algumas fitocistatinas também conseguiam inibir proteases de uma família bastante diferente das

papaínas (família C1A), as legumainas que pertencem à família C13 (MARTINEZ et al., 2007). Na base de dados MEROPS (versão 11.0), várias isoformas de cistatina e genes que codificam a cistatina, com diferentes padrões de expressão espaciais e temporais, foram caracterizados em *Arabidopsis thaliana*, *Castanea sativa*, *Manihot esculenta*, *Hevea brasiliensis* e *Oryza sativa* (RAWLINGS et al., 2016).

Uma alternativa ao uso de defensivos químicos no combate de doenças de plantas é a busca por biomoléculas que confirmam resistência ou tolerância à planta. A espécie *Manihot esculenta* Crantz, conhecida popularmente como mandioca, é atacada por *Phytophthora* sp., causador da podridão radicular nas raízes, principal produto para comercialização (Boari et al., 2018). Esta doença causa sérios prejuízos à produção de mandioca no Estado do Pará, principalmente em pequenos produtores ou agricultores familiares, pois não há acessos comercial resistente nem controle químico eficaz (VIEIRA, 2011).

O papel exato das PhyCys não está determinado, mas sugeriu-se que podem atuar em diversos mecanismos, tais como no estresse biótico e abiótico (BENCHABANE et al., 2010; WAR et al., 2012; LIMA et al., 2015; PANDEY et al., 2016; ZUST e AGRAWA, 2017). As fitocistatinas pertencem são moléculas com atividade antifúngica amplamente reconhecida, tornando-a com isso uma alternativa viável no combate a patógenos. No capítulo 2 foi identificada uma sequência diferencialmente expressa de fitocistatinas em raízes de mandioca destacadas inoculadas com *Phytophthora* sp., agente causador da podridão radicular nesta cultura. Sendo assim necessário a caracterizar *in silico* a família de genes de fitocistatinas da mandioca sob aspectos evolutivos, relacionando-os com a diversidade funcional das mesmas, para possibilitar a análise de suas atividades enzimáticas e biológicas no futuro.

6.2. Material e Métodos

As sequências genômica, cDNA e protéica de PhyCys de mandioca foram obtidas por meio das ferramentas de busca disponível no Phytozome (<http://www.phytozome.net/cassava>). A busca foi realizada utilizando a palavra Cystatin e as sequências obtidas foram avaliadas quanto a presença dos domínios conservados através dos programas InterPro Scan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>) (HUNTER et al., 2008) e CDD (*Conserved Domains Database*; www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd) (MARCHLER-BAUER et al., 2010) e quanto à

similaridade com proteínas de estrutura resolvida depositadas nos bancos de dados, para tal foi utilizada a ferramenta BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) (ALTSCHUL et al., 1997).

Para confirmar se as sequências encontradas correspondem as fases de leitura aberta - ORFs (“*open reading frame*”) foi utilizado o *software* ORF FINDER (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) (ROMBEL et al., 2002). O alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram realizados com o auxílio do programa CLUSTALW utilizando os parâmetros padrões (THOMPSON et al. 1994). As sequências de aminoácidos deduzidas foram avaliadas através de programas e ferramentas computacionais. Para a predição da presença e tamanho do peptídeo sinal foi utilizado o programa SignalP v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (NIELSEN e KROGH, 1998). O peso molecular e o ponto isoelétrico da sequência de aminoácidos deduzida foram previstos pelo ExPASy Proteomics Server (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html). A localização subcelular foi obtida utilizando SherLoc2 (BRIESEMEISTER et al., 2009). A estrutura tridimensional da sequência de aminoácidos foi modelada pelo programa SWISS-MODEL. A análise filogenética foi realizada utilizando o software *Molecular Evolutionly Genetics Analysis* (MEGA), versão 7.0 (KUMAR et al., 2000), usando o método Neighbor-Joining, após o alinhamento realizado pelo programa CLUSTALW das sequências de mandioca com sequências de outras espécies.

6.3. Resultados e Discussão

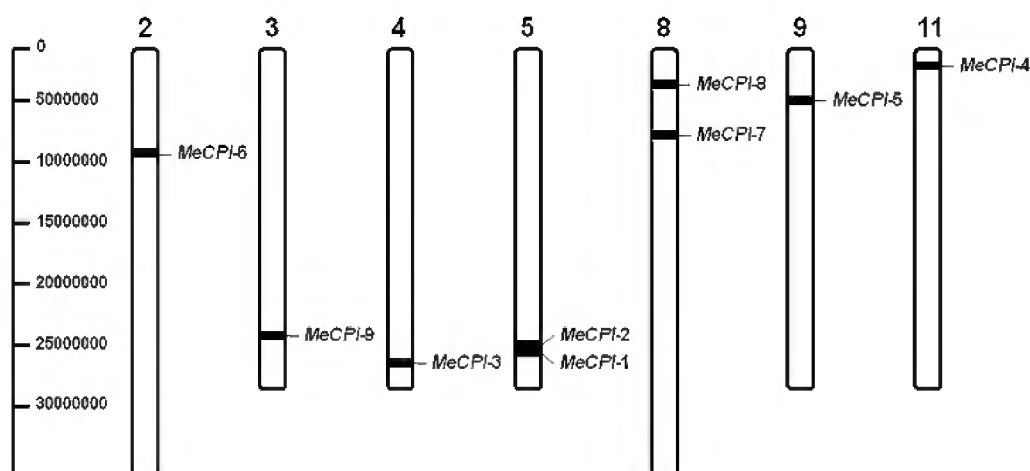
O sequenciamento de genomas completos possibilitou a busca por genes homólogos em diferentes organismos, revelando assim uma grande variedade de genes de cistatinas conservados entre eucariotos e procariotos (MARTINEZ e DIAZ, 2008;). Foram obtidas nove sequências de PhyCys de mandioca no Phytozome. Estas foram denominadas de MeCPI-1 a MeCPI-9 (Tabela 1) de forma aleatória. As nove sequências de fitocistatina mostraram-se distribuídas em sete dos dezoito cromossomos de mandioca (Figura 1). Análises comparativas das sequências de cDNA utilizando o programa mostraram que as sequências obtidas possuem identidade com cistatinas de outras espécies vegetais com proteínas de estruturas já resolvidas e depositadas nos bancos de dados.

Tabela 1 – Nome do gene, *Locus*, Tamanho da sequência genômica em pares de bases (gDNA (bp)), Número de Introns, Número de resíduos de aminoácidos (aa), massa molecular teórica (MM) e ponto isoelétrico (PI), grupo e localização subcelular das isoformas dos genes de fitocistatinas identificadas neste estudo.

Nome do gene	<i>Locus</i>	gDNA (bp)	Número de Intron	Tam. (aa)	MM (kDa)	PI	Grupo	Localização subcelular
<i>MeCPI-1</i>	Manes-05G198500	369	0	122	13.5	5.07	I	Secretada
<i>MeCPI-2</i>	Manes-05G198300	405	0	134	15	9.47	I	Núcleo
<i>MeCPI-3</i>	Manes-04G155400	2077	3	245	27	6.06	II	Cloroplasto
<i>MeCPI-4</i>	Manes-11G008700	1347	3	167	18.3	6.45	II	Outra
<i>MeCPI-5</i>	Manes-09G039400	603	0	111	12.1	9.52	I	Secretada
<i>MeCPI-6</i>	Manes-02G134700	2163	1	101	11.2	5.12	I	Secretada
<i>MeCPI-7</i>	Manes-08G063200	7470	2	195	22.3	7.08	II	Secretada
<i>MeCPI-8</i>	Manes-08G041000	527	0	111	12.6	6.60	I	Secretada
<i>MeCPI-9</i>	Manes-03G153900	702	0	111	12.6	7.9	I	Secretada

O alinhamento das sequências de aminoácidos de sequências de fitocistatinas da mandioca nos permitiu observar a presença dos motivos conservados: um ou dois sítio de glicina (G) na porção N-terminal, um motivo QXVXG no *loop* central e um triptofano (W) na região C-terminal na maioria das sequências. Quanto ao motivo LARFAV, comum a todas as fitocistatinas, se observa substituições relacionadas em todos os aminoácidos, mas sempre se observa a sequência conservada [LVI] - [AGT] - [RKE] - [FY] - [AS] - [VI] (Figura 2).

Figura 1. Localização das sequências de fitocistatinas nos cromossomos da mandioca.



Fonte: Este estudo

Figura 2. Alinhamento das nove seqüências de aminoácidos das fitocistatinas de mandioca. As regiões referentes aos peptídeos sinais estão sublinhadas. A região em amarelo mostra um motivo conservado entre as fitocistatina. As regiões em vermelho mostram os resíduos de aminoácidos conservados no local inibitório. A região conservada entre as legumainas SNSL é mostrado em verde. O intervalo gerado no alinhamento é indicado por traços.

	1					50						100
MeCPI-9	-----	-----	--MKGHRLIF	SFLFFAAVAF	AALVGCWQPI	KDL-KDPNIV	EIGEYAVKEY	NKR-----	ANTDLILVNV	VKGEE	QVVSQ	
MeCPI-8	-----	-----	--MKGHRLIF	SFLFFATVAF	AALAGCQWQPI	KDL-KDPNIV	EIGEYAVKEY	NKR-----	ANTDLILVNV	VKGEE	QVVSQ	
MeCPI-5	-----	-----	--MKPFSLLS	GLLFFAAVGS	AALLGCWKPI	KDL-NDPHIV	EIGKFAVDEY	NQR-----	SKADLKLKVL	EKGEQ	QVVSQ	
MeCPI-7	-----	<u>MVMD</u>	<u>RVSALLLSVL</u>	<u>VLGCGYCFDL</u>	<u>GHGRQLNLLR</u>	<u>MRIPGIPSDC</u>	<u>KGFQNSVEIE</u>	<u>SLARFAVQEH</u>	<u>NKK-----</u>	<u>QNALLEFVRV</u>	<u>LKVKE</u>	<u>QVVSQ</u>
MeCPI-4	-----	-----	-----	-----	-----	MATLGCVRDS	QCAANSVEIN	ALGRFAVDEH	NKK-----	E-----	--AKE	QVVSQ
MeCPI-3	<u>MQRHFPPSSS</u>	<u>SFSSLLFLLS</u>	<u>LVSLSHSFAI</u>	<u>GSSAFCRE-E</u>	<u>MTTLGCVHDS</u>	<u>PDASNTVEID</u>	<u>DLARFAVDEH</u>	<u>NKK-----</u>	<u>QNAVLEFARV</u>	<u>VKAKE</u>	<u>QVVSQ</u>	
MeCPI-6	-----	-----	-----	-----	-----	MATLGCVKEV	EGSANSVEID	NLARFAVDDY	NKK-----	QNALLEFKRV	VSTKQ	QVVSQ
MeCPI-2	-----	-----	MAKV	<u>EQLLLLLLVP</u>	<u>VFLLVSVSAR</u>	<u>GGLLGCQLQPV</u>	<u>EDVKSNOQVQ</u>	<u>ELGRFSITFEF</u>	<u>NKQLLNQANG</u>	<u>G-EELIFSEV</u>	<u>VEAKV</u>	<u>QVVRG</u>
MeCPI-1	-----	-----	MAKV	<u>MLPVLLLLS</u>	<u>AFLLVST---</u>	<u>--IPGCISPV</u>	<u>QDVKNKEVQ</u>	<u>DLGRFCVVEEF</u>	<u>NRQLLQHSNG</u>	<u>GGERLVFSEV</u>	<u>VDALD</u>	<u>QVVSQ</u>
	101					150						200
MeCPI-9	MNYRLILAVT	EGKASKK--Y	QAEVWEKAE	E	NFKNLT-SFE	PVKE-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MeCPI-8	MNYRLILEVT	EGKASKK--Y	QAEVWEKAE	E	NFKNLT-SFE	PVKE-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MeCPI-5	MNYRLILEAK	DGQASKK--Y	QAVVWEKPE	G	KSRNLT-SFV	PVQG-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MeCPI-7	KLYYLTLEAI	DVGHKKW--Y	EAKVWVKPE	T	NFKQLE-EFK	HAESDLS---	---FTPSDLG	VIQDDHGQGW	QVMPTKDTEV	RDAANHAVKF	IQLVTIRTHT	
MeCPI-4	TLHLLTIEAI	EAGKKKL--Y	EANVWVKPE	L	NFKELQ-EFK	HAGDVDA---	---DGPGSW	KEVPAHDPAV	QDAANHAVKT	IQQRSNSLFL		
MeCPI-3	TLHLLTIEAI	EAGKKKL--Y	EAKIWVKPE	L	NFKELQ-EFK	HAGDVDGSAG	APSFTSSDLG	VKRDGHGPGW	KEVPADDPAV	QDAANHAVKI	IHQRSNSLFP	
MeCPI-6	TMYITILEVA	DGGQTKV--Y	EAKVWEKPE	L	NFKELQ-EFK	PIGVAPSDST	A-----	-----	-----	-----	-----	-----
MeCPI-2	IMYYLKIEAT	TKGSQETGIY	DSKVATQPE	L	HQRKLI-RFQ	PSMDLRIRKS	GK-----	-----	-----	-----	-----	-----
MeCPI-1	VKYYLKIAAW	SMENREMAIY	DAQVVSAPAK	K	YETGLLLSFQ	PSVA-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	201					250						
MeCPI-9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MeCPI-8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MeCPI-5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MeCPI-7	-----	---	DPYSKS	QDWHFVVCKA	L-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MeCPI-4	-----	--	VGDDYAKF	NMLLKVKRGS	SEEKFKVEVH	KKNEGTFLLN	QMEPHA	-----	-----	-----	-----	-----
MeCPI-3	YELKEIVCAK	AEVVDEHAKF	DMLLKVKRGT	SEEKYKVEVH	KNNEGSFLLN	QMEPHA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MeCPI-6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MeCPI-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MeCPI-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Fonte: Este estudo

Nas nove sequências proteicas preditas para as fitocistatinas de mandioca, juntamente com os motivos proteicos encontrados, sugere que elas possuem a capacidade de atuar nos processos biológicos, tais como, como reguladores da proteólise durante a maturação e germinação das sementes (LEPELLEY et al., 2012), e /ou durante a morte celular programada (PIROVANI et al., 2010; DIAZ MENDOZA et al., 2014), e/ou contribuir para a defesa das plantas pela inibição de proteases exógenas de insetos, nematódeos, fungos, oomicetos e bactérias (BENCHABANE et al., 2010; WAR et al., 2012; PANDEY et al., 2016; ZUST E AGRAWA; 2017). Já que se observou nas nove sequencias de aminoácidos preditas para as PhyCys de mandioca, uma ou duas Glicina (G) na parte amino-terminal da molécula e o site reativo QxVxG localizado na parte central. Quanto ao triptofano (W) conservado na porção Carboxi-terminal, este está ausente nas MeCPI-4 e MeCPI-5 (Figura 2) e presente nas demais.

O motivo LARFAV apresenta substituições relacionadas em todos os aminoácidos. As alterações observadas no motivo LARFAV-Like das fitocistatinas de mandioca também foram observadas quando se comparou as famílias de genes de *Arabidopsis*, Arroz e cevada (MARTINEZ *et al.*, 2005a). Uma vez que substituições no motivo Larfav-like são comuns e sempre se observa a sequência conservada [LVI] - [AGT] - [RKE] - [FY] - [AS] - [VI] (BENCHABANE et al., 2010).

Ao analisar a possível localização subcelular das predita para as fitocistatinas de mandioca, três isoforma, estão preditas para atuarem no interior da célula, enquanto que as outras seis isoformas, provavelmente são exportadas para fora da célula (Tabela 1.). Indicando assim possível potencial das isoformas exportadas para o meio extracelular estar envolvidas na inibição de proteases secretadas por patógenos e as restritas ao citoplasma desenvolver atividades relacionadas a processos endógenos

Análises das sequências de aminoácidos permitiram predizer a massa molecular e o ponto isoelétrico das sequencias obtidas, e estes variaram de 12 a 26 KDa. A maioria das PhyCys tem uma massa molecular entre 12-16-KDa, porém já foram descritas PhyCys com massa molecular estimada superior como a de soja (26 KDa), morango (26,39 KDa), TcCYS4 de cacao (22,84 KDa) e inhame (29 KDa). A diferença se deve ao fato destas PhyCys possuírem uma extremidade Carboxi-terminal mais longa (MARTINEZ et al., 2005b; PIROVANI et al., 2010).

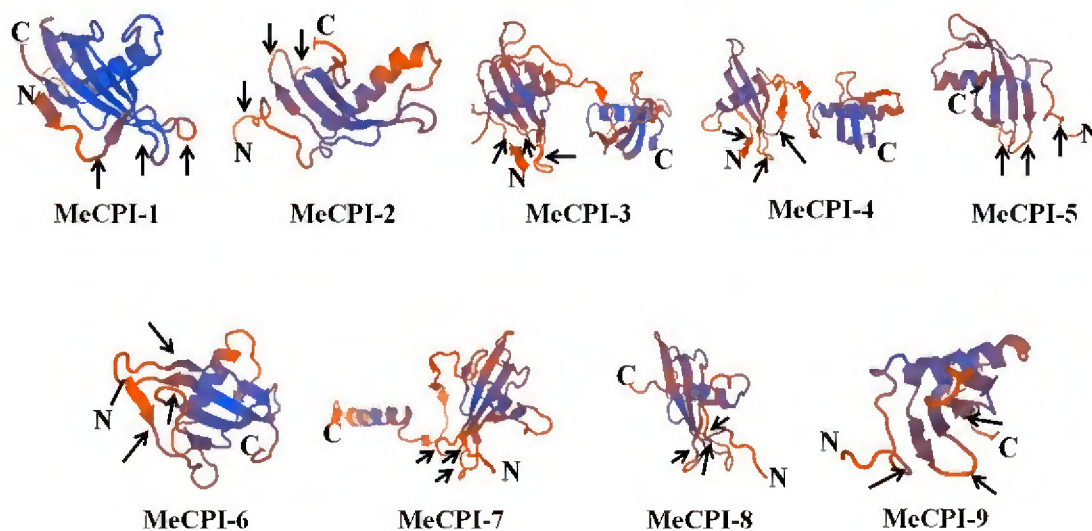
A descoberta de fitocistatinas com sequências maiores levou a uma diferenciação destes genes, os mesmos são conhecidos como fitocistatinas carboxi-

estendidas (MARTÍNEZ *et al.*, 2005b; MARGIS-PINHEIRO *et al.*, 2008). Alguns inibidores carboxi-estendidos possuem dois domínios principais, neste caso, o primeiro deles é o domínio cistatina, localizado na parte amino-terminal da proteína. O segundo domínio, na região carboxi-terminal é um domínio similar a cistatina, mas que de fato, não possui similaridade de sequência com as cistatinas, ao invés disto, em alguns casos ele possui o domínio SNSL conservado (BENCHABANE *et al.*, 2010).

Estudos anteriores propõem que a região carboxi terminal das fitocistatinas do grupo II podem ter possíveis papéis: (1) A região C-terminal de fitocistatina de inhame (CeCPI) mostrou uma baixa capacidade de inibir Papaína (WANG *et al.*, 2008); (2) um domínio SNSL na região C-terminal de uma fitocistatina de cevada (HvCPI-4) mostrou atividade inibitória contra legumaina (MARTINEZ *et al.*, 2007).

A análise de modelagem tridimensional realizada com a fitocistatina carboxi-estendida de mandioca, MeCPI-3 e MeCPI-4, demonstram que a estrutura desta proteína têm duas regiões principais separadas espacialmente em dois lobos, de acordo com os domínios inibitórios preditos (Figura 3.). A extensão carboxi-terminal encontrada nas sequencias MeCPI-3 e MeCPI-4 sugeriu que essas duas proteínas pertencem ao grupo II de fitocistatinas e que estas podem ser um inibidor bifuncional de proteases cisteínicas em mandioca, atuando sobre proteases do tipo papaína (C1A) com a região amino-terminal, e também sobre legumainas (C13) com o domínio carboxi-terminal.

Figura 3. Modelo estrutural das fitocistatina da mandioca. As setas indicam o domínio cistatina, o qual é formado por três motivos proteicos conservados: um resíduo de glicina na região amino-terminal; o motivo QxVxG; e um triptofano (PW) na região carboxi-terminal, sendo que, estes dois últimos motivos estruturais localizam-se no primeiro e segundo *loops* entre as folhas- β da estrutura terciária.



Fonte: Este estudo

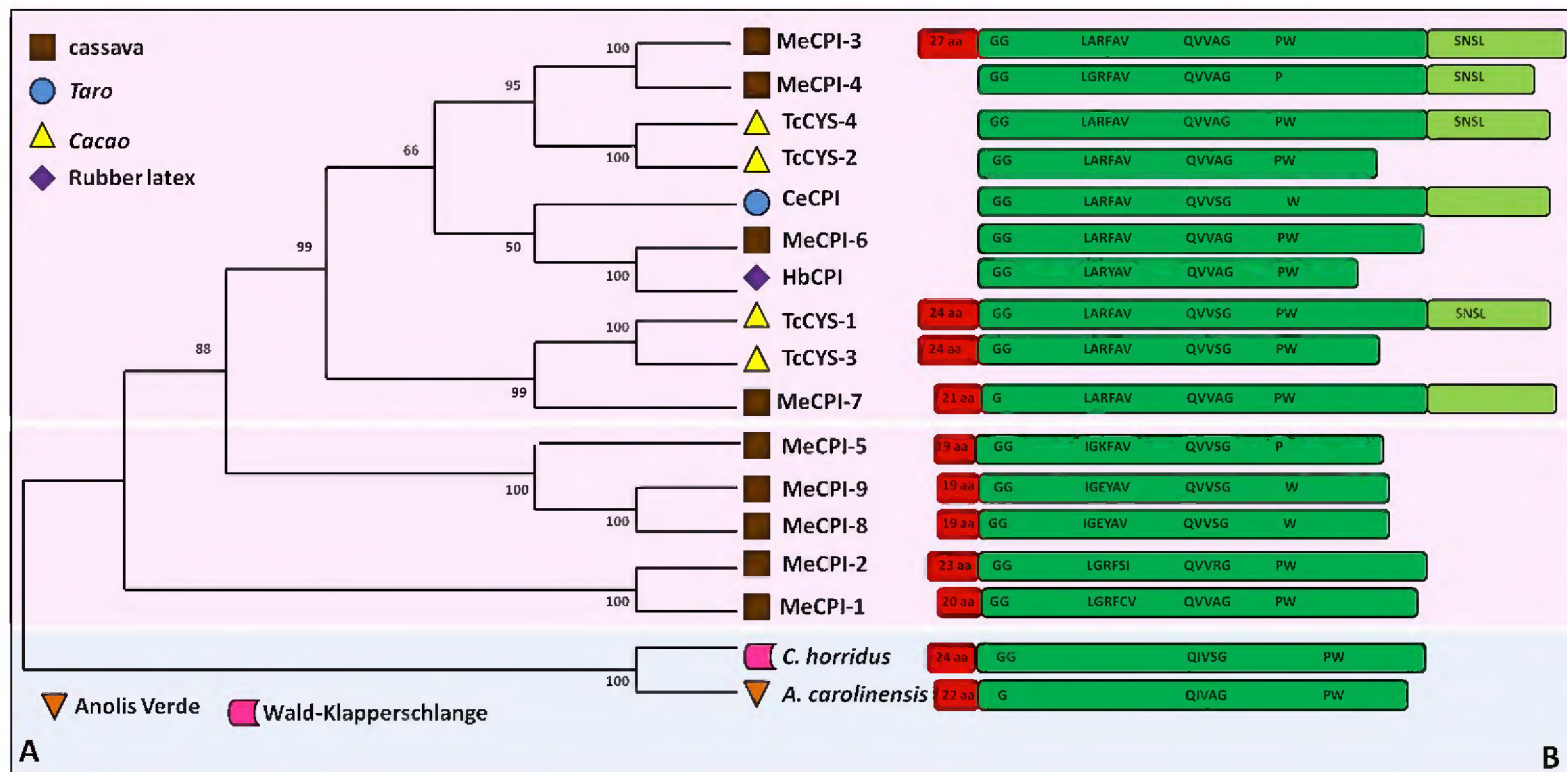
Enquanto que as análises de modelagem tridimensional realizadas com a fitocistatina carboxi-estendida de mandioca, MeCPI-7, demonstram que a estrutura desta proteína têm uma única região, de acordo com os domínios inibitórios preditos (Figura 4.). Esta por sua vez pode ser um inibidor de proteases cisteínicas em mandioca, pertencentes ao grupo II, demonstrando assim potencial para atuar sobre proteases do tipo papaína (C1A). Estrutura similar já foi descrita para uma fitocistatina de inhame (CeCPI) (WANG et al., 2008).

Nas famílias de genes de Fitocistatinas de plantas dicotiledôneas geralmente se observa duas proteínas carboxi-extendidas, conforme encontrado no genoma de *Populus trichocarpa* (MARGIS-PINHEIRO et al., 2008), *Arabidopsis thaliana* (MARTINEZ et al., 2005a), *Theobroma cacao* (PIROVANI et al., 2010) e também no genoma de *Manihot esculenta* neste estudo. Em contrapartida nas monocotiledôneas geralmente se encontra apenas uma proteína carboxi-extendida como observado em *Oryza sativa* e *Hordeum vulgare* (MARTINEZ et al., 2005a).

A análise filogenética permitiu-nos identificar quatro fitocistatinas (Figura 4.) que se agrupam com fitocistatinas de cacão, seringueira e inhame, estas já foram identificadas com potencial para inibir o crescimento de patógenos de plantas *in vitro* (PIROVANI et al., 2010; BANGRAK e CHOTIGEAT, 2011) e *in vivo* (SANTANA et al., 2014), portanto, estas fitocistatinas podem desempenhar papel semelhante. Podendo contribuir para obtenção de acessos resistentes a insetos, ácaros e microrganismos.

Dentre os microrganismos que causa graves prejuízos na mandiocultura no estado do Pará se observa o oomiceto *Phytophythium sp.*, causador da podridão radicular nas raízes de mandioca. Uma fitocistatina de mandioca foi identificada por Reilly et al. (2007) como *down-regulated* em raízes após a colheita em processo de deterioração pós colheita acesso número DT883603 e este mesmo gene teve sua expressão superior em raízes de mandioca infectadas por *Phytophythium sp.* demonstrando potencial no mecanismo de defesa da planta. O gene denominado neste estudo por MeCPI-5 tem 100% de similaridade com o acesso DT883603, sendo este portanto um candidato a estudos que visem identificar o papel deste em inibir o crescimento de patógenos. Fitocistatina isolada de Seringueira já demonstrou ter potencial para inibir *in vitro* o oomiceto *Phytophthora palmivora* (BANGRAK e CHOTIGEAT, 2011), reforçando o potencial das fitocistatinas podem desempenhar sobre o oomiceto *Phytophythium sp.*

Figura 4. Análise filogenética de cistatinas vegetais (destacado em rosa) e animais (destacados em azul). (A) Análises evolutivas foi realizada usando o software *Molecular Evolutionarily Genetics Analysis* (MEGA), versão 7.0 (, usando o método Neighbor-Joining,. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxons associados agrupados no teste *bootstrap* (10000 replicacas) são mostrados ao lado dos ramos. As sequências utilizadas para comparação com as fitocistatinas de *Manihot esculenta* foram: *Anolis carolinensis* (número de acesso - XM_003220026.3), *Crotalus horridus* (número de acesso - GBKC01000883.1), *Theobroma cacao* (TcCYS - Número de Acesso KM361432 ; TcCYS 2 - Número de Acesso KM361433; TcCYS 3 - Número de Acesso KM361434 e TcCYS 4 - Número de Acesso KM361435), *Colocasia esculenta* (CeCPI - Número de Acesso AF525880) e *Hevea brasiliensis* (HbCPI - Número de Acesso FJ850964). (B) Alinhamento esquemático das sequências de aminoácidos deduzidas caixa verde escura destacandoo resíduo G / GG na sequência N-terminal, o motivo semelhante a LARFAV, uma região conservada encontrada em todos os PhyCys, a seqüência QXVXG na parte central e a sequência P / W / PW na extremidade C-terminal . A caixa verde claro representa extremidade C-terminal de PhyCys do grupo 2 e o domínio SNSL está destacado. O peptídeo sinal previsto (SP) é indicado na caixa vermelha.



Fonte: Este estudo

A organização genômica das fitocitatinas de mandioca é bastante variável e está de acordo com o relatado para outras espécies estudadas tais como *Arabidopsis* e arroz. Comparando-se o padrão encontrado neste estudo com cistatinas de outras vegetais observamos que quatro não apresentam íntron, assim como observado em oito sequências de arroz (OC-IV a XI), duas sequências de *Arabidopsis* (AtCYS-4 e AtCYS-5). O padrão observado para as sequências MeCPI-3 e MeCPI-4, com quatro éxons e três íntrons é o mesmo observado para uma proteína de arroz (OC-XII) e duas de *Arabidopsis* (AtCYS-6 e AtCYS-7). O padrão da sequência MeCPI-7 com três éxons e dois íntrons não foi observado em arroz e em *Arabidopsis*. O padrão observado para MeCPI-6 com um intron e dois éxons é o mesmo observado para três proteínas de arroz (OC-I, OC-II e OC-III) e três de *Arabidopsis* (AtCYS-1, AtCYS-2 e AtCYS-3) (MARTINEZ et al., 2005a) (Figura 5). Nas sequências de mandioca que apresentam íntron podemos observar que o primeiro íntron está localizado entre o motivo conservado LARFAV e o sítio ativo QXVXG, e os demais após este sítio, este padrão também foi observado em arroz, *Arabidopsis* e cevada (MARTINEZ, et al., 2005a) morango (MARTINEZ, et al., 2005b) e seringueira (BANGRAK e CHOTIGEAT, 2011).

Figura 5. Organização genômica dos genes de cistatinas de mandioca. Os éxon são indicados pelos boxes e os íntrons pelas linhas. O tamanho dos íntrons estão informados abaixo das linhas em pares de bases (pb). O motivo LARFAV e os três motivos envolvidos na interação com suas proteinases alvo (um G próximo a região N-terminal N, motivo QxVxG no loop central e um W conservado na região C-terminal) são representados nos boxes hachurados e pretos, respectivamente. Também é mostrado o domínio SNSL encontrado na extremidade C-terminal de PhyCys do grupo 2 indicado pelas caixas cinza.

Nome do gene	Predição da estrutura da sequência genômica	Nº de Aminoácidos
<i>MeCPI-1</i>		122
<i>MeCPI-2</i>		134
<i>MeCPI-3</i>		245
<i>MeCPI-4</i>		167
<i>MeCPI-5</i>		111
<i>MeCPI-6</i>		101
<i>MeCPI-7</i>		195
<i>MeCPI-8</i>		111
<i>MeCPI-9</i>		111

Fonte: Este estudo

6.4 Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho nos permite concluir que:

- Família de fitocistatinas da mandioca possui 9 isoforma, nas quais foram possíveis identificar as regiões conservadas características desta família.
- Dos nove genes analisados três possuem localização predita para o interior da célula enquanto seis são provavelmente extracelulares, podendo assim atuar contra proteases de patógeno.
- A análise da estrutura tridimensional preditas para as fitocistatinas de mandioca revelam que duas proteínas podem atuar na inibição de papaína e legumainas e as outras sete possuem apenas atividade inibitória de papaínas.
- A análise da organização genômica permite concluir que cinco sequencias não possuem introns e que quatro possuem e dentre as que possuem o primeiro intron está localizado sempre entre os motivos LARFAV e QxVxG.
- A análise das sequencias indicam que estas podem atuar em diferentes processos celulares, inclusive nos mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos já demonstrado para PnCPI-5, indicando a necessidade de conhecer suas atividades enzimáticas e biológicas.

Referências

- ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H.; SUZUKI, K.; ARAI, S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. **Journal Biological Chemistry**, v. 262, p. 16793 - 16797, 1987.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- BANGRAK, P.; CHOTIGEAT, W. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cystatin from Hevea rubber latex. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 49, p. 244-250, 2011.
- BENCHABANE, M.; SCHLÜTER, U.; VORSTER, J.; GOULET, M. C.; MICHAUD, D. Plant cystatins. **Biochimie**, v. 92, n. 11, p. 1657-1666, 2010.
- BOARI, A. J., QUADROS, A. F. F., CUNHA, E. M., FERNANDES, A. F., & BARRETO, R. W. First report of *Phytophthora* sp. causing storage root rot and foliage blight of cassava in Brazil. *Plant Disease*, <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1449-PDN>, 2018.
- BRIESEMEISTER, S.; BLUM, T.; BRADY, S.; LAM, Y.; KOHLBACHER, O.; SHATKAY, H. SherLoc2: a high-accuracy hybrid method for predicting subcellular localization of proteins. **Journal of proteome research**, v. 8, p. 11, p. 5363-5366, 2009.
- DÍAZ-MENDOZA, M.; VELASCO-ARROYO, B.; GONZALEZ-MELENDE, P.; MARTÍNEZ, M.; DÍAZ, I. C1A cysteine protease–cystatin interactions in leaf senescence. **Journal Experimental. Botany**, v. 65, p. 3825–3833, 2014.
- FOSSUM, K.; WHITAKER, J. R. Ficin and Papain from Chicken Egg White. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 367–375, 1968.
- HUNTER, S.; APWEILER, R.; ATTWOOD, T. K.; BAIROCH, A.; BATEMAN, A.; BINNS, D.; ... FINN, R. D. InterPro: the integrative protein signature database. **Nucleic acids research**, v. 37(suppl_1), D211-D215, 2008.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v.33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- LEPELLEY, M.; AMOR, M. BEM; MARTINEAU, N; CHEMINADE, G.; CAILLET, V.; MCCARTHY, J. Coffee cysteine proteinases and related inhibitors with high expression during grain maturation and germination. **BMC Plant Biology**, v.12, n. 31, 2012.
- LIMA, A. M.; dos REIS, S. P.; de SOUZA, C. R. Phytocystatins and their potential to control plant diseases caused by fungi. **Protein Peptid Letters**, v. 22, n. 2, p. 104-111, 2015.

MARCHLER-BAUER, A.; LU, S.; ANDERSON, J. B.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; DEWEESE-SCOTT, C.; ... GWADZ, M. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic acids research**, v. 39(suppl_1), D225-D229, 2010.

MARGIS-PINHEIRO, M.; ZOLET, A. C. T.; LOSS, G.; PASQUALI, G.; MARGIS, R. Molecular evolution and diversification of plant cysteine proteinase inhibitors: new insights after the poplar genome. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 49, n. 1, p. 349-355, 2008.

MARTINEZ, M.; ABRAHAM, Z.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. Comparative phylogenetic analysis of cystatin gene families from arabidopsis, rice and barley. **Molecular Genetics and Genomics** v. 273, p. 423-432, 2005a.

MARTINEZ, M.; ABRAHAM, Z.; GAMBARDELLA, M.; ECHAIDE, M.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. The strawberry gene *Cyf1* encodes a phytocystatin with antifungal properties. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 1821-1829. 2005b.

MARTINEZ, M.; DIAZ, I. The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, doi: 10.1186/1471-2148-8-198, 2008.

MARTÍNEZ, M.; DIAZ-MENDOZA, M.; CARRILLO, L.; DÍAZ, I. Carboxy terminal extended phytocystatins are bifunctional inhibitors of papain and legumain cysteine proteinases. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2914-2918, 2007.

MARTINEZ, M.; CAMBRA, I.; CARRILLO, L.; DIAZ-MENDOZA, M.; DIAZ, I. Characterization of the entire cystatin gene family in barley and their target cathepsin L-like cysteine-proteases, partners in the hordein mobilization during seed germination. **Plant Physiology**, v. 151, p. 1531-1545, 2009.

NIELSEN, H.; KROGH, A. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. Proc Int Conf Intell Syst. **Molecular Biology**, v. 6, p. 122-130, 1998.

PANDEY, D.; RAJENDRAN, S. R. C. K.; GAUR, M.; SAJEESH, P. K.; KUMAR, A. Plant defense signaling and responses against necrotrophic fungal pathogens. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 4, p. 1159-1174, 2016.

PIROVANI, C.P.; SANTIAGO, A.S.; SANTOS, L.S.; MICHELI, F.; MARGIS, R.; GESTEIRA, A.S.; ALVIM, F.C.; PEREIRA, G.A.G.; CASCARDO, J.C.M. *Theobroma cacao* cystatins impair *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth and are involved in postponing cell death symptoms. **Planta**, v. 232, p. 1485-1497, 2010.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J.; FINN, R.D.; Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 44, D343-D350, 2016.

REILLY, K.; BERNAL, D.; CORTÉS, D. F.; GÓMEZ-VÁSQUEZ, R.; TOHME, J.; BEECHING, J. R. Towards identifying the full set of genes expressed during cassava post-harvest physiological deterioration. **Plant Molecular Biology**, v. 64, p. 187-203, 2007.

ROMBEL, I. T.; SYKES, K. F.; RAYNER, S.; JOHNSTON, S. A. ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification. **Gene**, v. 282, n. 1, p. 33-41, 2002.

SANTANA, L. S.; COSTA, M.; PIROVANI, N. M.; ALMEIDA, A. F.; ALVIM, F. C.; PIROVANI, C. P. TcCYS4, a cystatin from cocoa, reduces necrosis triggered by MpNEP2 in tobacco plants. **Genetic Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 7636-48, 2014.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

WANG, K. M.; KUMAR, S.; CHENG, Y. S.; VENKATAGIRI, S.; YANG, A. H.; YEH, K. W. Characterization of inhibitory mechanism and antifungal activity between group- 1 and group- 2 phytocystatins from taro (*Colocasia esculenta*). **The FEBS journal**, v. 275, n. 20, p. 4980-4989, 2008.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M.G.; BUHROO, A. A.; AHMAD, T.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signal Behav** v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012.

ZUST, T.; AGRAWAL, A. A. Trade-Offs Between Plant Growth and Defense Against Insect Herbivory: An Emerging Mechanistic Synthesis. **Annual Review Plant Biology**, v. 68, p. 10.1-10.22, 2017.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G. SILVA, M. S. Caracterização molecular de acessos de mandioca biofortificados com potencial de uso no melhoramento genético. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 457-463, 2011.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste trabalho nos permite concluir que:

- Foi possível identificar nove genes na literatura de proteínas efectoras potencialmente envolvidas na resposta de *Manihot esculenta* Crantz ao patógeno *Phytophthora sp.* Dos nove genes identificados sete tem potencial para contribuir no melhoramento genético de mandioca para no futuro se obter acessos resistentes.
- A revisão da literatura indica que as Fitocistatinas possuem potencial no controle de doenças de plantas causadas por fungos.
- A família de fitocistatinas de mandioca possuem nove isoformas, distribuídas em 7 cromossomos e todas as sequencias identificadas possuem as regiões conservadas características desta família. Destacando o potencial delas no controle de doenças tais como na resposta da mandioca ao patógeno *Phytophthora sp.*
- O método de propagação rápida da mandioca foi adaptado as condições de Belém e permitiu obter mudas em quantidade e qualidade suficiente para realizar estudos que visem elucidar os mecanismos de resposta da mandioca ao patógeno *Phytophthora sp.*
- A inoculação utilizando solo infestado com areia e fubá foi eficiente para reproduzir em condições controlada o ataque do patógeno *Phytophthora sp.* em raízes de mandioca tuberosas, não se observando sintomas em raízes adventícias.

ANEXOS

ANEXO I

ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO

**MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A CASSAVA
TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN GENE POTENTIALLY
RELATED TO SALT STRESS RESPONSE**

Molecular cloning and characterization of a cassava translationally controlled tumor protein gene potentially related to salt stress response

Ailton Borges Santa Brígida · Sávio Pinho dos Reis ·
Carinne de Nazaré Monteiro Costa · Cristina Michiko Yokoyama Cardoso ·
Aline Medeiros Lima · Cláudia Regina Batista de Souza

Received: 6 January 2013 / Accepted: 3 January 2014 / Published online: 12 January 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the most important tropical crops showing tolerance to abiotic stress and adaptations to a wide range of environmental conditions. Here, we aimed to isolate and characterize the full-length cDNA and genomic sequences of a cassava translationally controlled tumor protein gene (MeTCTP), and evaluate its potential role in response to salt stress. The MeTCTP full-length cDNA sequence encodes for a deduced protein with 168 amino acid residues, with theoretical isoelectric point and molecular weight of 4.53 and 19 kDa, respectively, containing two putative signatures of TCTP family and one site for myristoylation. The MeTCTP genomic sequence includes four introns and five exons within a 1,643 bp coding region, and a 264 bp partial promoter sequence containing several putative *cis*-acting regulatory elements, among them, two putative GT-1 motifs, which may be related to response to sodium chloride (NaCl) and pathogen infection. Semi-quantitative RT-PCR assays showed that MeTCTP transcripts were higher in roots than leaves, and were significantly increased in detached leaves treated with NaCl. Furthermore, the recombinant MeTCTP conferred a protective function against salt stress in bacterial cells. We report for the first time the molecular cloning and characterization of a cassava TCTP with potential role in salt-stress response. Since salinity is one the most important

abiotic factors affecting the production of crops worldwide, the MeTCTP gene could be a candidate gene for generation of salt tolerant crops.

Keywords Cassava · TCTP · Abiotic stress · Salt stress response · Gene expression · Heterologous expression in bacteria · Semi-quantitative RT-PCR

Introduction

Translationally controlled tumor protein (TCTP) was firstly described as a protein related to growth in many tumoral cells, when their mRNAs are stored as mRNA/protein complexes translationally inactive-mRNP [1].

Despite TCTP was firstly identified in mouse sarcoma ascites cells [1], it is not a tumor-specific protein, being also found in normal cells and widely expressed in eukaryotes [2–6]. Also, it is known that TCTP expression is regulated at both the transcriptional and translational levels [4, 7]. Nevertheless, there is no description of this gene in prokaryotes [8].

Most studies have reported that TCTP is related to proliferation and growth cell, since it is found to be highly expressed in proliferating and physiologically active tissues [3, 9, 10]. TCTP is a key component of the TOR signaling pathway (target of rapamycin), an important growth regulator in animals, fungi and plants [11–13]. Studies show that among the molecular functions of TCTP, it is a calcium-binding protein [7, 14] and also a tubulin-binding protein that associates with microtubules [15].

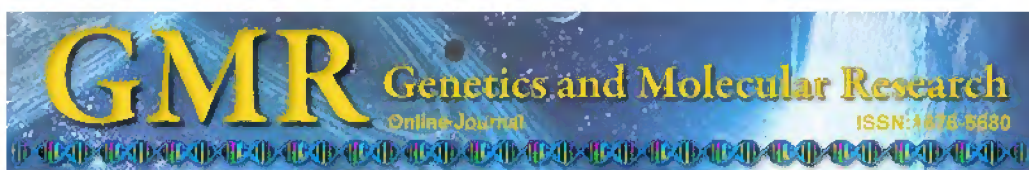
There are few studies reported in plant TCTPs in comparison to animal TCTPs. Some authors have reported changes in TCTP transcript or protein levels under various environmental conditions, such as darkness [16], toxic aluminum stress [17], water deficit and salinity [18, 19],

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11033-014-3028-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. B. Santa Brígida · S. P. dos Reis · C. de Nazaré Monteiro Costa · C. M. Y. Cardoso · A. M. Lima · C. R. B. de Souza (✉)
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará,
Guamá, Belém, PA 66075-110, Brazil
e-mail: bsouza@ufpa.br

ANEXO II**ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO**

ENDOPHYTIC BACTERIA FROM *Piper tuberculatum* Jacq.: ISOLATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION, AND *IN VITRO* SCREENING FOR THE CONTROL OF *Fusarium solani* f. sp *piperis*, THE CAUSAL AGENT OF ROOT ROT DISEASE IN BLACK PEPPER (*Piper nigrum* L.).



Endophytic bacteria from *Piper tuberculatum* Jacq.: isolation, molecular characterization, and *in vitro* screening for the control of *Fusarium solani* f. sp *piperis*, the causal agent of root rot disease in black pepper (*Piper nigrum* L.)

S.B. Nascimento¹, A.M. Lima^{1,2,3}, B.N. Borges⁴ and C.R.B. de Souza¹

¹Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, PA, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil

⁴Instituto Socioambiental e dos Recursos Hídricos, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil

Corresponding author: C.R.B. de Souza

E-mail: bsouza@ufpa.br

Genet. Mol. Res. 14 (3): 7567-7577 (2015)

Received April 1, 2015

Accepted May 26, 2015

Published July 3, 2015

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.July.3.32>

ABSTRACT. Endophytic bacteria have been found to colonize internal tissues in many different plants, where they can have several beneficial effects, including defense against pathogens. In this study, we aimed to identify endophytic bacteria associated with roots of the tropical piperaceae *Piper tuberculatum*, which is known for its

ANEXO III

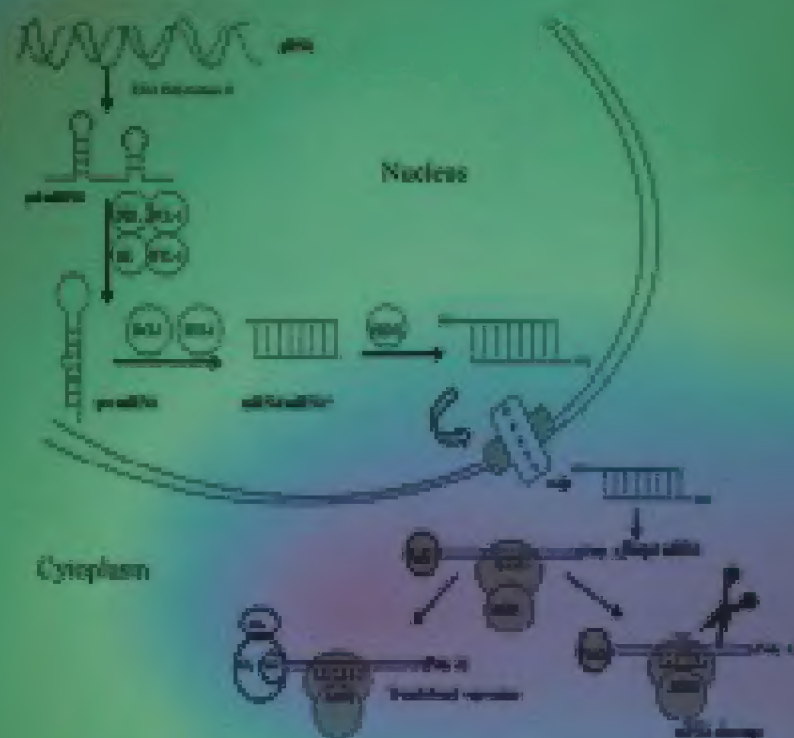
CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO

GENES REGULATED IN PLANTS UNDER SALT STRESS

Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress

Editors

R.K. Gaur and Pradeep Sharma



CRC Press
Taylor & Francis Group

A SCIENCE PUBLISHERS GROUP

Genes Regulated in Plants under Salt Stress

Sávio Pinho dos Reis, Aline Medeiros Lima and Cláudia
Regina Batista de Souza*

ABSTRACT

Environmental stress factors negatively influence crop yield; one among them is salinity. Plant adaptation to these conditions involves the regulation of specific genes. Zinc finger protein, late embryogenesis abundant protein and translationally controlled tumor protein are some of the salt-tolerance-related genes strongly regulated in these conditions. The use of molecular biology approaches such as genetic engineering helps us to develop plants with enhanced tolerance to salt stress. Thus, in this chapter, we describe the proteins that can play important roles in saline stress response in various plant species and discuss how their respective genes are regulated under this kind of stress. Also, an overview of research activities related to these genes is given. Finally, due to the large number of genes involved in this context, some others are also presented here.

Key words: Salinity; Gene Regulation; Saline Stress Response

Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Guamá, Belém, PA 66075-110, Brazil.

Emails: saviopr@yahoo.com; alinemedeiros14@hotmail.com

* Corresponding author: bsouza@uipa.br

Introduction

Salinity is one of the major obstacles to increasing crop productivity. Some of the most severe problems in soil salinity occur in arid and semiarid regions of the world. Besides these regions, salinity also affects agriculture in coastal regions and areas affected by low-quality irrigation water (Walia et al. 2006).

For many years researchers discussed what possible factors are induced after the onset of drought, salinity and temperature changes, based on physiological evidence. There are controversies regarding the number of genes associated with these stresses and the speed they could be induced after the perception of stress. At the level of the genome and transcriptome, the first evidence came from studies by Seki et al. (2002) with *Arabidopsis thaliana* model plant. They monitor the expression of 7000 genes of individuals from *A. thaliana* subjected to drought, salinity and cold in separate experiments, reporting that high levels of these stresses increased expression (more than five times compared to non-stressed controls) of 277, 194 and 53 genes, respectively, with a large number of genes shared between different types of stress (Fig. 1).

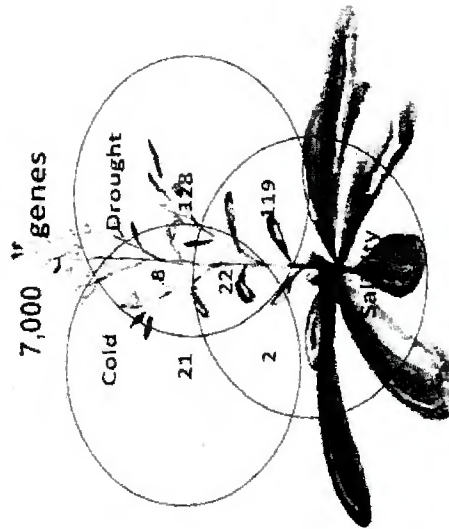


Figure 1. Classification of the drought, cold or high-salinity stress inducible genes identified on the basis of microarray analyses. In total, 277 drought-inducible, 53 cold-inducible and 194 high-salinity stress-inducible genes were identified by cDNA microarray analysis. Adapted from Seki et al. (2002).

ANEXO IV

CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO

**ADVANCES IN MOLECULAR CLONING DIRECTING THE PRODUCTION
OF PLANT PROTEINS AND THEIR APPLICATIONS IN PATHOGENS
CONTROL**

In: *Advances in Genetics Research*, Volume 11
Editor: Kevin V. Urbano

ISBN: 978-1-62948-744-1
© 2014 Nova Science Publishers, Inc.

The license for this PDF is unlimited except that no part of this digital document may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted commercially in any form or by any means. The publisher has taken reasonable care in the preparation of this digital document, but makes no expressed or implied warranty of any kind and assumes no responsibility for any errors or omissions. No liability is assumed for incidental or consequential damages in connection with or arising out of information contained herein. This digital document is sold with the clear understanding that the publisher is not engaged in rendering legal, medical or any other professional services.

Chapter 3

Advances in Molecular Cloning Directing the Production of Plant Proteins and their Applications in Pathogens Control

*Liliane Souza Conceição Tavares, Sávio Pinho dos Reis,
Diehgo Tuloza da Silva, Aline Medeiros Lima
and Cláudia Regina Batista de Souza**

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brazil

Abstract

Plants are frequently exposed to adverse conditions that affects the crop production, mainly when are submitted to pathogens attack such as virus, bacterial or fungal. Like animals, plants have an innate immunity system composed by two defense layers at cellular and molecular level against pathogens attack. The first layer of the immune system is composed by extracellular surface receptors. These are transmembrane receptors or pattern recognition receptors (PRR's) that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). When the pathogens overcome the first layer, the second layer is activated, composed by genes that encode resistance proteins which recognize highly variable pathogen molecules called avirulence (Avr) effectors. Other molecules involved in defense against pathogen are vegetable proteins, such as lectins, peroxidases and Pathogenesis-Related proteins (PRs). All these biomolecules are of great biotechnological interest in plants breeding program. The molecular cloning allows us to study them deeply, by providing pure samples of genes that can be expressed later. It is possible due to rapid growth of bacterial, producing large amounts of identical DNA fragments which alone have no capacity to reproduce themselves. Once a gene has been cloned there is a lot of information that can be obtained about the structure and the expression of that gene. The popularization of cloned fragments has stimulated the improvement of methods for studying genes, with new approaches being used along the

* Corresponding author: bsouza@ufpa.br.

ANEXO V

CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO

**PLANT MOLECULAR ADAPTATIONS AND STRATEGIES UNDER
DROUGHT STRESS**

Chapter 4

Plant Molecular Adaptations and Strategies Under Drought Stress

Sávio Pinho dos Reis, Deyvid Novaes Marques, Aline Medeiros Lima
and Cláudia Regina Batista de Souza

4.1 Introduction

Growth and development of plants can be significantly influenced by several environmental factors. Among them, drought is one of the main abiotic factors limiting the productivity of crops. Furthermore, as an aggravate aspect, drought is increasingly growing in dimension of severity in many regions of the world [1]. Thus, the development of crops tolerant to drought will be significantly advantageous in regions where such stress frequently occurs.

Stress is an altered physiological condition caused by factors that tend to disrupt the equilibrium of an organism. In plants, the water deficit caused by drought reduces growth and development, arising from the reduction of water content, diminished leaf water potential and turgor loss, closure of stomata, and decrease in cell enlargement and growth (Fig. 4.1a) [2]. Other effects of drought that limit plant growth and crop productivity include the reduction of photosynthesis, osmotic stress-imposed constraints on plant processes, and interference with nutrient availability as the soil dries [3].

S.P. dos Reis · D.N. Marques · A.M. Lima · C.R.B. de Souza (✉)
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará,
Belém, PA 66075-110, Brazil
e-mail: bsouza@ufpa.br

S.P. dos Reis
Universidade do Estado do Pará, Marabá, PA 68503-120, Brazil

D.N. Marques
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular,
Universidade Federal do Pará, Belém, PA 66075-110, Brazil

A.M. Lima
Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal
Rural da Amazônia, Belém, PA 66077-530, Brazil

© Springer International Publishing Switzerland 2016
M.A. Hossain et al. (eds.), *Drought Stress Tolerance in Plants*, Vol 2,
DOI 10.1007/978-3-319-32423-4_4

91