

**Metodologia de seleção rápida
para a avaliação da resistência de
genótipos de mandioca a doenças
foliares incitadas pelo complexo
Passalora spp.**



ISSN 1809-5003

Agosto, 2016

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 79

**Metodologia de seleção rápida
para a avaliação da resistência
de genótipos de mandioca a
doenças foliares incitadas pelo
complexo *Passalora* spp.**

*Saulo Alves Santos de Oliveira
Marcondes Araujo da Silva
Vanderlei da Silva Santos
Eder Jorge de Oliveira*

Embrapa Mandioca e Fruticultura
Cruz das Almas, BA
2016

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Rua Embrapa - s/n, Caixa Postal 007
44380-000, Cruz das Almas, Ba
Fone: (75) 3312-8048
Fax: (75) 3312-8097
SAC: www.embrapa.br/fale-conosco/sac/
www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Francisco Ferraz Laranjeira*

Secretária-executiva: *Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro*

Membro: *Áurea Fabiana Apolinário Albuquerque*

Cícero Cartaxo de Lucena

Clóvis Oliveira de Almeida

Eliseth de Souza Viana

Fabiana Fumi Cerqueira Sasaki

Jacqueline Camolese de Araújo

Leandro de Souza Rocha

Tullio Raphael Pereira de Pádua

Supervisão editorial: *Francisco Ferraz Laranjeira*

Revisão gramatical: *Everton Hilo de Souza*

Normalização bibliográfica: *Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro*

Editoração e tratamento de imagem: *Maria da Conceição Pereira B. dos Santos*

Foto da Capa: *Saulo Alves Santos de Oliveira*

1ª edição

Versão online: Agosto (2016).

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Metodologia de seleção rápida para a avaliação da resistência de genótipos de mandioca a doenças foliares incitadas pelo complexo *Passalora* spp. / Saulo Alves Santos de Oliveira... [et al.]. – Dados eletrônicos. – Cruz das Almas, BA : Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2016.

19p. il. . (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Mandioca e Fruticultura, ISSN 1809-5003; 79).

1. Mandioca. 2. Doença de planta. I. Oliveira, Saulo Alves Santos de. II. Silva, Marcondes Araújo da. III. Santos, Vanderlei da Silva. IV. Oliveira, Eder Jorge de. V. Título. VI. Série.

CDD 633.682 (21 ed.)

© Embrapa 2016

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	13
Agradecimentos	18
Referências	18

Metodologia de seleção rápida para a avaliação da resistência de genótipos de mandioca a doenças foliares incitadas pelo complexo *Passalora* spp.

Saulo Alves Santos de Oliveira¹

Marcondes Araujo da Silva²

Vanderlei da Silva Santos¹

Eder Jorge de Oliveira¹

Resumo

Entre os diferentes patógenos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), o complexo *Passalora* spp., é o mais frequente em todo o mundo. Três doenças compõem este complexo: (i) queima das folhas (BILS) causada por *P. vicosae*, (ii) mancha parda (BLS), causada por *P. henningsii* e (iii) mancha branca (WLS), causada por *P. manihotis*. Várias estratégias podem ser usadas para reduzir as perdas, sendo o uso de cultivares resistentes o mais eficaz. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi propor uma nova metodologia para a seleção de acessos de mandioca resistentes à BILS, BLS e WLS, com base em nota máxima de doença observada (MaSDN). Um total de 244 genótipos de mandioca foi avaliado quanto a resistência à *Passalora* spp., em condições de campo. A severidade para BILS e BLS foi avaliada com uma escala de notas de 0 a 5, e para WLS com escala de notas de 0 a 6 ('0': ausência de sintomas e '5' ou '6': desfolha completa). Diferenças na resistência dos genótipos foram encontradas, incluindo a presença de híbridos com resistência múltipla e genótipos suscetíveis às três doenças.

¹ Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas - BA

² Bolsista de Pós-Doutorado, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas - BA

A metodologia de MaSDN foi eficiente na avaliação de uma grande quantidade de genótipos, em um curto espaço de tempo.

Palavras-chave: escala de notas, queima das folhas, mancha parda, mancha branca.

Fast screening methodology for the assessment of cassava resistance to the *Passalora* spp. disease complex

Abstract

Among the several pathogens of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), the *Passalora* spp. complex is by far the most frequent worldwide. Three different diseases make up this complex: (i) blight leaf spot (BLS) caused by *P. vicosae*, (ii) brown leaf spot (BLS) caused by *P. henningsii* and (iii) white leaf spot (WLS) caused by *P. manihotis*. Different strategies can be used to reduce losses, but resistant cultivars are the most effective. Therefore, the objective of this work was to propose a new methodology to screen cassava germplasm for resistance to BLS, BLS and WLS, based on a single score of the maximum disease rate (MaSDN). A total of 244 cassava genotypes were evaluated for the resistance to the *Passalora* spp. diseases, in the field conditions. Disease severity for BLS and BLS was assessed with an arbitrary scale from 0 to 5, and WLS with a scale ranging from 0 to 6 ('0': no symptoms and '5' or '6': complete defoliation). Differences in resistance of genotypes to all disease were found, including the presence of hybrids with multiple disease resistance and genotypes susceptible to all diseases. Evaluations based on the MaSDN supports the screening for resistance of a broad amount of genotypes, in a short time.

Keywords: rate scale, blight leaf spot, brown leaf spot, white leaf spot.

Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um dos recursos alimentares mais importantes para países do continente Africano, da América Latina e países asiáticos, como é o caso da Nigéria, Brasil e Indonésia e atualmente está em expansão (FAO, 2013). Esta cultura é um alimento básico para seres humanos e animais, sendo utilizada como uma fonte de matéria prima para a produção de amido, farinha, etanol e biopolímeros nos países em desenvolvimento (ARYEE et al., 2006; SUPPAKUL et al., 2012). No entanto, a produção de mandioca é fortemente limitada por restrições fitossanitárias, tais como insetos e doenças. Estima-se que mais de 30 diferentes agentes patogênicos possam afetar as plantas de mandioca, tendo alguns, maior ou menor importância econômica.

Dentre as principais doenças da parte aérea da mandioca estão a bacteriose, a antracnose e o superalongamento, não só pela redução da produtividade de raízes das plantas afetadas, bem como, pela redução do rendimento do material de plantio. Apesar da importância secundária, o complexo *Passalora* spp. da mandioca, que engloba as doenças chamadas anteriormente de “cercosporioses”, é o mais frequente em todo o mundo (WYDRA; VERDIER, 2002; BANITO et al., 2007). Três doenças diferentes compreendem este complexo: queima das folhas (BILS) causada por *Passalora vicosae* Mull. & Chupp, mancha parda (BLS), causada por *P. henningsii* Allesch. e mancha branca (WLS), causada por *P. manihotis* Stevens & Solheim. Sob condições favoráveis estas doenças podem causar perdas de até 25% na produção de mandioca (BANITO et al., 2007).

Além disso, estas doenças quando não contribuem para a redução do rendimento final da raiz são importantes por limitarem a utilização de folhas e caules de mandioca para a alimentação

animal, uma vez que, ocasionam perdas da qualidade da parte aérea, podendo levar a desfolha parcial ou completa da planta.

Diferentes estratégias de manejo podem ser utilizadas para evitar perdas com as doenças da parte aérea, e o uso de cultivares resistentes aos diferentes patógenos é a mais eficaz no sistema de produção de mandioca. Na avaliação da resistência de plantas, o método de avaliação deve ser confiável, consistente e reprodutível, além de rápido e fácil de usar, deve ser também diferencial e aplicável a qualquer estágio da doença. Basicamente, existem duas maneiras diferentes de avaliar o nível de doenças da parte aérea: as escalas percentuais (ou escalas diagramáticas) e as escalas arbitrárias; nessa última, a nota é atribuída a cada nível da doença. Para avaliar a resistência de mandioca em condições de campo é comum o uso de algumas escalas arbitrárias (FOKUNANG et al., 2000; WYDRA; VERDIER, 2002).

O objetivo deste trabalho foi propor uma nova metodologia para seleção de resistência à BILS, BLS e WLS, com base em uma única nota máxima da doença (MaSDN), além de compreender melhor a distribuição da resistência entre as diferentes variedades e híbridos gerados pelo Programa de Melhoramento Genético da Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Material e Métodos

Como prova de conceito, para este novo método de avaliação, 244 genótipos de mandioca (variedades e híbridos comerciais), gerados pelo Programa de Melhoramento Genético da Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura, foram avaliadas para a resistência ao complexo de doença *Passalora* spp., com infecção natural em condições de campo.

As avaliações foram realizadas em uma área experimental pertencente à Aliança Cooperativa do Amido (Bahiamido / Coopamido), no município de Laje - BA. O experimento foi instalado em Delineamento em Blocos Aumentados (DBA), com 230 híbridos em fase clonal (tratamentos regulares) e 14 tratamentos comuns (controle), distribuídos em 10 blocos, com cinco plantas por parcela. Variedades comerciais foram utilizadas como controle: Cascuda, Eucalipto, Fécula Branca, Mani Branca, BRS Aramaris, BRS Dourada, BRS Formosa, BRS Gema de Ovo, BRS Jari, BRS Kiriris e IAC-90, juntamente com os novos clones 9602-02, 9655-02 e 9824-09 do programa de melhoramento de mandioca.

As medições da severidade das doenças de parte aérea (BLS, BILS e WLS) foram realizadas nove meses após o plantio, na época das chuvas, quando foi encontrada uma alta incidência de doenças, evidenciada pela distribuição homogênea da doença em todos os 10 blocos. Com o intuito de definir uma metodologia rápida de avaliação de uma grande quantidade de genótipos, em um curto intervalo de tempo, favorecendo a seleção por programas de melhoramento e de seleção participativa, um total de 244 genótipos foram avaliados, incluindo variedades comerciais (testemunhas) e híbridos.

Para WLS foi adotada uma escala que varia de 0 a 6, onde; **0** = sem sintomas; **1** = presença de algumas folhas afetadas no terço inferior da planta; **2** = mais do que 50% de folhas afetadas no terço inferior da planta; **3** = folhas afetadas nos terços médio e inferior; **4** = manchas foliares distribuídas ao longo de toda a planta; **5** = manchas foliares distribuídas por toda a planta, além de amarelecimento e / ou a desfolha do terço inferior; **6** = desfolha completa da planta.

Para BLS e BILS uma escala variando de 0 a 5 foi adotada: **0** = sem sintomas; **1** = presença de algumas folhas afetadas no terço inferior da planta; **2** = manchas no terço parte inferior da planta, além de amarelecimento de parte das folhas afetadas; **3** = mancha

nos terços médio e inferior, além de amarelecimento das folhas afetadas; 4 = manchas foliares distribuídas por toda a planta, além de amarelecimento e/ou desfolha; 5 = desfolha completa da planta.

A fim de permitir a comparação entre tratamentos que dispostos em blocos diferentes (tratamentos regulares), as notas atribuídas em cada bloco foram normalizadas com base médias (mais desvio padrão) nas notas atribuídas aos controles (tratamentos comuns), gerando, assim, um índice de doença corrigido (MeDN). O MeDN foi comparado com a nota de doença máxima (MaSDN) para cada uma das três doenças (WLS, BLS e BILS).

Com o objetivo de garantir resultados imparciais, pelo menos dois avaliadores independentes foram utilizados para cada escala. Para WLS os acessos foram caracterizados como resistentes (R) quando os valores foram inferiores ou iguais a um (média de MaSDN $\leq 1,0$); moderadamente resistente (MR) quando os valores médios MaSDN foram maiores que 1,0 e menores 2,5 ($1,0 < \text{MaSDN} < 2,5$); susceptíveis (S) quando a média para o grupo foi igual ou superior a 2,5, e menor que 4,5 ($2,5 \leq \text{MaSDN} < 4,5$) e extremamente suscetível (ES) quando o valor MaSDN foi igual ou superior a 4,5 ($\text{MaSDN} \geq 4,5$).

Para BLS e BILS os acessos foram caracterizados como resistentes (R) quando os valores foram inferiores ou iguais a um (média de MaSDN $\leq 1,0$); moderadamente resistente (MR) quando os valores médios MaSDN foram entre maiores que 1,0 e menores que 2,0 ($1,0 < \text{MaSDN} < 2,0$); susceptível (S) quando a média para o grupo foi igual ou superior a 2,0, mas menor do que 4,0 ($2,0 \leq \text{MaSDN} < 4,0$) e extremamente susceptíveis (ES) quando o valor MaSDN foi igual ou superior a 4,0 ($\text{MaSDN} \geq 4,0$).

Testes de correlação de Pearson foram realizados para avaliar as associações entre a média das notas das doenças (MeDN) de cinco plantas e os valores da nota máxima da doença (MaSDN).

Com o objetivo de classificar os acessos em diferentes grupos, de acordo com a sua resistência às três doenças, foi realizada uma abordagem de agrupamento Bayesiano com o modelo Gaussiano de mistura finita e algoritmo EM, implementada no pacote “Mclust” no software R (R Development Core Team, 2015), seguido de um agrupamento por K-médias (*K-means*) dos valores de MaSDN, utilizando-se o número de clusters identificados pela abordagem citada anteriormente. Testes de correlação de Pearson foram realizados para identificar as relações “par-a-par” entre as três diferentes doenças de parte aérea com auxílio do software estatístico R (R Development Core Team, 2015).

Resultados e Discussão

A avaliação de campo realizada mostrou diferenças entre os 244 genótipos (variedades comerciais e híbridos) quanto aos níveis de resistência à BLS, WLS e BILS. Para todas as comparações, foram verificadas correlações positivas entre a média das notas das parcelas de cinco plantas (MeDN) e a nota de máxima da doença (MaSDN).

Quando os valores médios das parcelas (MeDN) e a nota máxima (MaSDN) da escala, para as avaliações da BILS, foram comparadas (Figura 1A). Foi observada correlação positiva e significativa ($r = 0,72$, $P < 0,001$) para os dois parâmetros avaliados. As demais comparações mostraram os mesmos resultados, e correlações positivas foram encontradas para BLS ($r = 0,63$, $P < 0,001$) e WLS ($r = 0,95$, $P < 0,001$), Figura 1B e 1C, respectivamente.

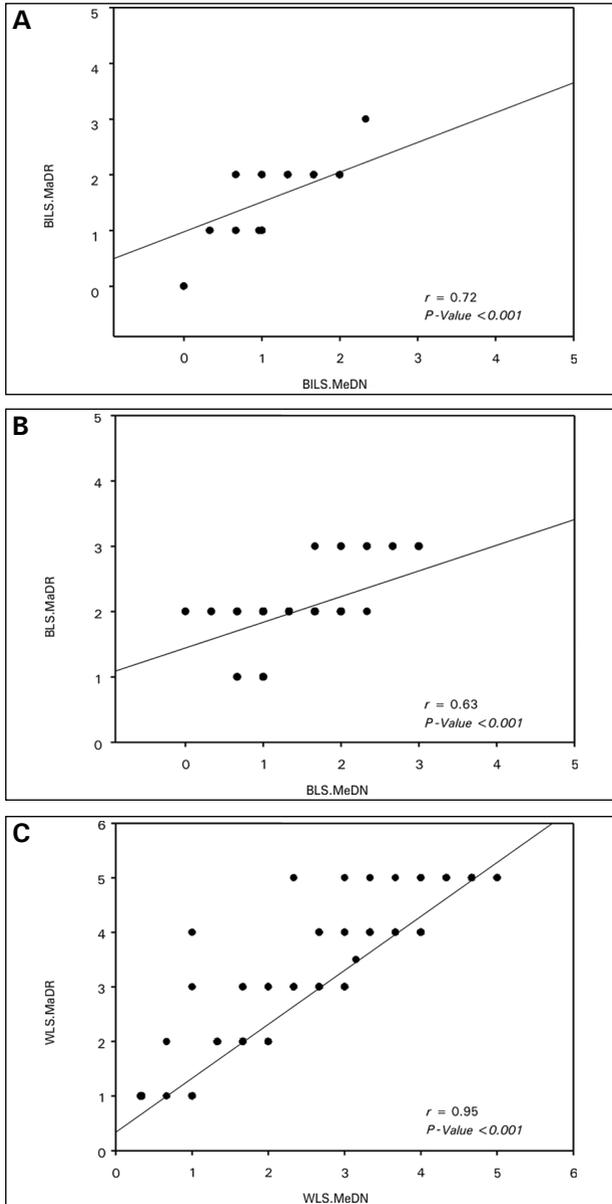


Figura 1. Correlação de Pearson entre a média das notas das doenças (MeDN) e o método de avaliação proposto por meio da nota máxima da doença (MaSDN), a **(A)** queima das folhas (BILS), **(B)** mancha parda (BLS) e **(C)** mancha branca (WLS). Valor de correlação (r) e sua significância ($P\text{-Valor}$) entre os dois parâmetros, são apresentadas.

A comparação entre as diferentes metodologias para a avaliação da resistência à BILS, BLS e WLS mostra que o uso da MaSDN é um método rápido e confiável para estimar o índice de doença de genótipos com origens genéticas diferentes. Uma vez que, em uma avaliação convencional de seleção todas as parcelas de um tratamento precisam ser avaliadas, enquanto que para a MaSDN, apenas a planta que apresenta a maior severidade da doença precisa ser avaliada. Apesar da presença de superestimativa do índice de doença, este não é um problema em ensaios de resistência em mandioca; uma vez que, esta cultura é propagada vegetativamente (manivas ou estacas), sendo todas as plantas clones, e a mesma reação para a doença é esperada. Portanto, a nota máxima encontrada para a doença reflete o grau de susceptibilidade de um genótipo específico.

Este tipo de propagação assegura a uniformidade genética e a manutenção das características da planta mãe. Desta forma, se uma planta de um dado genótipo apresentar índices de doença próximos ao limite da escala (por exemplo, "6" para WLS e "5" para BILS e BLS), provavelmente com uma pressão de inóculo e em condições ambientais favoráveis, todas as plantas do mesmo genótipo tendem a exibir a susceptibilidade máxima da doença.

Os genótipos (híbridos em fase clonal e controles) diferiram em nível de resistência para as três doenças, sendo que, para o WLS (*P. manihotis*) 7,8% dos genótipos foram classificados como resistentes (R), 48,0% como moderadamente resistente (MR), 36,9% como suscetível (S) e 7,4% considerado extremamente suscetível (ES). Os valores variaram de 'MaSDN = 0' para classificados como resistentes (R) para 'MaSDN = 6' para os sete genótipos considerados muito suscetíveis (MS).

A distribuição dos genótipos em diferentes classes, dependendo da resistência foi de 34,0% (R), 54,5% (MR), 11,5% (S) e 0% (ES) para o BLS (*P. henningsii*) e 6,1% (R), 52,9% (MR), 41,0% (S) e 0% (ES) para a BILS (*P. vicosae*). Não houve genótipo classificado como ES para as duas doenças, sendo o valor máximo encontrado 'MaSDN =

4' e '3' para a mancha parda e a queima das folhas, respectivamente. Para aqueles acessos agrupados como resistentes, relacionadas à mancha parda e mancha branca sem sintomas, foram encontrados para ambas as doenças.

As vantagens conseguidas pela utilização da técnica proposta para seleção (com base na MaSDN) será particularmente importante nas fases iniciais de seleção, quando um grande número de genótipos necessitam de avaliação. A metodologia de MaSDN se constitui em uma técnica robusta para encontrar diferenças na resistência/susceptibilidade às três doenças (BILS, BLS e WLS), uma vez que, as variedades foram agrupadas de acordo com o nível de resistência já observada em condições de campo. A abordagem baseada no agrupamento Bayesiano, dividiu os diferentes genótipos em quatro grupos (Log.Likelihood = -773,88 e BIC = -1.663,32) com base nos valores MaSDN (Figura 2).

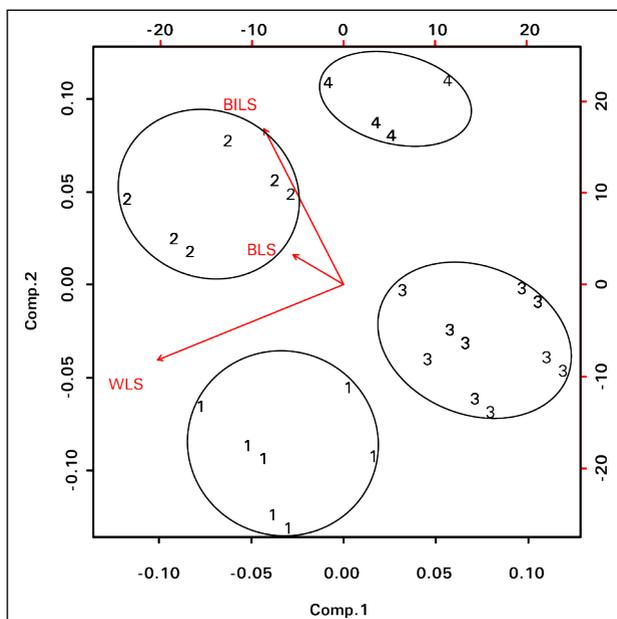


Figura 2. Análise de agrupamento K-médias (*K-means*) para a nota máxima da doença (MaSDN) de variedades comerciais e de híbridos para resistência à mancha parda (BLS), queima das folhas (BILS) e mancha branca (WLS). Cada um dos quatro grupos é representado por um número (1 a 4).

O 'Grupo 1' compreende os genótipos classificados como moderadamente resistentes a BILS e BLS; e suscetível a WLS, incluindo oito variedades comercial (Cascuda, Eucalipto, Fécula Branca, BRS Gema de Ovo, IAC90, BRS Jari, BRS Kiriris e Mani-Branca), além de diferentes híbridos. Um total de 58 genótipos foram agrupados como pertencentes a esse grupo e corresponde a 23,8% dos genótipos analisados.

No 'grupo 2', foram agrupados 51 genótipos (20,9%) considerados como suscetíveis para WLS e BILS, mas resistente à BLS, e a única variedade comercial com este fenótipo foi a cv. BRS Aramaris. O 'grupo 3', foi o maior, com 86 genótipos ou 35 % do total avaliado. Este grupo mostrou características superiores à resistência as três doenças (Figura 2), indicando que os genótipos deste grupo possuem resistência múltipla as três doenças de *Passalora* ssp., que ocorrem no Brasil. Neste agrupamento havia duas cultivares geradas pelo Programa de Melhoramento Genético da Mandioca da Embrapa Mandioca e Fruticultura (BRS Cascuda e BRS Formosa), sendo a cv. BRS Formosa considerada resistente a bacteriose da mandioca (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) em condições de campo (FUKUDA et al., 2002). O 'grupo 4' reúne genótipos que são suscetíveis a BILS, mas moderadamente resistente à BLS e WLS.

Os 14 genótipos utilizados como "tratamentos comuns" também diferiram entre si quanto ao nível de resistência para as três doenças, com destaque para o clone 9655-02 e a cv. 'BRS Formosa', que foram moderadamente resistentes à BLS, WLS e BILS. Os genótipos classificados como extremamente suscetíveis (ES) apresentaram perdas de folhas do terço inferior, e em alguns casos desfolha considerável de toda a planta. Considerando que, para genótipos caracterizados como resistentes, pouco ou nenhum sintoma foi observado.

Agradecimentos

Agradecemos à Aliança Cooperativa do Amido (Bahiamido/Coopamido) pelo suporte financeiro do projeto.

Referências

ARYEE, F. N. A.; ODURO, I.; ELLIS, W. O.; AFUAKWA, J. J. The physicochemical properties of flour samples from the roots of 31 varieties of cassava. **Food Control**, v. 17, p. 916–922, 2006.

BANITO, A.; VERDIER, V.; KPÉMOUA, K. E.; WYDRA, K. Assesment of major cassava disease in Togo in relation to agronomic and environmental characteristics in a systems approach. **African Journal of Agricultural Research**, v. 2, p. 418-428, 2007.

FAO. FAOSTAT. **Production**, 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/default.aspx>>. Acesso em: 8 jun. 2015.

FOKUNANG, C. N.; AKEM, C. N.; DIXON, A. G. O.; IKOTUN, T. Evaluation of a cassava germplasm collection for reaction to three major diseases and the effect on yield. **Genetic Resource and Crop Evolution**, v. 47, p. 63–71, 2000.

WYDRA, K.; VERDIER, V. Occurrence of cassava diseases in relation to environmental, agronomic and plant characteristics. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 93, p. 211–226, 2002.

R DEVELOPMENT Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2015. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 8 jun. 2015.

SANTOS, R. P.; CARMO, M. G. F.; PARRAGA, M. S.; MACAGNAN, D.; LOPES, C. A. Avaliação de cultivares de mandioca, para consumo in natura, quanto à resistência à mancha parda da folha. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 232–237, 2004.

SUPPAKUL, P.; CHALERNSOOK, B.; RATISUTHAWAT, B.; PRAPASITTHI, S.; MUNCHUKANGWAN, N. Empirical modeling of moisture sorption characteristics and mechanical and barrier properties of cassava flour film and their relation to plasticizing-antiplasticizing effects. **LWT-Food Science and Technology**, v. 50, n. 1 p. 290-297, Jan. 2013.



Mandioca e Fruticultura

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



CGPE 13005