



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA- PGAGRO

DAIHANY MORAES CALLEGARI

**EXPRESSÃO DE GENES DE CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE DA
MANDIOCA DURANTE INTERAÇÃO COM *Phytophthium* sp.**

BELÉM-PA
2020

DAIHANY MORAES CALLEGARI

**EXPRESSÃO DE GENES DE CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE DA
MANDIOCA DURANTE INTERAÇÃO COM *Phytophthium* sp.**

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

Área de Concentração: Agronomia.

Linha de pesquisa: Produção Vegetal em Sistemas Agrícolas.

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

**BELÉM-PA
2020**

DAIHANY MORAES CALLEGARI

**EXPRESSÃO DE GENES DE CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE DA
MANDIOCA DURANTE INTERAÇÃO COM *Phytophthium* sp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Agronomia. Linha de pesquisa: Produção Vegetal em Sistemas Agrícolas.

DATA DE APROVAÇÃO

Banca Examinadora:

_____ORIENTADORA

**Cláudia Regina Batista de Souza/ Doutora
Universidade Federal do Pará**

_____MEMBRO 1

**Marcelo Murad Magalhães/ Doutor
Embrapa Amazônia Oriental-Belém-PA**

_____MEMBRO 2

**Rafaela Cabral dos Santos da Trindade/ Doutora
Universidade Federal Rural da Amazônia-Paragominas-PA**

_____MEMBRO 3

**Leila Garcês de Araújo/ Doutora
Universidade Federal de Goiás- Goiânia-GO**

À DEUS, pois sem ele nada sou,
À minha MÃE,
À minha FAMÍLIA e AMIGOS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à DEUS, pois ele me dá forças e me guia todos os dias, mostrando sempre o caminho certo a seguir;

À minha mãe Silvia Calegari por ser essa mulher guerreira que sempre esteve lá quando precisei e me educou para a vida, a ela devo tudo que sou. Ao meu pai Alcidney Callegari, minhas irmãs Denise Fereguetti e Danielly Callegari, ao meu padrasto Paulo César que também sempre me apoiou e fica feliz com minhas conquistas, a minha sobrinha que eu amo muito Bianca e a toda a minha família pelo apoio e por estarem sempre torcendo por mim;

À minha orientadora Prof. Dr^a. Cláudia Regina Batista de Souza por todo o conhecimento passado e pelos incentivos transmitidos durante a realização dessa pesquisa;

À Prof. Dr^a. Aline Medeiros Lima e a Dr^a. Elisa Ferreira Moura pelo fornecimento do material biológico necessário para essa pesquisa;

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular (Labiomol) da UFPA, em especial ao Angelo Cleiton que além de ter sido colaborador no trabalho que gerou o material que foi usado nesse estudo, também sempre esteve pronto a ajudar e compartilhar seus conhecimentos. Ao Danyllo Pingo que também não mediu esforços para ajudar quando precisei. A Nicolle Barros pela parceria, pelas noites e feriados no laboratório e por seus conhecimentos passados, que foram de grande valia. E também Francinilson, Ligia e Solange que me ajudaram desde minha chegada e me passaram seus conhecimentos, sou muito grata por isso;

Aos meus companheiros da UFRA, em especial Pêola Souza, Adriano Moura, Rafael Rodrigo, Vivian Costa, José Ailton, Daynara Vieira e outros que fizeram essa jornada ser mais leve.

Agradeço ao Dalvan Azevedo e a Leinara Onça que sempre me apoiaram e me deram forças quando precisei;

Agradeço também a UFPA pela infraestrutura fornecida através do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas. A UFRA em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia e aos órgãos financiadores dessa pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq / Brasil), Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA).

A todos que colaboraram para a realização desta pesquisa, obrigada!

*“É melhor tentar, que preocupar-se e ver a vida passar. É
melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo
nada até o final”.*

Martin Luther King

RESUMO

A cultura da mandioca possui grande importância mundial abastecendo cerca de 800 milhões de pessoas no mundo. No Brasil, o estado do Pará se destaca na produção desta cultura, a qual é cultivada principalmente por agricultores familiares o que garante a sua subsistência por meio da comercialização e consumo dos seus derivados. No entanto, patógenos como o oomiceto *Phytophthora* sp. causador da podridão mole das raízes pode comprometer em até 100% a sua produção. Buscando entender a interação entre o *Phytophthora* sp. e a mandioca e os mecanismos envolvidos na resposta a nível molecular nesta interação, o objetivo desta pesquisa foi analisar as alterações nos níveis de expressão dos genes da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em raízes destacadas de mandioca suscetíveis a infecção. Desta forma, neste trabalho, inicialmente foi realizada a busca por sequências de genes da CAT e da SOD no genoma da mandioca disponível do Banco de Dados do *Phytozome*, o que resultou em 7 genes da CAT e 9 da SOD. Destes, foram selecionados 4 genes da CAT e 5 da SOD, para os quais foram determinadas as sequências de iniciadores (*primers*) sintetizados. Em seguida, foram realizados ensaios de RT-PCR semi-quantitativa para avaliar os níveis de expressão destes genes em raízes destacadas de mandioca infectadas com *Phytophthora* sp. em comparação com o controle (raízes não infectadas). Foram observadas diferenças significativas tanto entre os tratamentos quanto no decorrer do tempo para cada tratamento, sendo as maiores expressões dos genes da SOD e da CAT no tempo de 48 hpi para o tratamento inoculado. Os resultados demonstram que a interação planta-patógeno aumentou a expressão dos genes estudados, podendo estes estarem envolvidos no mecanismo de defesa da planta, no entanto, estudos de análise funcional destes ainda precisam ser mais aprofundados, principalmente usando ensaios de superexpressão e perda de funções.

Palavras-chave: *Manihot esculenta*. Podridão mole. RNA total. Interação planta-patógeno.

ABSTRACT

Cassava culture is of great importance worldwide, supplying around 800 million people in the world. In Brazil, the state of Pará stands out in the production of this culture, which is mainly cultivated by family farmers, which guaranteed their subsistence through the marketing and consumption of their derivatives. However, pathogens such as the oomycete *Phytophthora* sp. cause of soft root rot can compromise its production by up to 100%. Seeking to understand the interaction between *Phytophthora* sp. and cassava and the mechanisms involved in the response at the molecular level in this interaction, the aim of this research was to analyze changes in the levels of expression of the catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) genes in detached cassava roots susceptible to infection. Thus, in this work, the search for CAT and SOD gene sequences was initially carried out in the cassava genome available from the *Phytozome* Database, which resulted in 7 CAT and 9 SOD genes. Of these, 4 CAT and 5 SOD genes were selected, for which the sequences of synthesized primers were determined. Then, semi-quantitative RT-PCR assays were performed to evaluate the levels of expression of these genes in detached cassava roots infected with *Phytophthora* sp. compared to the control (uninfected roots). Differences were observed between the treatment time intervals for each treatment, the largest being the SOD and CAT genes in the 48 hpi period for the inoculated treatment. The results demonstrate that the plant-pathogen interaction increased the expression of the studied genes, which may be involved in the plant's defense mechanism, however, studies of functional analysis of these still need to be further investigated, mainly using over expression and loss of function tests.

Keywords: *Manihot esculenta*. Root soft rot. RNA total. Plant-pathogen interaction

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Placa de Petri contendo a colônia de *Phytophthium* sp. em meio de cultura BDA (4 dpi) (A); Oogônio do *Phytophthium* sp.(B)..... 18
- Figura 2** - Planta de mandioca apresentando folhas amareladas, murchas e secas (A); Raiz de mandioca com apodrecimento (B)..... 19
- Figura 3** – Perfil eletroforético, em gel de agarose (1,5% m/v) corado com brometo de etídio, dos RNAs totais extraídos das raízes destacadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). As bandas correspondentes às subunidades 28S e 18S do RNA ribossômico estão representadas com setas. Os números representam: (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. 38
- Figura 4** – Perfil eletroforético, em gel de agarose (1,5% m/v), dos cDNAs da amostra controle resultantes da amplificação, por RT-PCR, utilizando os iniciadores desenhados para este estudo (Tabela 1). Corrida: 70 mAmp/gel, por 30 min. Revelação das bandas: brometo de etídio. As bandas foram visualizadas por exposição do gel à luz UV, sendo fotografadas. 43
- Figura 5** - Análise da expressão gênica da mandioca durante a interação com *Phytophthium* sp. através de ensaios de RT-PCR semi-quantitativa. Para cada gene da SOD, são mostrados valores de nível relativo nas raízes destacadas não inoculadas (controle) e inoculadas nas 24, 48 e 72 hpi. O gene da tubulina de mandioca (*MeTUB*) foi utilizado como controle constitutivo. As intensidades relativas dos produtos de RT-PCR corados com brometo de etídio foram medidas por *ImageJ* e normalizadas contra os valores de tubulina. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (controle e inoculado). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos para cada tratamento. A comparação das médias foi feita por meio do teste de Tukey (P<0.01). 47
- Figura 6** - Análise da expressão gênica da mandioca durante a interação com *Phytophthium* sp. através de ensaios de RT-PCR semi-quantitativa. Para cada gene da CAT, são mostrados valores de nível relativo nas raízes destacadas não inoculadas (controle) e inoculadas nas 24, 48 e 72 hpi. O gene da tubulina de mandioca (*MeTUB*) foi utilizado como controle constitutivo. As intensidades relativas dos produtos de RT-PCR corados com brometo de etídio foram medidas por *ImageJ* e normalizadas contra os valores de tubulina. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (controle e inoculado). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos para cada tratamento. A comparação das médias foi feita por meio do teste de Tukey (P<0.01). 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores utilizados em ensaios de RT-PCR semi-quantitativa durante a interação <i>Manihot esculenta</i> Crantz - <i>Phytophthium</i> sp.....	39
Tabela 2 - Caracterização molecular dos genes selecionados para este estudo.....	42
Tabela 3 - Padronização dos genes selecionados para este estudo (Tabela 1) feita com diferentes números de ciclos (25, 28, 31 e 34) em triplicata.....	44

LISTA DE ABREVIACOES

aa- aminoácidos

CAT- Catalase

cDNA – DNA Complementar

DAMPs - padrões moleculares associados a danos

DNA- cido Desoxirribonucleico

EROs- Espécies reativas de oxigênio

HAI- Horas após inoculao

HR- Resposta hipersensível

kDa- kilodalton

MDA- Mandioca-dextrose-gar

Min- minutos

MM- Massa molecular

ORF - *Open Reading Frame*

PAMPs- padrões moleculares associados a patógenos

pb - Pares de bases

PI- Ponto isoelétrico

PRRs- receptores de reconhecimento de padrões

PTI- imunidade desencadeada por PAMP

RNA- cido ribonucleico

RT-PCR – Transcrio Reversa- Reao em Cadeia da Polimerase

SA- cido Salicílico

SAR- resistência sistmica adquirida

SOD- Superóxido dismutase

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 CONTEXTUALIZAÇÃO	12
1.1 Revisão de literatura	14
1.1.1 A cultura da mandioca	14
1.1.2 Podridão radicular das raízes	17
1.1.3 Mecanismo de defesa das plantas	19
1.1.4 Expressão de genes	21
1.1.5 Superóxido dismutase (SOD)	22
1.1.6 Catalase (CAT)	23
REFERÊNCIAS	25
2 NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE GENES DE CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE DA MANDIOCA DURANTE INTERAÇÃO COM <i>Phytophthium</i> sp.	34
2.1 Introdução	34
2.2 Material e métodos	37
2.2.1 Obtenção do RNA total.....	37
2.2.2 Seleção dos genes da Catalase (CAT) e Superóxido dismutase (SOD)	38
2.2.3 Desenho dos iniciadores (<i>primers</i>) para os genes selecionados	39
2.2.4 Tratamento das amostras de RNA total com DNase I.....	39
2.2.5 Transcrição Reversa (RT).....	40
2.2.6 Ensaaios de RT-PCR semi-quantitativa.	40
2.2.7 Quantificação dos dados e análise estatística.....	41
2.3 Resultados e discussão	41
2.3.1 Caracterização dos genes avaliados.....	41
2.3.2 Teste dos iniciadores e padronização dos ciclos para amplificação	43
2.3.3 Expressão diferencial dos genes da SOD e CAT avaliados neste estudo.....	44
2.4 Conclusões	49
REFERÊNCIAS	50

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A mandioca possui elevada importância comercial tanto para o mundo como para o Brasil, sendo cultivada em todas as regiões brasileiras e servindo de fonte de alimentação para humanos e animais, além de ser usada para fins industriais como matéria-prima (FIALHO; VIEIRA, 2013). A produção dessa cultura é amplamente difundida pela agricultura familiar em virtude de suas características peculiares, como a rusticidade e a capacidade de adaptação, podendo ser colhida quase todo o ano, o que possibilitou sua exploração em praticamente todas as regiões brasileiras, sendo, somente a agricultura familiar, responsável por 76% da produção nacional de mandioca (SOUZA et al., 2012). E assim como todos os vegetais, esta espécie, pode ser condicionada a situações de estresse, como por exemplo ao ataque de patógenos.

Dentre as principais doenças que acometem essa cultura, a podridão mole da raiz causada pelo oomiceto *Phytophthium* sp. (BOARI et al., 2018) destaca-se na região Amazônica como um dos principais entraves dessa cultura. As raízes infectadas amolecem e em estágio avançado se desintegram do solo, ocasionando o amarelecimento das folhas, murcha, seca e por fim caem e como consequência ocorre a morte da planta (BOARI et al., 2019).

A infecção pelo oomiceto ocorre principalmente pela propagação assexuada, onde sob condições ambientais favoráveis produz esporângios na superfície dos tecidos infectados, estes são facilmente deslocados pelas águas das chuvas e irrigação. Quando imersos em água, os esporângios liberam zoósporos biflagelados móveis, que nadam em busca de hospedeiros, ao entrar em contato, estes penetram e aderem à superfície da planta, iniciando a infecção (PANG et al., 2017). Dessa forma, o período chuvoso, muito comum entre de dezembro a abril, na região amazônica, contribui para a disseminação do oomiceto.

Os vegetais para se proteger de ataques de patógenos possuem uma ampla matriz de respostas de defesa que diminuem ou interrompem o desenvolvimento da infecção. Esses mecanismos de defesa incluem barreiras físicas e químicas preexistentes que interferem no estabelecimento de patógenos (EL-ARGAWY; ADSS, 2016). Em resposta a qualquer estresse biótico, independentemente do contexto genotípico, as plantas produzem uma explosão oxidativa envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que possuem funções tanto de proteção contra o fitopatógeno quanto de sinalização para ampliar o mecanismo de defesa, o que pode levar a reação de hipersensibilidade localizada (HR), acarretando na morte celular na região da infecção, afim de impedir a rápida proliferação do patógeno no tecido do hospedeiro (BHOSLE et al., 2019; DE SOUZA et al., 2011). A HR induz a planta a ativar o sistema de resistência adquirida (SAR) que confere um amplo espectro de resistência a vários patógenos.

A SAR é tipicamente caracterizada por um alto nível de ácido salicílico (SA), acompanhado pela ativação de proteínas relacionadas à patogênese (PR) com atividade antimicrobiana. Os mecanismos de defesa de uma planta são controlados geneticamente e dependem da expressão de determinados genes no momento certo da relação patógeno-hospedeiro (PIETERSE et al., 2014).

A expressão de um gene é dependente de fatores transcricionais e pós-transcricionais, que estão sujeitos ao grau de desenvolvimento e diferenciação celular, bem como a resposta a estímulos externos. E uma maneira apropriada para identificação desses genes candidatos seria a análise da expressão gênica diferencial (ALBERTS et al., 2010; DE DEUS, 2014). Dentre as diversas técnicas moleculares, a alteração da expressão gênica na cultura de interesse pode contribuir para uma melhor produtividade, assim como para uma maior tolerância aos fatores abióticos e bióticos.

Um exemplo relatado na literatura é a transformação mediada por *Agrobacterium* em calos embriogênicos friáveis (FEC) usado para a geração da mandioca transgênica que permitiu a apresentação de importantes características agrônômicas, como resistência ou tolerância ao vírus do mosaico da mandioca (CMV)(NYABOGA et al., 2013; ZAINUDDIN et al., 2012). Graças aos avanços conquistados na genética, pode-se identificar, selecionar, isolar e transferir genes de interesse para uma grande quantidade de organismos vivos, e isso é essencial para a manipulação de genes específicos, técnica que vem sendo bastante difundida na área de melhoramento de plantas (BUCHER, 2011).

Entretanto, para se chegar ao produto esperado, ou seja, a uma espécie melhorada, uma série de estudos devem ser direcionados visando identificar o gene alvo, para ocorrer a realização da transferência genética, posteriormente estudar o organismo modificado e por fim regulamentar o mesmo (COSTA et al., 2011). Na teoria parece algo fácil, mas quando consideramos uma cultura com notável importância comercial, como por exemplo, a mandioca (*Manihot esculenta* Cranz), que possui uma grande quantidade de dados disponíveis, torna-se algo mais complexo a ser estudado.

Trabalhos prévios realizados por Lima et al. (2018) estudaram pela primeira vez a nível molecular a interação da mandioca com o patógeno *Phytophthium* sp. e identificaram possíveis genes alvos que são *up*-regulados durante a infecção, dentre estes, o gene da superóxido dismutase (SOD) que codifica a enzima superóxido dismutase envolvida na explosão oxidativa, que teve sua expressão aumentada nas raízes infectadas em relação ao controle (raiz não infectada), demonstrando assim sua atuação na resposta de defesa dessa planta ao ataque do patógeno. Além desse gene outros genes relacionados a atividade

antioxidante das células já foram descritos na literatura como genes possivelmente envolvidos na resposta de defesa das plantas ao ataque de patógenos, como é o caso da catalase (CAT) (GARCÍA-LIMONES et al. 2002; LU et al., 2017).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas naturalmente nos vegetais, desempenhando funções durante o seu desenvolvimento em atividades fisiológicas e metabólicas, assim como em situações de estresses onde agem como compostos de defesa ou moléculas sinalizadoras, aumentando significativamente sua produção (RASOOL et al., 2013). Para que atuem como molécula sinalizadora de resposta ao estresse, a síntese e degradação das EROs devem ser sincronicamente reguladas (DE SOUZA et al., 2011; NEILL et al., 2002). Para evitar problemas para a própria célula é necessário um controle de seus níveis que é realizado por meio de compostos antioxidantes, como é o caso da SOD e CAT. Com isso, para o melhor entendimento de como a planta responde aos mecanismos oxidantes da célula, trabalhos que estudam a expressão de diferentes genes de SOD e CAT são essenciais (LU et al., 2017), pois podem elucidar o perfil da resposta da planta ao estresse, a qual pode ser imediata ou tardia.

Diante disso, o conhecimento sobre os mecanismos oxidativos nas plantas pode contribuir para o desenvolvimento de plantas mais bem adaptadas ao meio ambiente e resistentes a patógenos (CAVERZAN et al., 2016). O estudo da expressão gênica dessas enzimas pode direcionar a pesquisa de interação *Phytophthium* sp. e mandioca e possibilitar o entendimento do mecanismo de tolerância desta planta. Deste modo, para o melhor entendimento dessa interação planta-patógeno, o isolamento e a caracterização de sequências gênicas expressas em resposta à infecção são essenciais, assim como a identificação de genes envolvidos na defesa da planta contra os patógenos.

Assim, essa pesquisa tem como hipótese que genes da catalase e superóxido dismutase tem seus níveis de expressão aumentados em plantas de mandioca quando estas estão expostas a infecção do patógeno *Phytophthium* sp., causador da podridão mole das raízes. Portanto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar as variações nos níveis de expressão de genes de catalase e superóxido dismutase da mandioca em resposta a infecção pelo patógeno *Phytophthium* sp. por meio de ensaios de RT-PCR semi-quantitativa.

1.1 Revisão de literatura

1.1.1 A cultura da mandioca

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, pertencente à família das euforbiáceas é originária da América Latina, podendo ser encontrada na forma nativa em países do continente

Americano, Africano e Asiático (SILVA et al., 2014; SOUZA, 2017). Trata-se de uma espécie de fácil cultivo, boa adaptabilidade, tolerância a seca e apresenta rendimento satisfatório em solos de baixa fertilidade (FERNANDES, 2015). Devido ser um alimento rico em carboidratos, é considerada um dos principais alimentos energéticos abastecendo cerca de 800 milhões de pessoas no mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, onde é cultivada em pequenas áreas (HOWELER et al., 2013; SOUZA et al., 2012).

Botanicamente esta espécie é considerada um arbusto herbáceo quando jovem e sublenhoso na idade adulta, com um caule ramificado próximo à base, contendo botões axilares que permitem a propagação vegetativa (FERNANDES et al., 2019). Essa propagação pode ocorrer tanto por semente quanto por estaca (manivas), sendo esta última a mais empregada comercialmente, enquanto que por semente é utilizada para programas de melhoramento genético (ALVES, 2002; FAKUDA; CARVALHO, 2006; PROCHNIK et al., 2012).

Suas raízes são primárias e secundárias, caracterizada pela formação das raízes tuberosas onde há a acumulação de amido. O caule apresenta altura de um a três metros variando de acordo com a cultivar, fertilidade do solo ou a época de plantio. As folhas são simples, lobadas ou palmadas e com pecíolo longo de 9 a 20 cm de comprimento, inseridas no caule com filotaxia espiralada. O formato das folhas varia e a coloração também, que pode ser verde claro, verde escuro até roxo, com três a nove lóbulos por folha. Além disso, a espécie é considerada uma planta monoica, pois suas flores femininas e masculinas encontram-se na mesma planta (TAKAHASHI et al., 2002).

Em relação a variedade, existem cerca de sete mil variedades de mandioca, e por ser uma planta considerada cianogênica, ou seja, tem capacidade de sintetizar e armazenar glicosídeos cianogênicos nos tecidos das raízes o que pode causar toxidez para os animais e para os seres humanos (SANTANA, 2014), são classificadas como “brava”, quando possui concentração muito alta, amarga, imprópria para o consumo de mesa, necessitando desta forma de processamento para transformá-la em seus derivados (farinha ou fécula) e a “mansa”, própria ao consumo humano, com pouco processamento (COÊLHO, 2018).

A parte mais comumente usada da mandioca é a raiz, rica em carboidratos, cerca de 20 a 30% da matéria seca. As folhas de mandioca também podem ser consumidas e são ricas em proteínas (18 - 40% matéria), minerais, Vitaminas B1, B2, C e carotenos (ALETOR, 2010; FASUYI, 2005; NASSAR; MARQUES, 2006; SEBRAE, 2012). As raízes quando colhidas podem ser consumidas diretamente (*in natura*) como farinha, amido ou cozido, ou, devido a qualidade do seu amido, podem ser utilizadas na indústria em produtos alimentícios, compensados, papel e têxteis, e também como matéria-prima para a produção de adoçantes,

frutose, álcool e etanol combustível. Além disso, as folhas também são partes importantes da planta, fonte de nutrientes e as partes superiores das plantas podem ser fornecidas para alimentação animal (HOWELER et al., 2013; MODESTO JUNIOR; ALVES, 2014).

No aspecto socioeconômico a produção e comercialização da mandioca, são de suma importância para a população, pois gera emprego e renda a milhares de pessoas no Brasil, uma vez que há a necessidade de mão de obra desde a fase de produção da planta, até a comercialização da farinha. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2019), no ano de 2016 esta atividade proporcionou uma receita bruta anual de R\$ 10.008.967,34 ocupando a 10ª posição entre os produtos agropecuários, e no estado do Pará esse valor foi de R\$ 2.871.476,89.

Diante disso, é evidente o crescimento de sua produção, o que são comprovados nos dados disponibilizados pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2019) onde pode ser observado um crescimento progressivo dessa cultura durante os anos de 2010 e 2015. E de acordo com este mesmo órgão o último levantamento disponibilizado do ano de 2017 destaca o continente africano como líder na produção de mandioca no mundo com cerca de 55,2%, seguido pela Ásia (30,2%) e a América (14,5%). Essa maior concentração na África deve-se a produção da Nigéria que durante anos vem se mantendo como o principal produtor desta cultura com 42 milhões de toneladas produzidas. O Brasil, por sua vez, ocupa o 5º lugar no ranking mundial de produção (FAO, 2019).

No entanto, no continente americano o Brasil ocupa uma posição de destaque representando aproximadamente 70% da produção. Dados do Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística (IBGE, 2020), mostram que a safra de 2019 no mês de dezembro foi de 18,9 milhões de toneladas (T), cultivadas numa área de 1,4 milhões de hectares, destacando-se a região Norte como maior produtor nacional responsável por 7.317,143 T, seguido pela região Sul 4.404,282 T e Nordeste com 3.799,398 T. O estado do Pará destaca-se na região Norte como o maior produtor com a safra no ano de 2019 de 3.919,901 T.

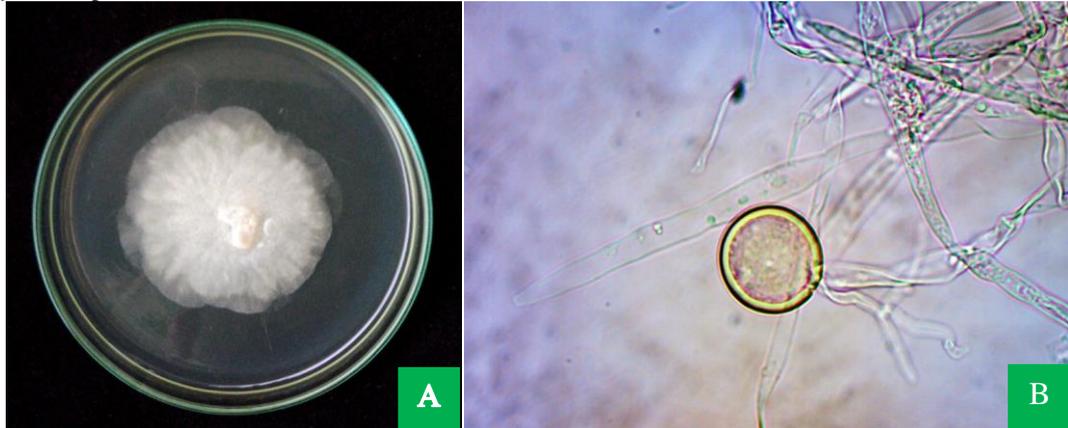
Entretanto, apesar de sua importância econômica e social, a cultura da mandioca vem sofrendo reduções em sua área plantada, essas reduções podem ser atribuídas a diversos fatores que vão desde problemas de mercado até incidência de doenças e pragas (PERUCH et al., 2013). Com este último ponto merecendo destaque, principalmente as doenças que causam podridão nas raízes, afetando deste modo a produção.

1.1.2 Podridão radicular das raízes

Assim como outras culturas, a mandioca pode ser afetada por diversas pragas e doenças causadas por diferentes patógenos, prejudicando deste modo o rendimento da cultura, como é o caso da podridão das raízes da mandioca, que pode afetar até 100% da sua produção (BRITO et al., 2017). Existem três tipos desta podridão conhecidas no Brasil e os sintomas vão de acordo com o agente causal, podendo ser: podridão seca que está associado a espécies do gênero *Fusarium* spp. (por exemplo, *F. solani* e *F. oxysporum*), e é caracterizada pelo aparecimento seco de lesões, geralmente com um halo acastanhado; a podridão negra, que apresenta lesões de cores marrom ou preta, que podem estar associadas ao amolecimento do tecido infectado, os patógenos causadores incluem os do gênero *Neoscytalidium hyalinum* e *Lasiodiplodia* spp.; e a podridão mole causada por espécies do gênero *Phytophthora* spp. e *Pythium* spp., caracterizada por um odor desagradável e o escurecimento dos tecidos afetados com exsudação líquida (BANDYOPADHYAY et al., 2006; MACHADO et al., 2014; VILAS BOAS et al., 2017).

A podridão mole das raízes é a principal doença que afeta a mandioca no Estado do Pará, ocasionando perdas significativas na produção (QUADROS et al., 2015). No Brasil, os primeiros relatos sobre a doença foram realizados por Figueiredo e Albuquerque (1970), estes autores descreveram a espécie *Phytophthora drechsleri* Tucker como o agente causal desta doença. Alguns anos depois, Poltronieri et al. (1997) identificaram também as espécies *Phytophthora richardiae* e *Pythium scleroteichum*. E mais recentemente, Boari et al. (2018) identificaram pela primeira vez o oomiceto *Phytophythium* sp. (Figura 1) como o causador do apodrecimento mole das raízes de mandioca em um plantio no município de Ipixuna do Pará, PA. Os autores isolaram o oomiceto e depois comprovaram a patogenicidade do isolado pela inoculação de raízes sadias do acesso Rosinha.

Figura 1 - Placa de Petri contendo a colônia de *Phytopythium* sp. em meio de cultura BDA (4 dpi) (A); Oogônio do *Phytopythium* sp.(B).



Fonte: BOARI et al. (2019).

O gênero *Phytopythium* pertence ao Reino Chromista, Filo Oomycota, Classe Oomycetes, Ordem Peronosporales e Família *Pythiaceae* (DE COCK et al., 2015). Segundo estes mesmos autores, este nome *Phytopythium* é devido este possuir características morfológicas intermediárias do *Pythium* e *Phytophthora*. Este gênero foi proposto pela primeira vez à comunidade científica em 2008, mas somente foi publicado formalmente em 2010 por Bala et al. (2010), como a espécie tipo *Phytopythium sindhum* A.M. Lodhi, Shahzad & Lévesque. De acordo com esses mesmos autores as espécies de *Phytopythium* apresentam esporângios globosos a ovoides, com papila e proliferação interna, como ocorre dentro do gênero *Phytophthora*, e possuem a descarga de zoósporos semelhante à *Pythium*. O gênero foi descrito após diversos estudos filogenéticos, fundamentados em análises moleculares que distinguiu o táxon anteriormente classificado como pertencente ao clado k do gênero *Pythium* (LÉVESQUE; DE COCK, 2004). Há cerca de 28 espécies registradas no Index Fungorum (2020), sendo algumas delas causadoras de doenças nas plantas como a espécie *Phytopythium helicoides* e *Phytopythium vexans*, já relatadas causando podridão da raiz e podridão do colmo em plantas de Kiwi (*Actinidia chinensis*), demonstrando desse modo sua importância agrônômica (POLAT et al., 2017; WANG et al., 2015).

Na mandioca, plantas infectadas pelo *Phytopythium* sp., provocam a podridão-mole das raízes (Figura 2), levando à total desintegração das raízes com aspecto aquoso, liberando um odor de putrefação muito forte e característico. Nessa fase, as folhas amarelecem, murcham, secam e caem e posteriormente, ocorre a morte da planta (BOARI et al., 2019; TREMACOLDI, 2016).

Figura 2 - Planta de mandioca apresentando folhas amareladas, murchas e secas (A); Raiz de mandioca com apodrecimento (B).



Fonte: BOARI et al. (2019)

Os oomicetos patogênicos de plantas têm características fisiológicas únicas e efeitos devastadores sobre as culturas e os ecossistemas naturais. A infecção por essa espécie pode ocorrer durante os dois estágios (assexual e sexual) do seu ciclo de vida. No estágio assexual, além do crescimento da hifa, os zoósporos móveis uninucleados e biflagelados são formados por clivagem citoplasmática em esporângios. Sob condições de inundação, os zoósporos são liberados e nadam quimiotaticamente em direção aos tecidos do hospedeiro (sementes, raízes, caules ou folhas) onde se depositam e se registram. Na raiz, após se fixarem na superfície, eles se diferenciam em cistos, que subsequentemente germinam e penetram nas raízes. Utilizando nutrientes adquiridos do hospedeiro suscetível, as hifas intracelulares de aseptados ramificam através do tecido da planta, desenvolvendo uma malha de micélio absorvente, a partir do qual ocorre esporulação nas mudas que estão morrendo e o ciclo da doença é repetido. A velocidade da formação assexuada de zoósporos é, portanto, um importante fator para o sucesso desses patógenos que infectam as raízes.

No ciclo sexual, os oósporos de paredes espessas são formados dentro do tecido da raiz e são adaptados para o inverno e a sobrevivência em condições ambientais adversas, podendo estes sobreviverem no solo por até 10 anos como a principal fonte de inóculo. Estes iniciam a germinação durante a estação de crescimento para infectar as plantas, repetindo deste modo o ciclo assexual do patógeno (ATTARD et al., 2008; MOLLAHOSSEIN, 2015; WEST et al., 2003).

1.1.3 Mecanismo de defesa das plantas

As plantas, por serem organismos sésseis, ou seja, fixas possuem mecanismos capazes de protegê-las durante o ataque do patógeno. Esses mecanismos de defesa permanecem inativos ou latentes até serem ativados após a exposição e / ou contato com agentes indutores (DE WIT,

2007; MANDAL, 2010). A interação planta-patógeno é dividida em dois tipos basicamente: compatível, que ocorre quando a infecção é bem-sucedida acarretando à doença; e incompatível, quando no caso a defesa da planta é bem-sucedida, ou seja, quando ocorre a resistência (GLAZEBROOK, 2005). Essa capacidade de defesa ou imunidade são conhecidos como resistência basal, um termo que se refere a dois aspectos distintos da interação planta-patógeno, onde o primeiro aspecto consiste em a defesas constitutivas, que compreendem a primeira linha de defesa imunológica e incluem barreiras físico-químicas, como camadas cuticulares cerosas, parede celular e compostos antimicrobianos oriundos do metabolismo secundário do vegetal (ANDERSON et al., 2010; DOUGHARI, 2015; FREEMAN; BEATTIE, 2008).

E o outro mecanismo está relacionado a defesa induzida, que começa quando o patógeno consegue penetrar a parede celular, o que faz com que o sistema imunológico inato do vegetal de dois níveis seja ativado para combater a invasão de patógenos. O primeiro nível do sistema imunológico da planta é a imunidade desencadeada por padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (PTI), onde os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) da membrana celular detectam PAMPs e as quinases associadas a parede celular (WAKs) detectam os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) resultantes de danos celulares durante a infecção. O segundo nível é a imunidade desencadeada por efetores (ETI), que é acionada por efetores de patógenos e ativa genes de resistência do hospedeiro que geralmente resultam na resposta hipersensível (HR) mediada por sinalização com ácido salicílico (SA) (ANDERSEN et al., 2018; JONES; DANGL, 2006; SANTOS et al., 2017; ZHANG et al., 2013).

A HR é caracterizada pela morte celular no local da infecção, isso estabelece uma zona de quarentena ao patógeno, privando-o de acessar água e nutrientes e enviando sinais para partes distais da planta, que por sua vez podem ativar as defesas para ataques subsequentes (FREEMAN; BEATTIE, 2008; SALGUERO-LINARES; COLL, 2019). Esse tipo de resposta é, muitas vezes, precedido pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As células vizinhas do local de infecção sintetizam uma diversidade de compostos tóxicos formados pela redução do oxigênio molecular, incluindo o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}). Este último é o oxidante mais forte das EROs e pode iniciar reações de radicais em cadeia, com várias moléculas orgânicas, levando à peroxidação lipídica, à inativação de enzimas e à degradação de ácidos nucleicos. As EROs podem contribuir para a morte celular como parte da resposta de hipersensibilidade ou atuar diretamente na morte do

patógeno (TAIZ et al., 2017). O aparecimento da HR que foi acarretada pela explosão oxidativa leva a indução da resistência sistêmica adquirida (SAR) (RENTEL et al., 2004).

A SAR é um mecanismo de sinalização de longa distância que fornece amplo espectro e resistência duradoura a infecções secundárias em toda a planta. Esse mecanismo é induzido pelo SA, que é um importante fito-hormônio que desempenha um papel vital na regulação dos mecanismos locais de resistência a doenças, incluindo a morte de células hospedeiras e a expressão de genes de defesa (GAO et al., 2015; VLOT et al., 2009).

Como visto nos parágrafos anteriores, as plantas possuem uma gama de mecanismos de resistência à doenças que possibilitam sua defesa contra o ataque de patógenos. Com isso, pode se inferir que a resistência da planta depende da capacidade do hospedeiro em reconhecer o patógeno, e rapidamente induzir os mecanismos de defesa a tempo de limitar a ação do mesmo. Deste modo, a identificação e caracterização molecular de genes envolvidos no processo de defesa e reconhecimento de pragas e patógenos tem sido uma estratégia amplamente utilizada para o entendimento dos mecanismos de resistência em plantas (SILVESTRINI et al., 2005).

1.1.4 Expressão de genes

Desde muito tempo, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de encontrar meios que possibilitem melhorar o desempenho das plantas quando as mesmas são expostas a condições de estresses. E isso se refletiu, não só no entendimento de muitas vias metabólicas e atividades enzimáticas, mas também no aumento de estudos de genoma (DNA) e transcriptoma (RNA) de plantas, fungos e bactérias. A exemplo disso, temos as plantas de *Oryza sativa* (arroz) e *Arabidopsis thaliana* que hoje já possuem seu genoma sequenciado. Além destas, uma grande quantidade de sequências de RNA já fora sequenciada e muitas outras novas vem sendo sequenciadas a cada nova pesquisa. Essas informações são armazenadas em bancos de dados que são disponibilizados à população e vêm sendo usadas para estudos de genômica funcional, que tem como objetivo descrever a função específica de genes e proteínas, além do controle da expressão gênica e suas interações sob determinadas situações (BUCHER, 2011). Deste modo, a análise gênica é, portanto, uma técnica valiosa para as pesquisas biológicas, possibilitando que genes isolados de diferentes organismos sejam transferidos para outros, conferindo-lhes novas características de interesse (COSTA, 2011). E se tratando da mandioca ainda são poucos os estudos dessa natureza, tornando-se necessário verificar quais os vários genes da CAT e SOD estão associados a interação mandioca-*Phytophthium* sp..

Existem na atualidade diversos métodos capazes de analisar a expressão dos genes, que vão desde metodologias e equipamentos que avaliam poucos genes de cada vez (*Northern blot*, *dot blots*, *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) até metodologias e equipamentos sofisticados que possibilitam o monitoramento dos níveis de transcritos de centenas a milhares de genes simultaneamente (*Microarrays* e *RNA-seq*) (FELIX et al., 2002). A primeira (microarrays ou microarranjos de DNA) é capaz de avaliar de maneira concomitante a expressão de milhares de genes em diversos tecidos de um determinado organismo, e em diferentes estágios de desenvolvimento ou condições ambientais, no entanto, experimentos com essa tecnologia ainda são consideravelmente caros e trabalhosos e, conseqüentemente são geralmente conduzidos com tamanhos amostrais relativamente pequenos (ROSA et al., 2007). O Sequenciamento de RNA (RNA-Seq) permite que o transcriptoma inteiro seja pesquisado com alto rendimento, além também, de permitir a análise de *splicing* alternativo (GONÇALVES, 2015), mas assim como a tecnologia anterior é considerada onerosa e sujeita a erros de sequenciamento.

A técnica PCR semi-quantitativa compreende uma importante ferramenta para esse estudo. É baseada na comparação dos níveis de amplificação em PCR's com números de ciclos diferentes, sendo uma rápida e confiável maneira de quantificar determinado mRNA presente em pequena quantidade na amostra (REY et al., 2000). A PCR pode ser precedida por uma reação de transcrição reversa (RT) para a obtenção de cDNA a partir de RNA (RT-PCR), representando, por exemplo, uma possibilidade de análise de expressão gênica em células ou tecidos (LADEIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2004). Trata-se de um método altamente sensível e específico, útil para a detecção de transcritos raros ou para análise de amostras disponível em quantidades limitantes (MARONE et al., 2001).

1.1.5 Superóxido dismutase (SOD)

As EROs (OH^- , O_2^- , H_2O_2) são produzidas naturalmente nos vegetais, desempenhando funções durante o seu desenvolvimento em atividades fisiológicas e metabólicas, assim como em situações de estresses onde agem como compostos de defesa, aumentando significativamente sua produção (RASOOL et al., 2013). No entanto, esse aumento pode acarretar a um desequilíbrio redox ocasionando o estresse oxidativo e conseqüentemente a morte celular (YOU; CHAN, 2015). Sob condições normais, a ERO excessiva pode ser eliminada por várias enzimas de defesa antioxidante, a fim de manter a homeostase redox celular (HUANG et al., 2019). Dentre elas temos a superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) que se encontra em quase todos os compartimentos celulares (WANG et al., 2019).

A SOD consiste em uma das principais classes de proteínas antioxidantes, que fornecem defesa primária contra diferentes condições de estresse. São membros da família das metaloenzimas, que realizam a dismutação de radicais superóxido (O_2^-) em moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). Nas plantas, são divididos em três isoformas que estão de acordo com seus cofatores de metais ativos, ou seja, cobre -zinc (Cu-ZnSODs), que está presente principalmente nos cloroplastos, no citosol e mitocôndria; ferro (FeSODs), nos cloroplastos, e também em peroxissomos e mitocôndrias; e manganês (MnSODs), que possuem localização principalmente nas mitocôndrias e peroxissomos (TYAGI et al. 2019; WANG et al., 2017).

Há diversos trabalhos com genes clonados de SOD tanto em monocotiledôneas quanto em eudicotiledôneas (FENG et al., 2015; LIN; LAI, 2013). E muitos vêm demonstrando o papel importante que os mesmos desempenham na tolerância ao estresse, como por exemplo, os trabalhos realizados por Viczián et al. (2014), onde os autores relataram que a SOD de cloroplasto do tomate (*SlChSOD*) superexpressada na linha transgênica da espécie *Nicotiana tabacum* culminou na resistência desta contra a necrose hipersensível induzida pelo vírus do mosaico do tabaco (TMV). Lightfoot et al. (2017) estudaram a função do *HvCSD1* (Cu-ZnSOD) da cevada em linhas de *knockdown* de RNA de interferência (RNAi) em resposta a *Magnaporthe oryzae* e *Blumeria graminis* e identificaram que este não tem papel na suscetibilidade e expansão da doença causada por esses patógenos, entretanto, uma taxa de crescimento mais lenta e maior resistência a *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* foi observada. Em outro estudo, as linhagens transgênicas de mandioca com produção excessiva de Cu-ZnSOD testadas contra o ácaro *Tetranychus cinnabarinus*, demonstraram menos danos em comparação com o tipo selvagem dessa cultura (LU et al., 2017).

1.1.6 Catalase (CAT)

Assim como a SOD, a catalase (CAT; EC 1.11.1.6) é uma enzima antioxidante, sendo a primeira a ser descoberta e caracterizada. É uma enzima tetramérica onipresente possuindo um papel fundamental para evitar danos oxidativos celulares, transformando com alta eficiência duas moléculas de H_2O_2 em água e oxigênio (MHAMDI et al., 2010; SHARMA et al., 2012).

Esta enzima é predominante dos peroxissomos, no entanto, pode ser encontrada também nas mitocôndrias e no citoplasma das células. Nos vegetais, a CAT elimina o H_2O_2 gerado durante o transporte de elétrons mitocondriais, oxidação dos ácidos graxos e, na oxidação fotorrespiratória durante condições normais e de estresse. E devido suas propriedades catalíticas e reguladoras eficientes entre todas as enzimas antioxidantes do sistema vegetal, vem

sendo bastante estudada, sendo purificada e extensivamente caracterizada nos níveis genético, bioquímico e molecular das plantas (SHARMA; AHMAD, 2014).

O genoma de *Arabidopsis* codifica três proteínas da catalase (CAT1, CAT2, CAT3), codificado por múltiplos genes (*Cat1*, *Cat2*, *Cat3*), que consistem em 492 aminoácidos e compartilham alta similaridade de sequência. Embora a expressão gênica da catalase e a atividade enzimática tenham sido encontrados na maioria dos tecidos vegetais, a expressão e a atividade são maiores em tecidos aéreos do que na raiz (MHAMDI et al., 2012). Mas trabalhos como de García-Limones et al. (2002), onde estes relatam um aumento na produção da CAT nas raízes de *Cicer arietinum* L. quando estas foram expostas a murcha por *Fusarium* sp., conferindo tolerância as mesmas, demonstram a importância do estudo dessa enzima na interação planta-patógeno.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia molecular da célula*. Título original: **Molecular biology of the cell**. Tradução de Ana Letícia de Souza Vanz ... [et al.]. 5 ed. Porto Alegre: Artmed;2010. p. 1268.
- ALETOR, O. Comparative, nutritive and physico-chemical evaluation of cassava (*Manihot esculenta*) leaf protein concentrate and fish meal. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 8, n. 2, p. 39 – 43, 2010.
- ALVES, A. A. C. Cassava botany and physiology. *In*: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. C. (Eds.). **Cassava: biology, production and utilization**, CABI Publishing, New York, 2002. p. 67-89.
- ANDERSEN, E. J.; ALI, S.; BYAMUKAMA, E.; YEN, Y.; NEPAL, M. P. Disease Resistance Mechanisms in Plants. **Genes**, v. 9, n. 7, p. 339, 2018.
- ANDERSON, J. P.; GLEASON, C. A.; FOLEY, R. C.; THRALL, P. H.; BURDON, J. B.; SINGHA, K. B. Plants versus pathogens: an evolutionary arms race. **Functional Plant Biology**, v. 37, n. 6, p. 499–512, maio 2010.
- ATTARD, A.; GOURGUES, M.; GALIANA, E.; PANABIÈRES, F.; PONCHET, M.; KELLER, H. Strategies of attack and defense in plant–oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. Nicotianae* Breda de Haan). **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 83–94, 2008.
- BAKSH, A.; HUSSAIN, T.; RAHAMKULOV, I.; DEMIREL, U.; ÇALIŞKAN, M. E. Transgenic potato lines expressing CP4-EPSP synthase exhibit resistance against glyphosate. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 140, n. 1, p. 23-34, 2020.
- BALA, K.; ROBIDEAU, G.P.; LÉVESQUE, C.A., DE COCK, A.W.A.M; ABAD, Z.G.; LODHI, A.M.; SHAHZAD, S.; GHAFAR, A.; COFFEY, M.D. *Phytophthora* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, gen. nov. and *Phytophthora* sindhum Lodhi, Shahzad & Lévesque, sp. nov. **Personia**, v. 24, p. 136–137, 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, n. p. 673-676, 2006.
- BEAKES, G.W.; HONDA, D.; THINES, M. Sistemáticas of the Straminipila: Labyrinthulomycota, Hyphochytriomycota, and Oomycota. *In*: MCLAUGHLIN, D.S. SPATAFORA, J.W. (Eds.). **The Mycota VIII Part A**. Springer-Verlag, Berlin, 2014. p. 39-97.
- BOARI, A. J.; CUNHA, E. M.; QUADROS, A. F. F.; BARRETO, R. W.; FERNANDES, A. F. First Report of *Phytophthora* sp. Causing Storage Root Rot and Foliage Blight of Cassava in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, n. 5, p. 1042, 2018.

BOARI, A. J.; QUADROS, A. F. F.; CUNHA, E. F. M. **Podridão-mole da mandioca causada pelo *Phytophthium* sp.** Belém: EMBRAPA, 2019. 5p (Comunicado técnico 310)

BRITO, A. C.; OLIVEIRA, S. A. S.; OLIVEIRA, E. J. Genome-wide association study for resistance to cassava root rot. **Journal of Agricultural Science**, v. 155, p. 1424–1441, 2017.

BUCHER, C. A. **Expressão de genes relacionados à absorção e metabolismo de nitrogênio em arroz sob alto e baixo suprimento de nitrato.** 2011. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, 2011.

CNA - CONFEDERAÇÃO DE AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL **Pib do agronegócio avança em julho e mantém crescimento no acumulado do ano (2019).** Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/boletins/pib-do-agronegocio-avanca-em-julho-e-mantem-crescimento-no-acumulado-do-ano>. Acesso em: 16 out. 2019.

COÊLHO, J. D. **Produção de mandioca: raiz, farinha e fécula.** Fortaleza, Ce: ETENE, 2018. 11p (Caderno Setorial Etene 44).

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. Receita bruta dos produtores rurais brasileiros. *In*: DE OLIVEIRA NETO, A. A.; DE FARIA, J. M. B. A. (RT). **Rec. bruta prod. rur. bras.**, Brasília, v.9, p. 1-240, 2019.

COSTA, A. M. Prospecção gênica e bioinformática. *In*: FALEIRO, F. G.; de ANDRADE, S. R. M.; dos REIS JUNIOR, F. B. (Eds.). **Biociência**: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 121-141.

COSTA, T. E. M. M.; DIAS, A. P. M.; SCHEIDEGGER, E. M. D.; MARIN, V. A. Avaliação de risco dos organismos geneticamente modificados. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n.1, p. 327-336, 2011.

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

DE DEUS, K. E. **Atividade enzimática e expressão diferencial da superóxido dismutase (sod) em plantas de arroz de terras altas sob deficiência hídrica.** 2014. 128 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, 2014.

DE SOUZA, C. R. B.; BRÍGIDA, A. B. S.; 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 WIT, P. J. G. M. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 2726 – 2732, 2007.

DOUGHARI, J. H. An Overview of Plant Immunity. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v.6, n. 11, p. 322-332, 2015.

FAKUDA, W. M. G.; CARVALHO, F. W. L. **Propagação Rápida de Mandioca no Nordeste Brasileiro**. Aracaju: EMBRAPA, 2006. 6p. (Circular Técnica 45).

FASUYI A.O. Nutrient Composition and Processing Effects on Cassava Leaf (*Manihot esculenta*, Crantz) Antinutrients. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 37-42, 2005.

FELIX, J. M.; DRUMMOND, R. D.; NOGUEIRA, F. T. S.; JUNIOR, V. E. R.; JORGE, R. A.; ARRUDA P.; MENOSSI, M. Genoma Funcional: Uso de arranjos de DNA em nylon para a análise de expressão gênica em larga escala. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 24, p. 60-67, jan./fev. 2002.

FENG, X.; LAI, Z.; LIN, Y.; LAI, G.; LIAN, C. Genome-wide identification and characterization of the superoxide dismutase gene family in *Musa acuminata* cv. Tianbaojiao (AAA group). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–16, 2015.

FERNANDES, D. S.; dos SANTOS, T. P. R.; FERNANDES, A. M.; LEONEL, M. Harvest time optimization leads to the production of native cassava starches with different properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, n. 1, p. 710-721, jul. 2019.

FERNANDES, L. F. **Avaliação do Desenvolvimento de Mandioca consorciada com Girassol e Feijão Caupi**. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - UNEB, Bahia, 2015.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. 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**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 202p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/981357/mandioca-no-cerrado-orientacoes-tecnicas>. Acesso em: 16 out. 2019.

FIGUEIREDO, M. M.; ALBUQUERQUE, F. C. de. Podridão mole das raízes da mandioca (*Manihot esculenta*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, n. 3, p. 389-393, 1970.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT** Statistical Database, Statistical Division. Rome, 2019.

FREEMAN, B. C.; BEATTIE, G. A. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. **Plant Pathology and Microbiology**, v. 94, p. 1-12, 2008.

GAO, Q.; ZHU, S. KACHROO, P.; KACHROO, A. Signal regulators of systemic acquired resistance. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 228, 2015.

GARCÍA-LIMONES, C.; HERVÁS, A.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; TENAA, M. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum*

L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, n. 6, p. 325-337, december 2002.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 205–27, 2005.

GONÇALVES, K. C. B. **Estudo de bioinformática aplicado à análise de expressão gênica utilizando dados oriundos de sequenciamento por tecnologia de “next-generation” em animais controle e em modelos de epilepsia do lobo temporal mesial**. 2015. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Campinas-SP- Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, 2015.

HOU, W.; SINGH, R. K.; ZHAO, P.; MARTINS, V.; AGUILAR, E.; CANTO, T.; TENLLADO, F.; DIAS, A. C. P. Transgenic expression of *Hyp-1* gene from *Hypericum perforatum* L. alters expression of defense-related genes and modulates recalcitrance to *Agrobacterium tumefaciens*. **Planta**, v. 251, n. 13, p. 1-18, 2020.

HOWELER, R.; LUTALADIO, N.; THOMAS, G. **Save and grow cassava: A guide to sustainable production intensification**. Roma: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), 2013. 142 p. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3278e/i3278e.pdf>. Acesso em: 01 out. 2019.

HUANG, H.; ULLAH, F.; ZHOU, D.; YI, M.; ZHAO, Y. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. **Frontiers in plant Science**, v. 10, 2019.

INDEX FUNGORUM, 2020. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>. Acesso em: 16 de janeiro de 2020.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistêmico de produção agrícola**. Brasil, 2020.

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

LADEIRA, P. R. S.; ISAAC, C.; FERREIRA, M. C. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction. **Revista de medicina**, São Paulo, v. 90, n. 1, p. 47-51, jan.-mar 2011.

LÉVESQUE, C.A.; DE COCK A.W.A.M. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research**, v. 108, p. 1363–1383, 2004.

LIGHTFOOT, D. J.; MCGRANN, G. R. D.; ABLE, A. J. The role of a cytosolic superoxide dismutase in barley-pathogen interactions. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, p. 323–335, 2017.

LIMA, A. M.; MOURA, E. F.; ISHIDA, A. K. N.; PEREIRA, A. C. C.; dos REIS, S. P.; de SOUZA, C. R. B. Expression profiles of defense genes in cassava storage roots upon exposure to *Phytophthora* sp., causal agent of soft root rot disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 104, p. 23–30, 2018.

LIN, Y-L.; LAI, Z-X. Superoxide dismutase multigene family in longan somatic embryos: a comparison of CuZn-SOD, Fe-SOD, and Mn-SOD gene structure, splicing, phylogeny, and expression. **Molecular Breeding**, v. 32, n. 3, p. 595–615, 2013.

LU, F.; LIANG, X.; LU, H.; LI, Q.; CHEN, Q.; ZHANG, P.; LIU, G.; YAN, W.; SONG, J.; DUAN, C. Overproduction of superoxide dismutase and catalase confers cassava resistance to *Tetranychus cinnabarinus*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 40179, 2017.

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; de OLIVEIRA, S. A. S.; PEREIRA, O. L. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 6, p. 464-470, 2014.

MANDAL, S. Induction of phenolics, lignina and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 47, p. 8038–8047, 2010.

MARONE, M.; MOZETTI, S.; RITIS, D.; PIERELLI, L.; SCAMBIA, G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. **Biological Procedures Online**, v. 3, n. 1, p. 19-25, may 2001.

MARTINATI, J. C.; MOLINA, J. V. D.; BONTURI, N.; MARTARELLO, F. H. H.; GUERREIRO FILHO, O.; MALUF, M. P. Expressão de genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio, fósforo e potássio em cafeeiros submetidos ao estresse biótico. *In: VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 6., 2009, Vitória, ES. **Anais eletrônicos**. Vitória, ES: Embrapa Café, 2009. Disponível em: http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/simposio6/71.pdf. Acesso em: 01 out. 2019.

MHAMDI, A.; NOCTOR, G.; BAKER, A. Plant catalases: peroxisomal redox guardians. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, p. 181–194, 2012.

MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; CHAOUCH, S.; VANDERAUWERA, S.; VAN BREUSEGEM, F.; NOCTOR, G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4197–4220, 2010.

MODESTO JUNIOR, M. S.; ALVES, R. N. B (Eds). **Cultura da mandioca**: apostila. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. 197 p.

MOLLAHOSSEIN, S. H. **Host-Pathogen Interactions in Root Infecting Oomycete Species**. 2015. 68f. Tese (Doctored in Forest Mycology and Plant Pathology) - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2015.

NASSAR, N. M. A.; MARQUES, A.O. Cassava leaves as a source of protein. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 4, n. 1, p. 187-188, 2006.

NEIL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, Danvers, v. 5, p. 388-395, 2002.

NEJAT, N.; MANTRI, N. Plant Immune System: Crosstalk Between Responses to Biotic and Abiotic Stresses the Missing Link in Understanding Plant Defence. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 23, p.1-16, 2017.

NYABOGA, E.; NJIRU, J.; NGUU, E.; GRUISSEM, W.; VANDERSCHUREN, H. TRIPATHI, L. Unlocking the potential of tropical root crop biotechnology in east Africa by establishing a genetic transformation platform for local farmer-preferred cassava cultivars. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 526, p. 1-11, 2013.

PANG, Z.; SRIVASTAVA, V.; LIU, X.; BULONE, V. Quantitative proteomics links metabolic pathways to specific developmental stages of the plant-pathogenic oomycete *Phytophthora capsici*. **Molecular plant pathology**, v. 18, n. 3, p. 378–390, 2017.

PARMAR, N.; SINGH, K. H.; SHARMA, D.; SINGH, L.; KUMAR, P.; NANJUNDAN, J.; KHAN, Y. J.; CHAUHAN, D. K.; THAKUR, A. K. Genetic engineering strategies for biotic and abiotic stress tolerance and quality enhancement in horticultural crops: a comprehensive review. **3 Biotech**, v. 7, n. 239, p. 1-35, 2017.

PERUCH, L. A. M.; COLARICCIO, A.; NEUBERT, E. O.; MORETO, A. L.; PEREIRA, E. F. Sintomas e controle das principais doenças da mandioca em Santa Catarina. **Revista Agropecuária Catarinense**, v.26, n.2, p.52-54, jul. 2013.

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.

POLAT, Z.; AWAN, Q. N.; HUSSAIN, M.; AKGÜL, D. S. First Report of *Phytophthora vexans* Causing Root and Collar Rot of Kiwifruit in Turkey. **Plant Disease**, V. 101, n. 6, p. 1058, 2017.

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.

PROCHNIK, S.; MARRI, P. R.; DESANY, B.; RABINOWICZ, P. D.; KODIRA, C.; MOHIUDDIN, M.; RODRIGUEZ, F.; FAUQUET, C.; TOHME, J.; HARKINS, T.; ROKHSAR, D. S.; ROUNSLEY, S. The Cassava Genome: Current Progress, Future Directions. **Tropical Plant Biology**, v. 5, p. 88-94, 2012.

QUADROS, A. F. F.; REIS, L. N. A.; TREMACOLDI, C. R.; CUNHA, E. F. M. **Resistência de cultivares de mandioca da Embrapa Amazônia Oriental à podridão mole das raízes**. Belém: EMBRAPA, 2015. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/133388/1/MandiocaCD.pdf>. Acesso em: 01 out 2019.

RASOOL, S.; AHMAD, A.; SIDDIQI, T. O.; AHMAD, P. Changes in growth, lipid peroxidation and some key antioxidant enzymes in chickpea genotypes under salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 4, p. 1039–1050, 2013.

RENTEL, M. C.; LECOURIEUX, D.; OUAKED, F.; USHER, S.; PETERSEN, L.; OKAMOTO, H.; KNIGHT, H.; PECK, S. C.; GRIERSON, C. S.; HIRT, H.; et al. OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signaling in Arabidopsis. **Nature**, v. 427, p. 858-861, 2004.

REY, J.M.; PUJOL, P.; CALLIER, P.; CAVAILLES, V.; FREISS, G.; MAUDELONDE, T.; BROUILLET, J.P. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to evaluate the expression patterns of genes involved in the oestrogen pathway. **Journal of Molecular Endocrinology**, n.24, p.433–440, 2000.

ROCHA, J. R. A. S. C.; de PAULA, I. G.; GLORIA, H. B.; PIMENTEL, A. J. B.; RIBEIRO, G.; de SOUZA, M. A. Screening wheat genotypes for resistance to wheat blast disease in the vegetative and reproductive stages. **Euphytica**, v. 215, n. 59, p. 1-8, 2019.

ROSA, G. J. M.; DA ROCHA, L. B.; FURLAN, L. R. Estudos de expressão gênica utilizando-se microarrays: delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p.185-209, 2007.

SALGUERO-LINARES, J.; COLL, N. S. Plant proteases in the control of the hypersensitive response. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 7, p. 2087–2095, março 2019.

SANTANA, F. A. **Estudos genéticos do germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* crantz) para qualidade da raiz**. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Cruz das Almas – Ba, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2014.

SANTOS, C. F.; SAKAI, V. T.; MACHADO, M. A. A. M.; SCHIPPERS, D. N.; GREENE, A. S. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2004.

SANTOS, C.; DUARTE, S.; TEDESCO, S.; FEVEREIRO, P.; COSTA, R. L. Expression profiling of castanea genes during resistant and susceptible interactions with the oomycete pathogen *Phytophthora cinnamomi* reveal possible mechanisms of immunity. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.

SEBRAE - SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Mandioca (Farinha e fécula)** – série estudos mercadológicos. Brasília, DF: SEBRAE, 2012. 34p

SHARMA, I.; AHMAD, P. Catalase: A versatile antioxidant in plants. In: AHMAD, P. (Ed.). **Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling**. Amsterdam: Academic press, 2014. p. 131-148.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SILVA, H. R. F.; MELO, V. L.; PACHECO, D. D.; de ASSIS, Y. J. M.; SALES, H. R. Acúmulo de matéria seca e micronutrientes em mandioca consorciada com bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 1, p. 15-23, jan./mar. 2014.

SILVESTRINI, M.; MALUF, M. P.; GUERREIRO-FILHO, O.; GONÇALVES, W. **Expressão de genes de resistência em resposta à infecção por nematoides**. EMBRAPA CAFÉ, 2005. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/49959/1/Expressao-de-genes-de-resistencia.pdf>. Acesso em: 01 out 2019.

SOUZA, E.; SILVA, M.; SILVA, S. A cadeia produtiva da mandiocultura no vale do Jequitinhonha (MG): Uma análise dos aspectos sócio produtivos, culturais e da geração de renda para a Agricultura familiar. **ISEGORIA**, v. 1, n. 2, p. 73-85, set. de 2011/fev. de 2012.

SOUZA, R. C. **Avaliação do potencial agrônomo de cultivares de mandioca oriundas do nordeste brasileiro**. 2017. 44 f. Dissertação (Mestrado em olericultura) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Morrinhos, GO, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TAKAHASHI, M; FONSECA JUNIOR, N.S.; TORRECILLAS, S.M. **Mandioca no Paraná: Antes, agora e sempre**. Curitiba: IAPAR, 2002. 209p (Circular Técnica 123).

TREMACOLDI, C. R. Manejo das principais doenças da cultura da mandioca no estado do Pará. *In*: MODESTO JUNIOR, M. S.; ALVES, R. N. B. (Eds). **Cultura da mandioca**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. p. 161- 170.

TYAGI, S.; SHUMAYLA; SINGH, S. P.; UPADHYAY, S. K. Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Stress Tolerance in Plants. *In*: SINGH, S. P.; UPADHYAY, S. K.; PANDEY, A.; KUMAR, S. (Eds.). **Molecular Approaches in Plant Biology and Environmental Challenges**. 1 ed. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 51-77.

VICZIÁN, O.; KÜNSTLER, A.; HAFEZ, Y.; KIRÁLY, L. Catalases may play diferente roles in influencing resistance to virus-induced hypersensitive necrosis. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v. 49, n. 1, p. 189–200, 2014.

VILAS BOAS, S. A.; de OLIVEIRA, S. A. S.; BRAGANÇA, C. A. D.; RAMOS, J. B.; de OLIVEIRA, E. J. Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 74, n. 1, p.60-67, Jan./Fev. 2017.

VLOT, A.C.; DEMPSEY, D. A.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, p. 177–206, 2009.

WANG, K.X.; XIE, Y.L.; YUAN, G. Q.; LI, Q. Q.; LIN, W. First Report of Root and Collar Rot Caused *Phytophthium helicoides* on Kiwifruit (*Actinidia chinensis*). **Plant Disease**, V. 99, n. 5, P. 725, 2015.

WANG, W.; CHENG, Y.; CHEN, D.; LIU, D.; HU, M.; DONG, J.; ZHANG, X.; SONG, L.; SHEN, F. The catalase gene family in cotton: genome-wide characterization and bioinformatics analysis. **Cells**, v. 8, n. 2, p. 86, 2019.

WANG, W.; ZHANG, X.; DENG, F.; YUAN, R.; SHEN, F. Genome-wide characterization and expression analyses of superoxide dismutase (SOD) genes in *Gossypium hirsutum*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 376, p. 1-25, 2017.

WEST, P. V.; APPIAH, A. A.; GOW, N. A. R. Advances in research on oomycete root pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62, p. 99-113, 2003.

YOU, J.; CHAN, J. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. **Frontiers in plant Science**, v. 6, 2015.

ZHANG, Y.; LUBBERSTEDT, T.; XU, M. The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 40, p. 23-35, 2013.

ZAINUDDIN, I. M.; SCHLEGEL, K.; GRUISSEM, W.; VANDERSCHUREN, H. Robust transformation procedure for the production of transgenic farmer-preferred cassava landraces. **Plant Methods**, v. 8, n. 24, p.1-8, 2012.

2 NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE GENES DE CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE DA MANDIOCA DURANTE INTERAÇÃO COM *Phytophthora* sp.

2.1 Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), conhecida também no Brasil como aipim e macaxeira, é a terceira fonte de carboidratos mais consumida, depois do arroz e do milho, desempenhando papel fundamental na dieta alimentar mundial (NASSAR et al., 2008; RAMU et al., 2017). Suas raízes tuberosas servem como alimento básico para mais de um bilhão de pessoas em mais de 105 países, sendo uma das principais fontes de carboidratos e amido (20 a 40%), consumidas tanto *in natura* (farinha, amido ou cozido) quanto para fins industriais (alimentícia e química) (CONNOR, 2019; MODESTO JUNIOR; ALVES, 2014; PROCHNIK et al., 2012).

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores e consumidores desta cultura nas Américas. Em 2017 o Brasil produziu 292 milhões de toneladas (Mt) (peso fresco) em uma área colhida de 23,6 milhões de hectares (Mha). A região Norte do Brasil é a maior produtora de mandioca do país com 38,53% da safra nacional e o Estado do Pará detém 54,93% da área plantada da Região Norte e conseqüentemente responde por 53,57% da produção de mandioca da Região (IBGE, 2020).

No Estado do Pará, a agricultura familiar é a principal responsável pelo o cultivo da mandioca, pois esta garante a subsistência desses agricultores principalmente por manter a economia local. Entretanto, por falta de investimento financeiro, acesso a informações e tecnologias, esses agricultores vêm utilizando, ao longo do tempo, práticas de preparo de áreas itinerantes, via derruba e queima, principalmente de mata primária e capoeiras. Além disso, as variedades de mandioca são frequentemente nativas com baixo potencial genético, cultivada em solos com baixa fertilidade, com restrições pluviométricas que são inadequados ao cultivo de outras culturas anuais (COQUEIRO, 2013). Outro fator limitante para o cultivo da mandioca para os agricultores são as perdas na produção causadas especialmente por fitopatógenos, dentre estes, destaca-se a podridão radicular que é responsável por até 100% das perdas no rendimento (BRITO et al., 2017).

A podridão-mole das raízes da mandioca foi identificada recentemente como sendo causada pelo patógeno *Phytophthora* sp. (BOARI et al., 2018). Essa doença causa grandes prejuízos para a produção desta cultura, principalmente na região amazônica, uma vez que é bastante comum em áreas com solos poucos drenados, com ocorrência de acúmulo de água no período de alta intensidade pluviométrica, como o que se observa no “inverno” amazônico. O patógeno se propaga principalmente de forma assexuada, onde os esporângios são produzidos

na superfície dos tecidos infectados quando em condições favoráveis, estes são facilmente deslocados pelas águas das chuvas e irrigação. Quando imersos em água, é liberado zoósporos biflagelados móveis, que nadam em busca de hospedeiros, ao entrar em contato, estes penetram e aderem à superfície da planta, iniciando a infecção (PANG et al., 2017). Esta doença é caracterizada pelo escurecimento dos tecidos afetados (necrose) com exsudação líquida, além de ser fétida (TREMACOLDI, 2016; VILAS BOAS et al., 2017).

Os vegetais podem se proteger de ataques de patógenos por meio da ativação de uma ampla matriz de respostas de defesa que diminuem ou interrompem o desenvolvimento da infecção. Esses mecanismos de defesa incluem barreiras físicas e químicas preexistentes que interferem no estabelecimento de patógenos (EL-ARGAWY; ADSS, 2016). Em resposta a qualquer estresse biótico, independentemente do contexto genotípico, as plantas produzem uma explosão oxidativa envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que possuem funções tanto de proteção contra o fitopatógeno quanto de sinalização para ampliar o mecanismo de defesa, o que pode levar a reação de hipersensibilidade localizada (HR), acarretando na morte celular na região da infecção, afim de impedir a rápida proliferação do patógeno no tecido do hospedeiro (BHOSLE et al., 2019; DE SOUZA et al., 2011). A HR induz a planta a ativar o sistema de resistência adquirida (SAR) que confere um amplo espectro de resistência a vários patógenos.

A SAR é tipicamente caracterizada por um alto nível de ácido salicílico (SA), acompanhado pela ativação de proteínas relacionadas à patogênese (PR) com atividade antimicrobiana. Os mecanismos de defesa de uma planta são controlados geneticamente e dependem da expressão de determinados genes no momento certo da relação patógeno-hospedeiro (PIETERSE et al., 2014)

Por serem altamente reativas, as EROs, podem interromper seriamente o metabolismo normal dos vegetais por danos oxidativos a lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e células (RAY et al., 2012). No caso de patógenos necrotróficos, a ERO desempenha um papel central durante a interação com a planta hospedeira, estimulando as respostas de defesa basal da planta. Pesquisas têm demonstrado que o início da resistência basal em plantas à *Rhizoctonia solani* está associado a mecanismos de eliminação de ERO (SAMSATLY et al., 2018).

Esses mecanismos são conhecidos como antioxidantes, que podem ser enzimáticos (Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Ascorbato peroxidase (APX), etc.) e não enzimático (ascorbato e glutathione, além de tocoferol, flavonóides, alcaloides e carotenóides) (XU et al., 2013). A SOD é a primeira linha de defesa do sistema de defesa de plantas, trata-se de uma enzima metálica amplamente produzida nos organismos e uma enzima essencial para a

eliminação de radicais livres de oxigênio nas plantas (DONG et al., 2019). A CAT é uma enzima porfirina de ferro, localizada principalmente nos peroxissomos, e atua como antioxidante eficiente de EROs, removendo o excesso de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) durante o processo de desenvolvimento ou estresse biótico / abiótico, para evitar danos oxidativos. As catalases de plantas são compostas por uma família de vários genes e foram relatadas em muitas espécies de plantas (CHEN et al., 2012; MHAMDI et al., 2010).

Trabalhos prévios realizados por Lima et al. (2018) estudaram a interação mandioca-*Phytophthium* sp., e foi o primeiro a nível molecular a estudar esta interação. Os autores avaliaram alterações nos níveis de expressão de genes que codificam proteínas com funções conhecidas na defesa de plantas, como enzimas envolvidas na explosão oxidativa e na via do fenilpropanóide, em raízes destacadas de mandioca inoculadas e não inoculadas com o patógeno. Segundo observado pelos autores a mandioca respondeu à infecção por patógenos através da regulação positiva de genes que codificam para superóxido dismutase, fenilalanina amônia-liase, chalcona sintase e cisteína inibidor de proteinase, esses achados contribuem para entendimento de como a mandioca responde à infecção por patógenos.

Como amplamente discutido na literatura, as espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas naturalmente nos vegetais, desempenhando funções durante o seu desenvolvimento em atividades fisiológicas e metabólicas, bem como em situações de estresses, desempenhando importantes papéis no controle biológico da planta, podendo atuar em compostos de defesa e/ou moléculas sinalizadoras, aumentando significativamente sua produção (RASOOL et al., 2013). Para que ocorra essa atuação em resposta ao estresse, a síntese e degradação das EROs devem ser sincronicamente reguladas (DE SOUZA et al., 2011; NEILL et al., 2002).

Para evitar problemas para a própria célula é necessário um controle de seus níveis que é realizado por meio de compostos antioxidantes, como é o caso da SOD e CAT. Com isso, para o melhor entendimento de como a planta responde aos mecanismos oxidantes da célula, trabalhos que estudam a expressão de diferentes genes de SOD e CAT são essenciais (LU et al., 2017), pois podem elucidar o perfil da resposta da planta ao estresse, a qual pode ser imediata ou tardia.

Diante disso, o conhecimento sobre os mecanismos oxidativos nas plantas pode contribuir para o desenvolvimento de plantas mais bem adaptadas ao meio ambiente e resistentes a patógenos (CAVERZAN et al., 2016). O estudo da expressão gênica dessas enzimas pode direcionar a pesquisa de interação *Phytophthium* sp. e mandioca e possibilitar o entendimento do mecanismo de tolerância desta planta. Deste modo, para o melhor entendimento dessa interação planta-patógeno, o isolamento e a caracterização de sequências

gênicas expressas em resposta à infecção são essenciais, assim como a identificação de genes envolvidos na defesa da planta contra os patógenos.

Assim, essa pesquisa tem como hipótese que genes da catalase e superóxido dismutase tem seus níveis de expressão aumentados em plantas de mandioca quando estas estão expostas a infecção do patógeno *Phytophthium* sp., causador da podridão mole das raízes. Portanto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar as variações nos níveis de expressão de genes de catalase e superóxido dismutase da mandioca em resposta a infecção pelo patógeno *Phytophthium* sp. por meio de ensaios de RT-PCR semi-quantitativa.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Obtenção do RNA total

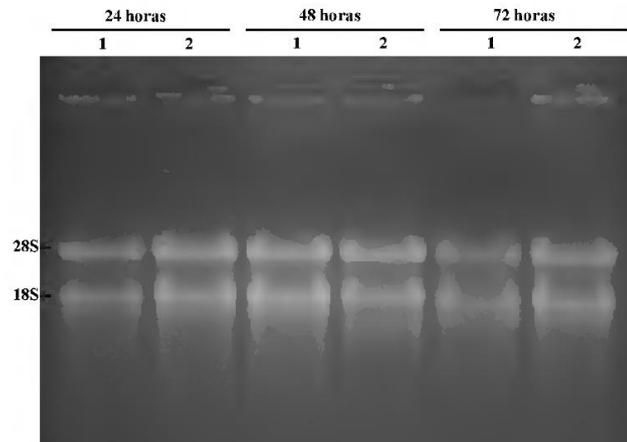
O material utilizado para este estudo foi proveniente de Lima et al. (2018), estes autores utilizaram raízes destacadas de mandioca da cultivar CPATU 359 considerada suscetível a podridão mole da raiz, as mesmas foram colhidas do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Amazônia Oriental (Belém-Pará, Brasil) a partir de plantas do acesso Caxiuanã-PA com 12 meses de idade, e usadas para os ensaios de inoculação com *Phytophthium* sp..

O patógeno *Phytophthium* sp. (Acc. No. COAD 2088) foi obtido da Coleção de Culturas do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém-Pará, Brasil, o mesmo foi repicado em placas de Petri contendo 20 mL de meio Mandioca-Dextrose-Agar (MDA), sendo estas mantidas sobre temperatura constante de 25 ± 2 °C com ausência completa de luminosidade durante doze dias.

A inoculação do isolado nas raízes foi baseado na metodologia proposta por Oliveira et al. (2013), sendo feito perfurações em três pontos equidistantes (6mm de diâmetro) e inseridos discos de meio de cultura MDA contendo o micélio do patógeno para o tratamento inoculado e discos com meios MDA estéreis para o controle (não inoculado), as raízes foram incubadas em câmara úmida a 25 ± 2 °C, seguido de amostragem nas 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hpi) (LIMA et al., 2018).

O RNA total foi extraído dessas raízes por meio da metodologia de Jones et al. (1985) e usado no presente estudo. Todo o processo de obtenção do material biológico, cultivo, coleta e extração do RNA total da mandioca infectada com o *Phytophthium* sp foram realizados por estes autores. A Figura 3 mostra a integridade do RNA total extraído.

Figura 3 – Perfil eletroforético, em gel de agarose (1,5% m/v) corado com brometo de etídio, dos RNAs totais extraídos das raízes destacadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). As bandas correspondentes às subunidades 28S e 18S do RNA ribossômico estão representadas com setas. Os números representam: (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: LIMA (2017)

2.2.2 Seleção dos genes da Catalase (CAT) e Superóxido dismutase (SOD)

As sequências dos genes das catalases e da superóxido dismutase foram obtidas por meio do genoma da mandioca disponível no *Phytozome Cassava Database* (<http://www.phytozome.net/cassava>). Para isto, foi acessada a ferramenta *keyword search*, na qual foi especificada a palavra “catalase” e “superóxido dismutase”. Como resultado, foram fornecidos 7 acessos correspondentes as sequências de catalase de mandioca e 9 acessos correspondentes a superóxido dismutase. Foram obtidas as sequências nucleotídicas (transcrito) e proteicas dos genes selecionados da mandioca. O peso molecular e o ponto isoelétrico das sequências de aminoácidos foram obtidos por meio do programa *ExPASy Proteomics Server* (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com o auxílio do programa *CLUSTALO* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) utilizando os parâmetros padrões. A predição da localização subcelular foi feita por meio da ferramenta computacional *Sherloc2* (<https://abi-services.informatik.uni-tuebingen.de/sherloc2/webloc.cgi>) (BRIESEMEISTER et al., 2009), além dessa também foram usados o programa *Mitoprot* (<https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) (CLAROS, 1995) e *PPero* (<http://biocomputer.bio.cuhk.edu.hk/PP>) (WANG, J. et al., 2017) que são próprios para mitocôndrias e peroxissomos respectivamente.

2.2.3 Desenho dos iniciadores (*primers*) para os genes selecionados

Foi utilizado o programa computacional *Vector NTI* (Invitrogen, USA) no desenho dos iniciadores específicos para cada gene a partir da sequência do transcrito (5'UTR, ORF e 3'UTR). Para cada sequência de interesse foi desenhado um par de iniciador específico (*forward* e *reverse*), apresentando tamanhos que variaram de 25-32 bases e temperatura de anelamento (TM) em torno de 62 °C. A Tabela 1 apresenta os iniciadores desenhados para esse estudo.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados em ensaios de RT-PCR semi-quantitativa durante a interação *Manihot esculenta* Crantz - *Phytophthium* sp.

Gene	Iniciador	Sequência (5'-3')	Amplicon* (pb)	Referência
<i>MeTUB</i>	MeTUB-F	ATCCTTCTCAAGGGCAGCAAGAT	370	Costa et al. 2012
	MeTUB-R	ACATGGAAAGTACATGGCCTGCTG		
<i>MeCAT</i> seq 1	P1	GAAC TTCATGCACAGGGATGAGGAGGT	507	Esse estudo
	P2	CGAATCCAGCAAAC TACACGCCTTACC		
<i>MeCAT</i> seq 2	P1	GAAC TTCATGCACAGGGATGAGGAGGT	365	Esse estudo
	P3	TCTTCCTGAGAACTCGCCACCTTTAGACT		
<i>MeCAT</i> seq 3	P1	GAAC TTCATGCACAGGGATGAGGAGGT	398	Esse estudo
	P4	TGATCTTCTGCTTCTCCTCCTCCTCAAC		
<i>MeCAT</i> seq 4	P1	GAAC TTCATGCACAGGGATGAGGAGGT	366	Esse estudo
	P5	GTGATTGTGATGTTTGAGACATTGTTTCTGC		
<i>MeSOD</i> seq 1 (CuZn)	P6	CATGCCCTTGGAGACACCACAAATGG	416	Esse estudo
	P7	CTTCAGCAATGTGTAATTGACAGGCCCCAG		
<i>MeSOD</i> seq 2 (CuZn)	P6	CATGCCCTTGGAGACACCACAAATGG	495	Esse estudo
	P8	CAGTTTACGAGATCAAACAAGGCACACAACAT		
<i>MeSOD</i> seq 3 (CuZn)	P6	CATGCCCTTGGAGACACCACAAATGG	391	Esse estudo
	P9	CTTCTAAAGGTTGTCCGGCTGTGCATGT		
<i>MeSOD</i> seq 4 (FeMn)	P11	GATCTCTGGTCACCCGAAAGAACCCTCTCA	379	Esse estudo
	P10	TCAATAGCCCCGACCAAGAGAACCATGTG		
<i>MeSOD</i> seq 5 (Mn)	P12	CTCGTCGCCCGGATGACCCTAATT	380	Esse estudo
	P10	TCAATAGCCCCGACCAAGAGAACCATGTG		

*Tamanho esperado em pares de bases (pb)

Fonte: A autora (2020)

2.2.4 Tratamento das amostras de RNA total com DNase I

As amostras de RNA total da raiz de mandioca inoculada com *Phytophthium* sp., assim como as amostras do controle, obtidas por Lima et al. (2018) foram tratadas com DNase para eliminação de possíveis contaminações com DNA genômico. O procedimento foi realizado através das orientações do fornecedor (Invitrogen, USA).

Para esse procedimento 10 µg de RNA total da amostra foram colocados em um tubo de centrifugação de 1,5 ml. Nesse mesmo tubo foram adicionados 5 µL de tampão para DNase I (10X), 5 µL de DNase I (1 U/µL) e água livre de RNase somando um volume final de 50 µL. O próximo passo foi a incubação por 10 minutos a 20°C, e imediatamente após esse processo foram adicionados 5 µL de EDTA (25 mM), e por seguinte foi incubado novamente a 65°C por 10 min para inativar a ação da enzima DNase I. Feito isto, foi posteriormente adicionado 1/10

volume de acetato de sódio 3M, e 2,5 volumes de etanol, seguida de incubação a -20°C *Overnight*. Após esse período o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C , e em seguida descartou-se o sobrenadante, e o sedimento foi seco a temperatura ambiente por 15 minutos. Para finalizar essa etapa, foi feita a ressuspensão do sedimento em um volume final de 12 μL com água ultrapura livre de RNase.

2.2.5 Transcrição Reversa (RT)

Para a reação de transcrição reversa a enzima Transcriptase reversa (Invitrogen- USA) foi utilizada, seguindo também as orientações do fabricante. Para a síntese do cDNA foram utilizados os 12 μL de RNA (10 μg) tratado com DNase I do processo anterior e 1 μL de iniciador Oligo dT (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), que hibridiza com a cauda poli-A das moléculas de mRNA. A solução foi aquecida a 65°C por 5 minutos, seguida de incubação no gelo por 10 minutos. Após isso, adicionou-se 4 μL de tampão 5X para transcriptase reversa, 2 μL de dNTPs (10 mM), totalizando um volume de 19 μL . O material foi incubado a 37°C por 5 minutos, e em seguida adicionado 1 μL da enzima RT-Transcriptase Reversa (200 U/ μL), incubou-se a reação a 42°C por 2 horas. E para interromper a reação da enzima, esta foi incubada a 70°C por 10 minutos.

Após esses processos os cDNAs sintetizados foram quantificados no fluorímetro QUBIT (Invitrogen, USA), seguindo as orientações do fabricante.

2.2.6 Ensaios de RT-PCR semi-quantitativa.

Os ensaios de RT-PCR semi-quantitativa foram desenvolvidos de acordo com metodologia descrita por Lima et al. (2018), utilizando-se como controle constitutivo o gene da tubulina (*MeTUB*). 100 (cem) ng de cDNA sintetizados anteriormente provenientes das raízes inoculadas e não inoculadas (controle negativo) com o patógeno foram utilizadas como *template* nos ensaios de reação de cadeia de polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos para os genes de interesse (Tabela 1). Para cada gene foi testado diferentes ciclos (25, 28, 31 e 34) para a obtenção de fragmentos de DNA durante a fase exponencial de amplificação. A condição de reação empregada foi de um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 94°C , em seguida diferentes ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 4 minutos. Foi estabelecido um número de ciclos da PCR para os diferentes genes utilizando a amostra controle.

2.2.7 Quantificação dos dados e análise estatística

Os produtos gerados da RT-PCR semi-quantitativa foram avaliados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, visualizados por meio da iluminação ultravioleta e fotografados. As bandas formadas foram comparadas qualitativamente e avaliadas quanto a sua intensidade pelo Programa *Image J* (Instituto Nacional da Saúde, EUA). As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do software estatístico R-Studio v. 1.1.456, utilizando o pacote "Agricolae". Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) dos dados quantificados e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0.01$).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Caracterização dos genes avaliados

A busca no *Phytozome* por genes da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) resultou em 7 genes da CAT e 9 da SOD. Foram selecionados 4 genes da CAT para este trabalho e 5 genes da SOD descritos na Tabela 2. A seleção destes genes foi baseada nas sequências que codificam proteínas completas e com domínios detectados, indicando a sua funcionalidade. As sequências de proteínas sem domínios, assim como as sequências parciais ou repetidas não foram consideradas. As FeSOD também não foram consideradas neste estudo. A Tabela 2 também contém informações preditas relacionadas a esses genes selecionados como o acesso no *Phytozome*, tamanho da sequência do transcrito em pares de base (pb), tamanho da sequência de aminoácidos (aa), a massa molecular (MM) em kDa, ponto isoelétrico (PI) e sua localização na célula.

Tabela 2 - Caracterização molecular dos genes selecionados para este estudo.

Nome da sequência	Acesso no Phytozome	Tam. (pb) ¹				Tam. (aa) ²	MM (kDa) ³	PI ⁴	Localização subcelular
		Total	5'UTR	ORF	3'UTR				
<i>MeCAT</i> seq 1	Manes.05G130700.1	1965	90	1479	396	492	56.8	7.1	Citoplasma
<i>MeCAT</i> seq 2	Manes.05G130500.1	1944	219	1479	246	492	57.3	6.75	Citoplasma
<i>MeCAT</i> seq 3	Manes.18G004500.1	1873	41	1479	353	492	57.14	6.87	Citoplasma
<i>MeCAT</i> seq 4	Manes.02G113300.1	1866	142	1479	245	492	56.7	6.88	Citoplasma
<i>MeSOD</i> seq 1 (CuZn)	Manes.08G145300.1	842	86	480	276	159	16.07	6.58	Citoplasma
<i>MeSOD</i> seq 2 (CuZn)	Manes.08G125400.1	855	79	459	317	152	15.10	5.42	Citoplasma
<i>MeSOD</i> seq 3 (CuZn)	Manes.09G160400.1	1008	129	459	420	152	15.30	5.85	Citoplasma
<i>MeSOD</i> seq 4 (FeMn)	Manes.07G140500.1	1196	37	702	457	233	25.84	7.82	Mitocôndria
<i>MeSOD</i> seq 5 (Mn)	Manes.10G000300.1	847	nd	708	139	235	26.16	8.62	Mitocôndria

¹ tamanho da sequência do transcrito em pares de base (pb); ² tamanho de aminoácidos da sequência (aa); ³ massa molecular (MM (kDa)); ⁴ ponto isoelétrico.

Fonte: A autora (2020)

Observa-se que a MM das CATs e o PI variaram de 56,7 a 57,3 kDa e 6,75 a 7,1 respectivamente. E em relação aos genes da SOD a MM variou de 15,10 a 26,16 kDa e o PI de 5,42 a 8,62 (Tabela 2). A MM de uma proteína corresponde a soma de todos os seus aminoácidos e o PI é o pH no qual uma proteína apresenta carga elétrica líquida igual a zero, portanto, é considerada neutra. Esse parâmetro é crucial para entender a função bioquímica da proteína. Além disso, durante a eletroforese, a direção do movimento de uma proteína em um gel ou outra matriz depende de seu PI, devido a isso, inúmeras proteínas podem ser separadas com base em seu PI (MOHANTA et al., 2019). Os valores de MM e PI das sequências das CATs encontradas nesse estudo estão dentro da faixa de outras catalases monofuncionais, que geralmente são tetrâmeros de polipeptídios contendo heme de 55–84 kDa (PAKHOMOVA et al., 2009). Resultados semelhantes foram descritos nos trabalhos de Wang et al. (2019) estudando a família das catalases em plantas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), estes relataram a MM e o PI variando de 46,9 a 67,5 e 6,2 a 7,4 respectivamente e também nos trabalhos de Alam e Ghosh (2017) com plantas de *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*. Em relação aos resultados encontrados para a SOD, Wang, W. et al. (2017) e Dong et al. (2019) ao

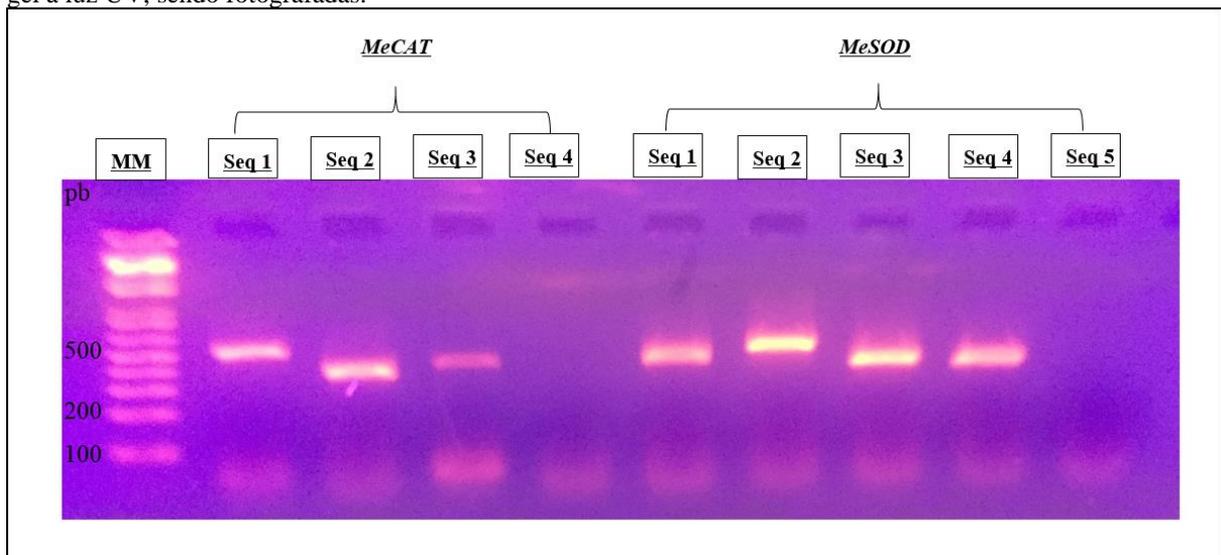
estudarem a identificação dos genes da SOD em todo o genoma das plantas de algodão e milho (*Zea Mays*) respectivamente, encontraram valores semelhantes ao deste estudo, corroborando assim com esta pesquisa.

Ao analisar a predição da localização subcelular, observou-se que todas as CAT se encontram preditas no citoplasma. Segundo Sharma e Ahmad (2014), apesar da CAT ser predominante de peroxissomos, está também pode ser encontrada no citoplasma e nas mitocôndrias da célula. Das sequências das SODs, três foram preditas no citoplasma e duas nas mitocôndrias. A localização das SOD depende muito de sua classificação, onde as Cu-ZnSODs são encontradas geralmente no citoplasma da célula e as MnSODs são principalmente localizadas nas mitocôndrias (TYAGI et al., 2019).

2.3.2 Teste dos iniciadores e padronização dos ciclos para amplificação

A Figura 4 apresenta a visualização no gel de agarose do produto da PCR realizado para testar os iniciadores desenhados para este estudo. Observou-se que para a maioria dos genes foram amplificados fragmentos com tamanhos próximos ao esperado para os amplicons que constam na Tabela 1, exceto os genes da *MeCAT* seq 4 e da *MeSOD* seq 5 que não amplificaram, os quais foram eliminados das posteriores análises.

Figura 4 – Perfil eletroforético, em gel de agarose (1,5% m/v), dos cDNAs da amostra controle resultantes da amplificação, por RT-PCR, utilizando os iniciadores desenhados para este estudo (Tabela 1). Corrida: 70 mAmp/gel, por 30 min. Revelação das bandas: brometo de etídio. As bandas foram visualizadas por exposição do gel à luz UV, sendo fotografadas.

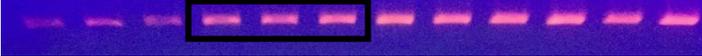
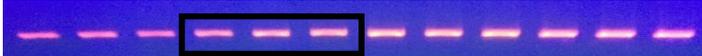
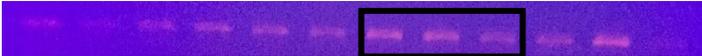
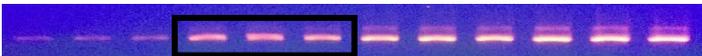
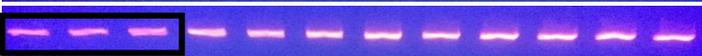


Fonte: A autora (2020)

As padronizações dos ciclos usados para cada gene na análise de expressão estão representadas na Tabela 3. A determinação destes foi feita por meio de ensaios realizados a

partir da amostra controle, considerando a fase exponencial de amplificação no termociclador. Essa fase é escolhida devido ser a fase em que a amplificação está ocorrendo com alta eficiência, onde o aumento da fluorescência é diretamente proporcional ao aumento do produto amplificado (DORAK, 2006). O ciclo da tubulina (*MeTUB*) foi de 28 já determinado por Lima et al. (2018). Para os outros genes, por meio da visualização da eletroforese em gel de agarose, determinou-se que para os sete genes estudados três encontravam-se saturados (perda da atividade da enzima, ou seja, não há amplificação) após 25 ciclos e outros três a partir de 28 ciclos, apenas um gene demonstrou que com 31 ciclos ainda estava na fase exponencial de amplificação.

Tabela 3 - Padronização dos genes selecionados para este estudo (Tabela 1) feita com diferentes números de ciclos (25, 28, 31 e 34) em triplicata.

Nome do Gene	Gel de agarose com os diferentes ciclos				Nº de ciclos utilizado
	25	28	31	34	
<i>MeTUB</i>	-----				28
<i>MeCAT</i> seq 1					28
<i>MeCAT</i> seq 2					28
<i>MeCAT</i> seq 3					31
<i>MeSOD</i> seq 1 (CuZn)					28
<i>MeSOD</i> seq 2 (CuZn)					25
<i>MeSOD</i> seq 3 (CuZn)					25
<i>MeSOD</i> seq 4 (FeMn)					25

Fonte: A autora (2020)

2.3.3 Níveis de expressão diferencial dos genes da SOD e CAT avaliados neste estudo

Neste trabalho foram analisados em nível de expressão sete genes envolvidos na resposta de defesa a explosão oxidativa causada por patógeno em mandioca. Foram utilizadas amostras de raízes de mandioca destacadas do acesso CPATU 359, considerada suscetível a podridão mole das raízes, para extração dos RNAs e produção dos cDNAs. Os tratamentos consistiram de raízes inoculadas e não inoculadas com *Phytophthium* sp., coletados em três tempos (24, 48 e 72 horas após a inoculação - hpi). De forma geral, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,01$) nos níveis de expressão dos genes no acesso de mandioca suscetível a este patógeno (Figuras 5 e 6).

No presente estudo foram observadas alterações significativas nos níveis de expressão para maioria dos genes da SOD estudados (Figura 5). Através da análise do gráfico pode-se inferir que o gene *MeSOD* seq 1, cuja isoforma é Cu/Zn, não teve diferenças significativas entre os tratamentos estudados (controle e inoculado), no entanto em relação aos tempos foi observado uma redução da expressão nas raízes inoculadas com o *Phytophythium* sp., sendo está de aproximadamente 22% no tempo de 72 hpi em relação ao 48 hpi deste tratamento (figura 5-A).

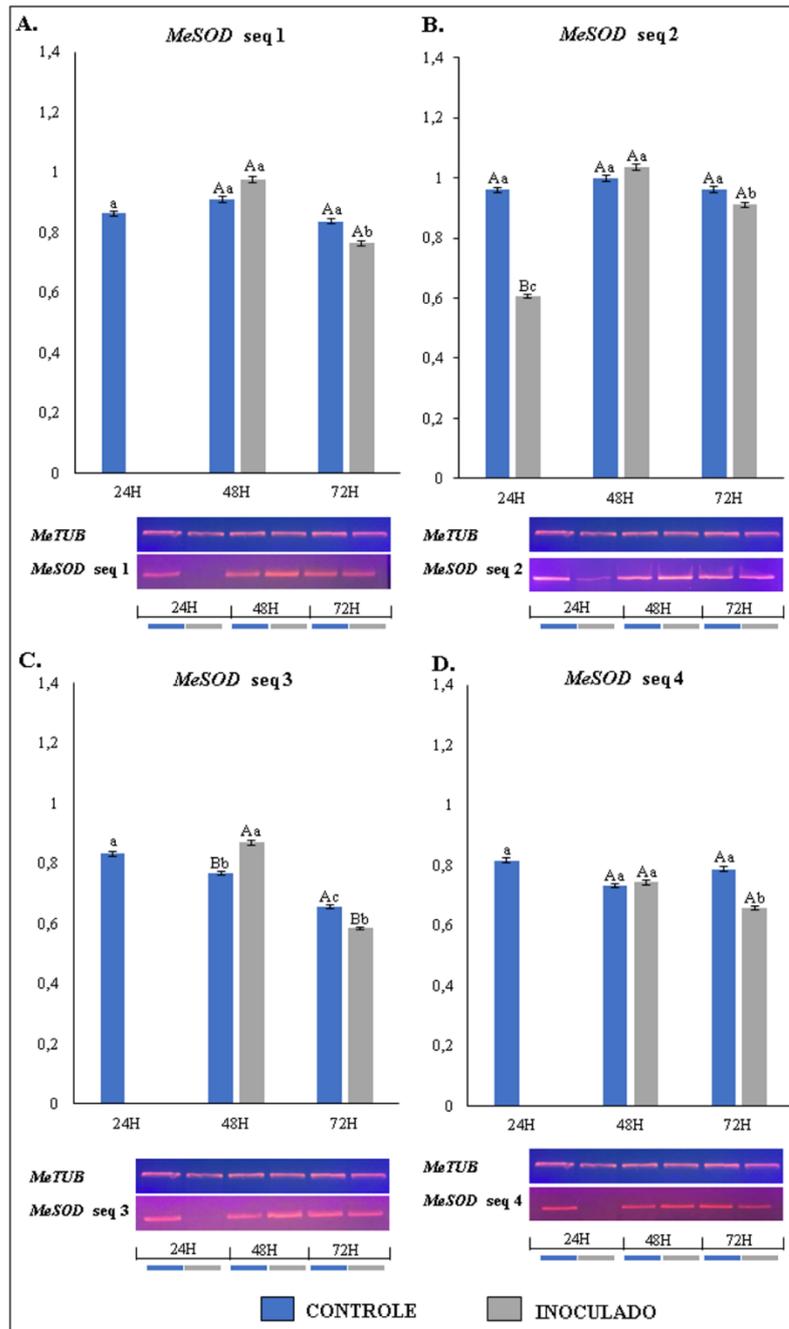
Para o *MeSOD* seq 2 houve diferença entre os tratamentos somente no 24 hpi com uma redução da expressão no material inoculado de 37% em relação ao controle neste mesmo tempo. Ao analisar somente o tratamento inoculado durante os tempos estudados foram observadas diferenças significativas, sendo a mais expressiva ocorrendo no tempo de 48 hpi com um aumento da expressão deste gene em 70% em relação ao tempo de 24 hpi (figura 5-B). O gene *MeSOD* seq 3 também apresentou uma regulação positiva no tempo de 48 hpi nas raízes inoculadas diferindo 13% do tratamento controle para este tempo (figura 5-C).

Em resposta ao estresse biótico, uma reação direta que a planta pode desencadear após uma infecção por patógenos é a explosão oxidativa, resultando no aumento da atividade das enzimas envolvidas na eliminação de EROs (NOWOGÓRSKA; PATYKOWSKI, 2015). A SOD é uma dessas enzimas eliminadoras que ativam o sistema antioxidante das plantas, diminuindo o efeito tóxico do dano oxidativo produzido pelos patógenos. Esta tem como função catalisar a conversão ou dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em plantas (BHOSLE et al., 2019; GILL et al., 2015). Resultados semelhantes foram observados por Lima et al. (2018), onde os autores relataram aumentos na expressão do gene *MeCu/ZnSOD* de mandioca infectada com *Phytophythium* sp, com a maior expressão ocorrendo no material inoculado com 48hpi. Fernández-Ocaña et al. (2011) ao estudarem plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) infectadas pelo patógeno *Plasmopara halstedii* observaram reduções na isoforma Cu/ZnSODs dessa espécie e afirmaram que esta isoforma da SOD é a que suporta a principal defesa antioxidante na célula. Além disso, é a principal responsável por catalisar a desproporção do superóxido (FILIZ; TOMBULOGLU, 2015), e talvez por essas razões a mais utilizada em programas de melhoramento como pode ser visto nos trabalhos de Lightfoot et al. (2017), Lu et al. (2017) e Vicziàn et al. (2014).

Para a SOD de isoforma Fe/Mn, nomeada neste estudo por *MeSOD* seq 4 não houve diferenças entre os tratamentos nos tempos estudados. Entretanto, houve uma redução significativa do tempo de 48 hpi para o de 72 hpi no tratamento inoculado (12%) (figura 5-D). De forma geral, foi observado que as maiores expressões dos genes da SOD ocorreram no

tempo de 48 hpi para o tratamento inoculado. Tyagi et al. (2017) estudando a expressão dos genes *TaCu-ZnSOD* e *TaFe-MnSOD* em plantas de Trigo (*Triticum aestivum* L.) infectadas por *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*) e *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) separadamente, observaram que os genes da isoforma *TaCu-ZnSOD* apresentaram uma tendência de expressão "reversa" nos dois tipos de ataque de fungos, onde genes desta isoforma que foram regulados positivamente na infecção por *Bgt* foram regulados negativamente durante a infecção por *Pst*. Já para os *TaFe-MnSOD* a expressão variou tendo genes que foram regulados positivamente e negativamente em ambas as infecções. Esses achados contribuem com os resultados encontrados neste estudo e demonstram que a interação planta-patógeno possui características específicas podendo ser diferente dependendo das espécies de plantas e linhagens de patógenos (NOWOGÓRSKA; PATYKOWSKI, 2015).

Figura 5 - Análise da expressão gênica da mandioca durante a interação com *Phytophthium* sp. através de ensaios de RT-PCR semi-quantitativa. Para cada gene da SOD, são mostrados valores de nível relativo nas raízes destacadas não inoculadas (controle) e inoculadas nas 24, 48 e 72 hpi. O gene da tubulina de mandioca (*MeTUB*) foi utilizado como controle constitutivo. As intensidades relativas dos produtos de RT-PCR corados com brometo de etídio foram medidas por *ImageJ* e normalizadas contra os valores de tubulina. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (controle e inoculado). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos para cada tratamento. A comparação das médias foi feita por meio do teste de Tukey ($P < 0.01$).



Fonte: A autora (2020)

A Figura 6 apresenta a expressão dos genes da CAT e ao analisá-la podemos observar que houve um aumento significativo na expressão do gene *MeCAT* seq 1 nas raízes inoculadas no tempo de 48 hpi, correspondente à 52% em relação ao controle (figura 6-A). Para o *MeCAT*

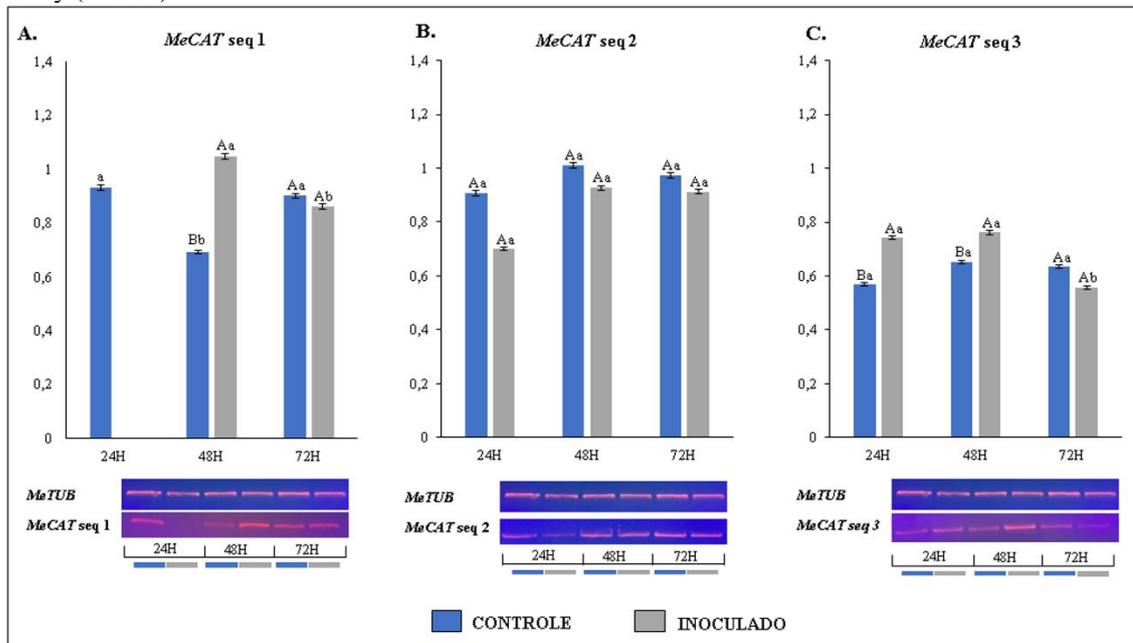
seq 2 não foi observado nenhuma diferença significativa (figura 6-B). Para o gene *MeCAT* seq 3 foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos tempos de 24 e 48 hpi. O aumento mais expressivo ocorreu no tempo de 24 hpi, que foi de 30% nas raízes inoculadas em relação ao controle (figura 6-C).

O estresse biótico, assim como o abiótico estimulam um influxo de Ca_2^+ no citosol das células acarretando no aumento da produção de H_2O_2 (YANG; POOVAIAH, 2002). Além disso, as SODs como já mencionado anteriormente catalisam a conversão do O_2^- para o H_2O_2 aumentando seus níveis no meio celular. A CAT é a principal enzima desintoxicante de H_2O_2 da planta, esta tem com papel principal converter o H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2) mantendo assim o nível de EROs baixo para proteger as células da apoptose induzida por estresse (ALAM; GHOSH, 2017; MHAMDI et al., 2012). Estudos prévios realizado por Cheng et al. (2012) relataram aumentos na expressão dos genes da SOD e CAT ao estudarem a planta de feijão (*Vicia faba* L.) infectados com o patógeno *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*), contribuindo com os dados encontrados neste estudo. Além deste, Wang et al. (2019) estudando plantas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) infectadas com *Verticillium dahliae*, observaram que as CATs das variedades estudadas foram induzidas significativamente, atingindo rapidamente níveis máximos de expressão. Se tratando de expressão em espécies suscetível a doença, os autores El-Argawy e Adss (2016), observaram que em batata (*Solanum tuberosum* L.) inoculadas com *Ralstonia solanacearum*, patógeno causador da podridão parda ou murcha bacteriana da batata, a expressão da CAT foi maior na variedade sensível a doença do que nas variedades consideradas intermediárias e altamente resistentes, isso porque a CAT restringe a ação do H_2O_2 contra o *R. solanacearum*. Em contraste, Farahani et al (2016) encontram aumentos na expressão da CAT em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) infectadas com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* tanto para a cultivar considerada suscetível quanto para a parcialmente resistente quando comparadas com o controle (não inoculadas), no entanto, quando comparadas entre si a cultivar parcialmente resistente teve os maiores incrementos. Na cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) em resposta ao fungo *Sporisorium scitamineum* também foi observado essas diferenças nas cultivares resistentes e suscetível, sugerindo-se que a CAT desempenha um papel importante na defesa da planta contra o patógeno (SU et al., 2014).

Neste estudo pode se observar também que o controle (não inoculado) teve expressões que não diferiram do material inoculado, tanto nos genes da CAT quanto nos da SOD, e isso pode ser atribuído ao método utilizado para a inoculação das raízes para infecção pelo oomiceto, a qual foi perfurada para a inserção do disco contendo o micélio do patógeno, e o

mesmo procedimento foi realizado nas raízes não inoculadas (LIMA et al., 2018). Trabalhos realizados por Iyer et al. (2010) estudando a deterioração fisiológica pós-colheita (PPD) nas raízes de mandioca, relataram uma maior expressão dos genes da SOD e CAT próximas a regiões que as raízes foram lesionadas. Assim como para o patógeno, uma resposta rápida da planta ao ferimento é a explosão oxidativa e de acordo com Zidenga et al. (2012) essa explosão oxidativa nas raízes de mandioca está associada à produção de cianeto.

Figura 6 - Análise da expressão gênica da mandioca durante a interação com *Phytophthium* sp. através de ensaios de RT-PCR semi-quantitativa. Para cada gene da CAT, são mostrados valores de nível relativo nas raízes destacadas não inoculadas (controle) e inoculadas nas 24, 48 e 72 hpi. O gene da tubulina de mandioca (*MeTUB*) foi utilizado como controle constitutivo. As intensidades relativas dos produtos de RT-PCR corados com brometo de etídio foram medidas por *ImageJ* e normalizadas contra os valores de tubulina. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (controle e inoculado). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos para cada tratamento. A comparação das médias foi feita por meio do teste de Tukey ($P < 0.01$).



Fonte: A autora (2020)

2.4 Conclusões

Após a infecção com *Phytophthium* sp., verificou-se aumentos na expressão da maioria dos genes da SOD e CAT da mandioca, podendo estes estar envolvidos na defesa contra este patógeno, no entanto, estudos de análise funcional destes ainda precisam ser mais aprofundados, principalmente usando ensaios de superexpressão e perda de funções.

Além disso, podem também serem usados como marcadores moleculares para revelar a natureza de resistência ou suscetibilidade de plantas de mandioca em resposta a podridão mole causada pelo *Phytophthium* sp..

REFERÊNCIAS

- ALAM, N. B.; GHOSH, A. Comprehensive analysis and transcript profiling of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* catalase gene family suggests their specific roles in development and stress responses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 123, p. 54-64, 2017.
- BHOSLE, S. M.; MARATHE, N.; MAKANDAR, R. The er2 gene resistance against powdery mildew infection is associated with enhanced antioxidative protection and defense gene expression. **Physiological and molecular plant pathology**, v.106, p. 253-262, 2019.
- BOARI, A. J.; CUNHA, E. M.; QUADROS, A. F. F.; BARRETO, R. W.; FERNANDES, A. F. First Report of *Phytophthium* sp. Causing Storage Root Rot and Foliage Blight of Cassava in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, n. 5, p. 1042, 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, n. 11, p. 5363-5366, 2009.
- BRITO, A. C.; OLIVEIRA, S. A. S.; OLIVEIRA, E. J. Genome-wide association study for resistance to cassava root rot. **Journal of Agricultural Science**, v. 155, p. 1424–1441, 2017.
- CAVERZAN, A.; CASASSOLA, A.; BRAMMER, S. P. Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. In: SHANKER, A. (Ed.). **Abiotic and Biotic Stress in Plants**. IntechOpen, 2016. p. 463-479.
- CHEN, H-J.; WU, S-D.; HUANG, G-J.; SHEN, C-Y.; AFIYANTI, M.; LI, W-J.; LIN, Y-H. Expression of a cloned sweet potato catalase SPCAT1 alleviates ethephon-mediated leaf senescence and H₂O₂ elevation. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 86– 97, 2012.
- CHENG, Y.; ZHANG, H.; YAO, J.; WANG, X.; XU, J.; HAN, Q.; WEI, G.; HUANG, L.; KANG, Z. Characterization of non-host resistance in broad bean to the wheat stripe rust pathogen. **BMC Plant Biol**, v.12, p. 96-107, 2012.
- CLAROS, M. G. MitoProt, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins. **Cabios**, v. 11, n. 4, p. 441-447, 1995.
- CONNOR, D. J. An experimentally-calibrated model of photosynthesis, assimilate partitioning and tuber yield in cassava in response to water supply to assist crop management and improvement. **Field Crops Research**, v. 242, 2019.
- COQUEIRO, G. R. **Avaliação de variedades de mandioca no nordeste do estado do Pará**. 2013. 48 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2013.
- DONG, G.; MEI, D.; HANLIN, X.; BAOYUAN, Z.; WEI, M.; ZAISONG, D.; CONGFENG, L.; MING, Z. Genome-wide identification and bio-informatics analysis of superoxide dismutase gene family in *Zea mays*. **Molecular Plant Breeding**, v.10, n. 8, p. 59-67, 2019.
- DORAK, M. T. (Ed). **Real-time PCR**. International University Line, La Jolla, CA, USA, 333p., 2006

EL-ARGAWY, E.; ADSS, I. A. Quantitative gene expression of peroxidase, polyphenoloxidase and catalase as molecular markers for resistance against *Ralstonia solanacearum*. **American Journal of Molecular Biology**, v.6, p. 88-100, 2016.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT** Statistical Database, Statistical Division. Rome, 2019.

FARAHANI, A. S.; TAGHAVI, S. M.; AFSHARIFAR, A.; NIAZI, A. Changes in expression of pathogenesis-related gene 1, pathogenesis-related gene 2, phenylalanine ammonia-lyase and catalase in tomato in response to *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*. **Journal of Plant Pathology**, v. 98, n. 3, p. 525-530, 2016.

FERNÁNDEZ-OCAÑA, A.; CHAKI, M.; LUQUE, F.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, M. V.; CARRERAS, A.; VALDERRAMA, R.; BEGARA-MORALES, J. C.; HERNÁNDEZ, L. E.; CORPAS, F. J.; BARROSO, J. B. Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1303–1308, 2011.

FILIZ, E.; TOMBULOGLU, H. Genome-wide distribution of superoxide dismutase (SOD) gene families in *Sorghum bicolor*. **Turkish Journal of Biology**, v. 39, p. 49-59, 2015.

GILL, S. S.; ANJUM, N. A.; GILL, R.; YADAV, S.; HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M. et al. Superoxide dismutase-mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environ Sci Pollut R**, v. 22, n.14, p. 10375–10394, 2015.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistêmico de produção agrícola**. Brasil, 2020.

IYER, S.; MATTINSON, D. S.; FELLMAN, J. K. Study of the Early Events Leading to Cassava Root Postharvest Deterioration. **Tropical Plant Biology**, v. 3, n.3, p. 151–165, 2010.

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.

LIGHTFOOT, D. J.; MCGRANN, G. R. D.; ABLE, A. J. The role of a cytosolic superoxide dismutase in barley-pathogen interactions. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, p. 323–335, 2017.

LIMA, A. M.; MOURA, E. F.; ISHIDA, A. K. N.; PEREIRA, A. C. C.; dos REIS, S. P.; de SOUZA, C. R. B. Expression profiles of defense genes in cassava storage roots upon exposure to *Phytophthora* sp., causal agent of soft root rot disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 104, p. 23–30, 2018.

LU, F.; LIANG, X.; LU, H.; LI, Q.; CHEN, Q.; ZHANG, P.; LIU, G.; YAN, W.; SONG, J.; DUAN, C. Overproduction of superoxide dismutase and catalase confers cassava resistance to *Tetranychus cinnabarinus*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 40179, 2017.

MHAMDI, A.; NOCTOR, G.; BAKER, A. Plant catalases: peroxisomal redox guardians. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, p. 181–194, 2012.

MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; CHAOUCH, S.; VANDERAUWERA, S.; VAN BREUSEGEM, F.; NOCTOR, G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4197–4220, 2010.

MODESTO JUNIOR, M. S.; ALVES, R. N. B (Eds). **Cultura da mandioca**: apostila. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. 197 p.

MOHANTA, T. K.; KHAN, A.; HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E. F.; AL-HARRASI, A. The molecular mass and isoelectric point of plant proteomes. **BMC genomics**, v. 20, n. 631, 2019.

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

NOWOGÓRSKA, A.; PATYKOWSKI, J. Selected reactive oxygen species and antioxidant enzymes in common bean after *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* and *Botrytis cinerea* infection. **Acta Physiol Plant**, v.37, p. 1725, 2015.

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.

PAKHOMOVA, S.; GAO, B.; BOEGLIN, W. E.; BRASH, A. R.; NEWCOMER, M. E. The structure and peroxidase activity of a 33-kDa catalase-related protein from *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. **Protein Science**, v. 18, p. 2559-2568, 2009.

PROCHNIK, S.; MARRI, P. R.; DESANY, B.; RABINOWICZ, P. D.; KODIRA, C.; MOHIUDDIN, M.; RODRIGUEZ, F.; FAUQUET, C.; TOHME, J.; HARKINS, T.; ROKHSAR, D. S.; ROUNSLEY, S. The Cassava Genome: Current Progress, Future Directions. **Tropical Plant Biology**, v. 5, p. 88-94, 2012.

RAMU, P.; ESUMA, W.; KAWUKI, R.; RABBI, I. Y.; EGESI, C.; BREDESON, J. V.; BART, R. S.; VERMA, J.; BUCKLER, E. S.; LU, F. Cassava haplotype map highlights fixation of deleterious mutations during clonal propagation. **Nature Genetics**, v. 49, p. 959–963, 2017.

RAY, P. D.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, p. 981–990, 2012.

SAMSATLY, J.; COPLEY, T. R.; JABAJI, S. H. Antioxidant genes of plants and fungal pathogens are distinctly regulated during disease development in different *Rhizoctonia solani* pathosystems. **Plos one**, v. 13, n. 2, p. 1-24, 2018.

SHARMA, I.; AHMAD, P. Catalase: A versatile antioxidant in plants. *In*: AHMAD, P. (Ed.). **Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling**. Amsterdam: Academic press, 2014. p. 131-148.

SU, Y.; GUO, J.; LING, H.; CHEN, S.; WANG, S.; XU, L.; ALLAN, A. C.; QUE, Y. Isolation of a novel peroxisomal catalase gene from sugarcane, which is responsive to biotic and abiotic stresses. **Plos One**, v. 9, n. 1, 2014.

TREMACOLDI, C. R. Manejo das principais doenças da cultura da mandioca no estado do Pará. *In: MODESTO JUNIOR, M. S.; ALVES, R. N. B. (Eds). Cultura da mandioca*. Brasília, DF: Embrapa, 2016. p. 161- 170.

TYAGI, S.; SHUMAYLA; SINGH, S. P.; UPADHYAY, S. K. Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Stress Tolerance in Plants. *In: SINGH, S. P.; UPADHYAY, S. K.; PANDEY, A.; KUMAR, S. (Eds.). Molecular Approaches in Plant Biology and Environmental Challenges*. 1 ed. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 51-77.

TYAGI, S.; SHARMA, S.; TANEJA, M.; SHUMAYLA; KUMAR, R.; SEMBI, J. K.; UPADHYAY, S. K. Superoxide dismutases in bread wheat (*Triticum aestivum* L.): Comprehensive characterization and expression analysis during development and, biotic and abiotic stresses. *Agri Gene*, v. 6, p. 1-13, 2017.

VICZIÀN, O.; KÜNSTLER, A.; HAFEZ, Y.; KIRÁLY, L. Catalases may play diferente roles in influencing resistance to virus-induced hypersensitive necrosis. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, v. 49, n. 1, p. 189–200, 2014.

VILAS BOAS, S. A.; de OLIVEIRA, S. A. S.; BRAGANÇA, C. A. D.; RAMOS, J. B.; de OLIVEIRA, E. J. Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. *Scientia Agricola*, v. 74, n. 1, p.60-67, Jan./Fev. 2017.

WANG, J.; WANG, Y.; GAO, C.; JIANG, L.; GUO, D. Ppero, a computational model for plant pts1 type peroxisomal protein prediction. *Plos one*, v.12, n.1, 2017.

WANG, W.; ZHANG, X.; DENG, F.; YUAN, R.; SHEN, F. Genome-wide characterization and expression analyses of superoxide dismutase (SOD) genes in *Gossypium hirsutum*. *BMC Genomics*, v. 18, n. 376, p. 1-25, 2017.

WANG, W.; CHENG, Y.; CHEN, D.; LIU, D.; HU, M.; DONG, J.; ZHANG, X.; SONG, L.; SHEN, F. The catalase gene family in cotton: genome-wide characterization and bioinformatics analysis. *Cells*, v. 8, n. 86, 2019.

XU, J.; DUAN, X.; YANG, J.; BEECHING, J. R.; ZHANG, P. Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots. *Plant Physiology*, v. 161, p. 1517–1528, March 2013.

YANG, T.; POOVAIAH, B. W. Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *PNAS*, v.99, n.6, p. 4097–4102, 2002.

ZIDENGA, T.; LEYVA-GUERRERO, E.; MOON, H.; SIRITUNGA, D.; SAYRE, R. Extending cassava root shelf life via reduction of reactive oxygen species production. *Plant Physiology*, v. 159, n.4, p. 1396-1407, 2012.