



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

**JONNY LÚCIO DE SOUSA SILVA**

**MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA  
RESISTENTES E SUSCETÍVEIS A PODRIDÃO MOLE DA RAIZ**

**BELÉM-PA  
2013**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

**JONNY LÚCIO DE SOUSA SILVA**

**MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA  
RESISTENTES E SUSCETÍVEIS A PODRIDÃO MOLE DA RAIZ**

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.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Elisa Ferreira Moura Cunha

Co-orientadores: Prof<sup>ª</sup>. Dr. Fernanda Ilkiu Borges

Prof. Dr. João Tomé de Farias Neto

**BELÉM-PA  
2013**

---

Silva, Jonny Lúcio de Sousa

Morfoanatômica e histoquímica de genótipos de mandioca resistentes e suscetíveis a podridão mole da raiz./ Jonny Lúcio de Sousa Silva. -Belém, 2013.

39 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus de Belém, 2013.

1. Mandioca. 2. Recurso Genético. 3. Podridão Radicular. 4. Melhoramento. I. Título.

---

CDD – 633.68



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

**JONNY LÚCIO DE SOUSA SILVA**

**MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA  
RESISTENTES E SUSCETÍVEIS A PODRIDÃO MOLE DA RAIZ**

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

Aprovado em agosto de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Elisa Ferreira Moura Cunha – Orientadora  
Embrapa Amazônia Oriental  
Orientadora

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Marco Antonio Menezes  
Universidade Federal do Pará (UFPA)  
1<sup>o</sup> Examinador

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Fábio de Lima Gurgel  
Embrapa Amazônia Oriental  
2<sup>o</sup> Examinador

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Célia Regina Tremacodi  
Embrapa Amazônia Oriental  
3<sup>o</sup> Examinador

Dedico e ofereço esta tese,

Primeiramente a Deus, à Almileny, ao Max Augusto, à minha família e orientadora pelo apoio e força. Sem eles nada disso seria possível.

## AGRADECIMENTOS

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

Gostaria de agradecer à Universidade Federal Rural da Amazônia pela oportunidade de cursar uma pós Graduação de qualidade.

Ao Programa de Pós-graduação da Universidade Federal Rural da Amazônia, em Agronomia, coordenado pela Dra. Herdjania Veras, pela oportunidade.

À CAPES e ao CNPq, pelo auxílio e apoio concedido, que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos componentes da banca por terem aceitado participar e pela preciosa contribuição.

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

À Dr<sup>a</sup>. Fernanda Ilkiu Borges, minha co-orientadora, que abriu as portas do Laboratório de Botânica da Embrapa Amazônia Oriental, juntamente com os funcionários e estagiários em especial a Marta e Edilson que guiaram toda a anatomia dessa dissertação.

Ao professor Dr. Cândido Ferreira pela amizade e companheirismo em toda a graduação e principalmente na pós-graduação com o estagio de docência.

À professora Dr<sup>a</sup> Gisele Barata e ao Professor Dr. Roberto Lisboa por ter aberto as portas do laboratório de fitopatologia e da agroindústria, a fim de complementar os dados de minha dissertação.

Ao Jessivaldo Galvão por sua grande colaboração no processamento de meus dados.

Ao Professor Dr. João Tomé de Farias Neto, por ter acolhido-me em suas viagens de coletas.

Ao funcionário da Embrapa Edison Sampaio, muito contribuiu com as coletas em campo.

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

A todos os professores do curso de graduação, especialmente ao professor Ítalo e Heráclito.

Aos amigos Luma Castro, Francisca e Fábio Júnior que compartilharam seus conhecimentos e ajudaram-me situar dentro do curso e construíram uma amizade firme.

À Marcela Rego por sua ajuda e amizade.

A todos os familiares e amigos meu muito obrigado!

## RESUMO

A mandioca pertence à ordem Malpighiales, e é a única dentre as 98 espécies conhecidas do gênero *Manihot* cultivada para fins de alimentação. Devido a sua alta adaptabilidade ao clima do continente sul-americano e sua aplicabilidade, foi possível sua extensa incorporação nos hábitos alimentares das populações. Atualmente a produção brasileira esta em torno de 23,4 milhões de toneladas de raiz, cerca de 60% da quantidade produzida na Nigéria. Na indústria, a fécula de mandioca tem grande importância pelos seus produtos derivados terem competitividade crescente no mercado de amiláceos. Diante de tamanha importância da cultura da mandioca no Brasil é necessário manter e cuidar desse recurso na forma de coleções de genótipos ou BAGs (bancos ativo de germoplasma). Como em toda monocultura existem diversas doenças que a acometem, como as podridões radiculares que estão entre as doenças que mais causam danos, em regiões úmidas. Dessa forma o controle da podridão radicular deve ser feito de maneira integrada, com adoção de práticas culturais e adoções de genótipos resistentes à doença oriundos de programas de melhoramento e/ou bancos de germoplasma. Dessa forma os caracteres morfológicos de fácil mensuração representam um ganho para o melhoramento genético, pois poupa tempo e recursos no processo de seleção, já que a morfoanatomia associada aos métodos de melhoramento sem dúvida é uma nova arma no combate a podridão radicular. Face à importância da cultura da mandioca para o estado do Pará e considerando que a podridão radicular vem comprometendo a produção, este trabalho teve como objetivo identificar características morfoanatômicas existentes na raiz que estejam associadas à resistência ou suscetibilidade a podridão mole radicular.

Palavras chave: Mandioca, Recurso genético; Podridão radicular; melhoramento.

## ABSTRACT

Manioc belongs to the order of Malpighiales, and is the only one among the 98 species known of the genus *Manihot* grown to produce food. Due to its high adaptability to South American climate, it has been widely incorporated into the population food habits. Brazil Today, The Brazilian production is about 23.4 million tons of manioc roots, or 60% of the amount produced in Nigéria. In industry, manioc starch is very important because its products are very competitive in the starch market. Due to such importance manioc growing in Brazil, it is necessary to maintain and preserve this resource as a genotype or Active Germplasm Bank (AGBs). As in every monoculture diseases also exist, among them root rots, causing in serious damages in the humid As a result, root rot control must be done in an integrated way, adopting growing practices and genotypes resistant to diseases based on breeding programs and/or germplasm bank Thus, easy to measure morphological characters represent a gain for genetic improvement, because it saves time and resources during the selection process, since the morph anatomy associated to improvement methods will certainly become a new weapon in the fight against root rot. Due to the importance of manioc crop in the state of Pará and considering that root rot has been undermining production, this study aimed to identify existing morph anatomical characteristics in the rot associated with resistance or susceptibility to soft root rot.

**Keywords: Manioc, Genetic resource; Root rot; genetic breeding**

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Esquema de corte transversal de raiz de mandioca, exemplificando os componentes.....	22
<b>FIGURA 2:</b> Diferentes seções da raiz de mandioca.....	22
<b>FIGURA 3:</b> Texturômetro TAXT2.....	24
<b>FIGURA 4:</b> Cortes transversais da raiz de mandioca do genótipo BRS Kiriris corados com Astra Blue e Fuccina básica. Imagens correspondentes a sucessivos aumentos de objetiva no microscópio (10x (a), 25x (b) e 100x (c e d)). A imagem D é a continuação da periderme (c) e início do córtex.....	30
<b>FIGURA 5:</b> Cortes transversais de raiz de mandioca visualizados em microscopia eletrônica de varredura, comparando a periderme entre genótipo suscetível Inha (A e C) e resistente BRS Kiriris (B e D) .....	31
<b>FIGURA 6:</b> Cortes transversais comparando a periderme dos genótipos resistentes BRS Kiriris (A), BRS Poti (B), BRS Mari (C) e CPATU 193 (D).....	32
<b>FIGURA 7:</b> Cortes transversais comparando a periderme entre os genótipos Inha (A), Jurara (B), Manivão (C) e Tumase (D), setas em D mostrando a presença de amido na periderme.....	33
<b>FIGURA 8:</b> Superfície da periderme de diferentes genótipos.....	34
<b>FIGURA 9:</b> Secções de raiz de mandioca coradas com lugol evidenciando grânulos de amido. A: BRS Kiriris; B: BRS Poti; C genótipo Inha e D Olho verde. A e B materiais resistentes; C e D suscetíveis a podridão mole da raiz.....	34
<b>FIGURA 10:</b> Micrografia em Xilema especificando o componente de vaso cortados transversalmente no genótipo BRS Kiriris (A) e longitudinalmente no genótipo Tumase (B).....	35
<b>FIGURA 11:</b> Teste histoquímicos com reagente Sudan IV em raiz de genótipos de mandioca ressaltando as diferentes tonalidades. Imagens correspondem à periderme dos genótipos BRS Kiriris em A, BRS Poti em B, genótipo Inha em C e Olho verde em D.....	36

## LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Requisitos utilizados na calibração do texturômetro TAXT2 para avaliação da resistência a penetração em raiz de mandioca.....	24
<b>GRÁFICO 1:</b> Gráfico comparativo de espessura de periderme+córtex em A e xilema em B de raiz de mandioca em três pontos de medições (proximal, mediano e apical), pelo teste Scott-knot a nível de 5% de probabilidade (as letras nas barras diferem apenas os genótipos).....	28
<b>TABELA 2:</b> Caracteres analisados em raiz de genótipos de mandioca pertencente ao Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, suscetíveis e resistentes a podridão mole de raiz com seus respectivos números de aferições, unidades de medida e médias.....	25
<b>GRÁFICO 2:</b> Análises de caracteres da raiz de mandioca, realizadas em genótipos resistente (em vermelho) e suscetíveis (em azul) a podridão mole da raiz , espessura da periderme+córtex mediano (A), espessura de periderme (B), número de células da periderme (C) e textura da raiz (D).....	29
<b>TABELA 3:</b> Médias obtidas de todas as variáveis mensuradas em raiz de genótipos de mandioca resistentes e suscetíveis a podridão mole da raiz.....	26
<b>TABELA 4:</b> Resumo dos resultados da análise de variância para os 11 caracteres mensurados em raiz de genótipos de mandioca resistentes e suscetíveis a podridão mole da raiz.....	27

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS.....</b>	<b>10</b>
<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>16</b>
<b>2 MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA RESISTENTES E SUSCETÍVEIS A PODRIDÃO MOLE DA RAIZ.....</b>	<b>18</b>
2.1 INTRODUÇÃO .....	20
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
2.2.1 Avaliações das características morfoanatômicas .....	21
2.2.2 Lâminas semi-permanentes.....	22
2.2.3 Microscópio Eletrônico de Varredura.....	23
2.2.4 Testes histoquímicos .....	23
2.2.5 Textura da casca da raiz .....	24
2.2.6 Análise estatística.....	25
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
2.3.1 Características morfoanatômicas .....	27
2.3.2 Lâminas semi-permanentes.....	30
2.3.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	31
2.3.4 Testes histoquímicos .....	34
2.3.5 Análise de textura.....	37
<b>3 CONCLUSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>37</b>

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A mandioca é um arbusto pertencente à ordem Malpighiales, família Euphorbiaceae, gênero *Manihot* e espécie *Manihot esculenta* Crantz. A espécie *M. esculenta* é a única dentre as 98 espécies conhecidas do gênero *Manihot* cultivada para fins de alimentação em todo o mundo (ESPM/SEBRAE, 2008).

Devido a sua alta adaptabilidade ao clima do continente sul-americano e sua aplicabilidade, foi possível a extensa incorporação da mandioca aos hábitos alimentares das populações, já que esta oferece grande fonte de carboidrato, com baixos custos de produção, elevando sua importância social significativa em países tropicais de baixa renda (O'HAIR, 1998).

Na Nigéria são produzidas aproximadamente 52,4 milhões de toneladas (FAO, 2011) de mandioca, a maior parte consumida no próprio país. A mandioca nos países africanos é comercializada em pequenas quantidades nas feiras, mercearias e propriedades produtoras. Esta produção africana, de pouca agregação de valor ao produto, apresentou um crescimento significativo nas últimas décadas, figurando como maior produtora mundial (ESPM/SEBRAE, 2008 ; FAO, 2011).

A produtividade em toneladas/hectare varia bastante entre os países. A Nigéria, localizada na África, mais especificamente no norte, possui o maior índice de 49,1 t/ha. O Brasil está acima da média, com uma produtividade média de 13,7 t/ha (IBGE, 2012) enquanto que nos demais países produtores a média é de 10,9 t/ha (ESPM/SEBRAE, 2008).

Em segundo lugar na lista de maiores produtores mundial de raiz de mandioca, temos o Brasil que segue a tendência dos países da América Latina e do sudeste asiático ao focar seus investimentos na crescente industrialização da mandioca. Atualmente a produção brasileira gira em média de 23,4 milhões de toneladas (IBGE, 2012) de raiz, cerca de 60% da quantidade produzida na Nigéria. No Brasil os maiores produtores se apresentam com 60 milhões de consumidores, distribuídos entre o Nordeste, Pará, Paraná e Bahia, figurando assim como maiores consumidores de alimentos obtidos a partir da mandioca (IBGE, 2009). Dados do IBGE (2005) permitiram construir uma lista onde o estado do Pará tem seis municípios (dentre todos do Brasil) com maior produção, onde o município do Acará foi eleito o maior produtor (com baixa produtividade) em uma área de 45 mil ha plantados e produção de 720 mil toneladas (IBGE, 2005). Se for considerada a produtividade, destaca-se o município de Aurora (PA), com produtividade média de 22 t/ha. Toda essa produção paraense está destinada ao consumo interno, sobrando uma baixa porcentagem para comercialização fora do estado, já que o consumo de seus diversos subprodutos tais com fécula, farinha, goma, massas, tucupi entre outras é elevado.

No Pará o principal produto obtido da mandioca é a farinha, por apresentar um amplo mercado consumidor interno, tornando-se assim uma importante fonte de carboidrato para uma significativa parcela da população de menor poder aquisitivo.

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

Diante de tamanha importância da cultura da mandioca no país é necessário manter e cuidar desse recurso na forma de coleções de genótipos de mandioca. No Brasil esse recurso genético é mantida no campo, apesar de ser uma das formas mais caras de manutenção ao se comparar com os BAGs mantidos *in vitro* que poupam espaço, mão-de-obra, e apresentam baixos índices de perda. Em função disso na manutenção em campo o risco de perda é constante, principalmente por ataques de doença como a podridão radicular e variações bruscas de clima. Entretanto, a vantagem de se manter o germoplasma de mandioca no campo é a facilidade de oferta rápida do material vegetativo para serem inseridos em programas de melhoramento. A conservação por meio de sementes é mais comum para espécies com sementes ortodoxas, não sendo utilizada para espécies silvestres com dificuldade de germinação.

A grande quantidade de genótipos de mandioca existente no Brasil está distribuída em sete bancos ativos de germoplasma regionais, localizados na Amazônia (oriental e ocidental), nos Tabuleiros Costeiros, Semi-árido, Cerrados, Subtrópico e em Campinas (SP) (COSTA et al., 2003). Apesar da grande variabilidade genética existente nesses bancos, a mandioca tem sido pouco estudada sob o ponto de vista morfológico. COSTA et al. (2003) discutiram as poucas informações existentes sobre o estudo da mandioca, principalmente as relacionadas à documentação e caracterização genética que refletem em perdas de informações e conseqüentemente erosão das fontes de genes para utilizações futura.

As podridões radiculares estão entre as doenças mais comuns causadas por fitopatógenos habitantes do solo, pois ocorrem na maioria das espécies cultivadas e apresentam uma ampla gama de sintomas. Nessas doenças, as raízes das plantas são afetadas e os tecidos radiculares tornam-se necróticos. O sistema radicular inteiro de uma planta ou somente uma pequena área próxima ao local de penetração inicial do patógeno pode tornar-se infectada (MICHEREFF et al., 2005). Muitas podridões radiculares causam a morte rápida da planta, enquanto outras causam somente sintomas leves e têm impacto mínimo no desenvolvimento da planta. Frequentemente, patógenos causadores de podridões radiculares são capazes de causar diferentes tipos de doenças em uma única espécie de

planta, mas em grande parte o desenvolvimento de sintomas específicos em uma planta individual é regulado pelo tempo de infecção e pelo ambiente do solo, principalmente temperatura e umidade (MICHEREFF et al., 2005).

As podridões moles estão associadas a órgãos de reserva e que em geral os sintomas iniciam com pequenas manchas de aspecto encharcado, deprimido e descolorido com rápida evolução necrótica, por liberação de substâncias pectinolíticas que matam as células em contato rapidamente caracterizando a origem necrotrófica (altamente agressivo) do patógeno (AMORIN et al., 2011). Os principais responsáveis pelas podridões moles na raiz de mandioca pertencem ao gênero *Phytophthora spp* e *Pythium spp*, que por sua vez necessitam de água para se reproduzir e locomover seus esporos (zoósporos biflagelados), explicando os sintomas mais graves na época das chuvas e em áreas encharcadas (AMORIN et al., 2011).

O controle da podridão radicular deve ser feito de maneira integrada, com adoção de práticas culturais, genótipos resistentes à doença (LEITE & MARINGONI, 2002) oriundos de programas de melhoramento e/ou bancos de germoplasma. A avaliação de características que promovam a resistência ao patógeno é fundamental para a seleção dos genótipos resistentes à doença, se constituindo como método fundamental no controle de seu avanço. A Embrapa já lançou algumas variedades resistentes à podridão mole da raiz (FUKUDA et al. 2002), resultado da seleção de materiais resistentes e do cruzamento entre eles. Entretanto, a resistência precisa estar associada a materiais mais produtivos e que atendam outros propósitos, como a indústria da fécula ou para mesa (ESPM/SEBRAE 2008), entre outros objetivos do cultivo da mandioca. Assim, novos materiais resistentes à podridão mole da raiz devem ser identificados.

A mandioca é uma espécie propagada principalmente vegetativamente. A propagação é feita com estacas semi-lenhosas de onde saem raízes adventícias que começam a tuberizar cerca de um mês após o plantio. A tuberização das raízes ocorre com o acúmulo de amido, principalmente, no xilema, logo após o início de crescimento secundário (MORAES-DALAQUA, 2002). Estas se tornam fibrosas e têm papel primordial na produção de raízes tuberosas devido a sua função em suprir as necessidades de água e nutrientes da planta.

Raiz com um maior número de elementos de vasos, parênquimas mais densos, compactos e espessos são desejáveis, pois contribuem para uma maior reserva de amido e translocação de água e nutrientes, com implicação na tolerância à seca (NASSAR et al, 2008), podendo estar relacionadas ainda com à resistência a patógenos, uma vez que tecidos mais compactos e espessos oferecem uma barreira mecânica para microrganismos.

Em trabalho realizado com raiz de soja que buscou analisar barreiras físico-químicas na área radicular (THOMAS et al. 2007), verificou-se que as paredes suberizadas da epiderme e endoderme

estabelecem se há ou não pré-formação de suberina (naturalmente presentes nas plantas não infectadas) que pode ter um papel na resistência parcial a podridão radicular da soja (*Phytophthora sojae* Kaufm & Gerd). Este trabalho analisou, ainda, a suberina total presente na raiz de soja e concluiu que há quantidades de suberina maiores na cultivar resistente do que na suscetível.

Em casa de vegetação foi investigada a indução de resistência em cana-de-açúcar a partir de três compostos (Coda Radimax, Coda Humus-PKe Coda Vit) visando induzir principalmente a deposição de lignina e suas proporções no córtex e cilindro vascular, experimento este que mostrou um incremento da resistência física das amostras tratadas sem qualquer modificação anatômica das raízes (CHAVES, 2009).

Há pouca literatura a respeito de anatomia de espécies do gênero *Manihot* (NASSAR et al., 2010). Esta carência de informação fortalece a necessidade de estudos anatômicos a respeito de espécies do gênero.

A resistência da mandioca à podridão mole da raiz parece possuir herança multigênica. ALVAREZ et al. (2002) realizaram cruzamentos entre genótipos suscetíveis e resistentes à podridão mole da raiz e verificaram que a descendência apresentava distribuição normal para a característica e que alguns genótipos que se mostraram resistentes em uma safra se mostraram suscetíveis em outra, indicando baixa herdabilidade, o que está associado a caráter de herança quantitativa. Além disso, observações de pesquisadores da área indicaram que materiais de mandioca com o córtex mais espesso têm tendência a ser mais resistentes (PHILIP et al., 1991) a podridão mole da raiz, o que merece ser investigado. A possibilidade de selecionar resistência a uma doença com base em caracteres morfológicos de fácil mensuração representa um ganho para o melhoramento genético, pois poupa tempo e recursos no processo de seleção.

A morfoanatomia associada aos métodos de melhoramento sem dúvida é uma nova arma no combate a podridão radicular. ROMÁN-AVILES et al. (2004) conseguiram identificar caracteres morfológicos da raiz de feijão que tornavam a planta resistente a uma podridão causada por *Fusarium sp.*. A investigação utilizando metodologias de anatomia e testes histoquímicos, que não são facilmente mensuráveis, pode ajudar a elucidar a forma como a planta possui resistência a doença.

Face à importância da cultura da mandioca para o estado do Pará e considerando que a podridão radicular vem comprometendo a produção de raízes, este trabalho teve como objetivo identificar características morfoanatômicas existentes na raiz que estejam associadas à resistência física a podridão radicular. Portanto, espera-se que os genótipos apresentem no conjunto periderme+córtex, pelo menos uma característica física que esteja associada à resistência.

## BIBLIOGRAFIA

- ÁLVAREZ, E.; LOKE, J.; RIVERA, S.; LLANO, G. Genética de la resistencia a pudrición causada por *Phytophthora tropicalis* em dos poblaciones segregantes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Fitopatologia Colombiana, v.26, p.61-66, 2002.
- AMORIN, L., J. REZENDE, AND A. FILHO, EDS., 2011, manual de fitopatologia: Principios e conceitos, v. Volume 1: São Paulo, Lilian Amorin Jorge Alberto Marques Rezende Armando Bergamin Filho 704 p.
- CHAVES, A. ; PEDROSA, E.M.R ;PIMENTEL, R.M.M.; Maranhão, S.R.V.L. Resistance Induction for *Meloidogyne incognita* in Sugarcane through Mineral Organic Fertilizers. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY, v52, n. 6: p.1393-1400, 2009.
- COSTA, M. R.; CARDOSO, E. R.; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. Ciênc. agrotec., Lavras, v.27, n.1, p.158-164, 2003.
- ESPM/SEBRAE, 2008. estudo de mercado sobre a mandioca (farinha e fécula), estudos de mercado. ESPM/SEBRAE, <<http://www.sebrae.com.br/setor/mandiocultura>>, SEBRAE, p. 81.
- FAO, F. A. A. O., 2011, Food and Agricultural commodities production, <<http://faostat.fao.org>>.
- LEITE, M.V.B.C.; MARINGONI, A.C. Principais doenças e seu controle. In: CEREDA, M.P. (ed.) Agricultura: tuberosas, amiláceas latino-americanas (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas v.2). São Paulo: Fundação Cargill. 2002, p.370-383.
- MORAES-DALLAQUA, M.A. DE.; CORAL, D.L. Mor-anatomia. In: CEREDA, M. P. (Coord). Agricultura: Tuberosa amiláceas Latino-americanas. Sao Paulo: Fundação cargiçç, 2002. 540 p. (serie: Culturas de tuberosas amiláceas latino-amerianas, 2)
- MICHEREFF, SAMI J. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais.1.ed.Pernambuco: UFRPE. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. 2005, 399p.
- NASSAR NM, ABREU LF, TEODORO DA AND GRACIANO-RIBEIRO D (2010). Drought tolerant stem anatomy characteristics in *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) and a wild relative. *Genet. Mol. Res.* 9: 1023-1031.
- NASSAR NM, HASHIMOTO DY AND FERNANDES SD (2008). Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. *Genet. Mol. Res.* 7: 16-28.
- O'HAIR, STEPHEN. Cassava. New Crop (site virtual). Indiana (EUA): Center for New Crops & Plant Products, 1998. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop>>. Acesso em: 20 mar. 2007.
- PHILIP T, GOVINDAIAH C, SENGUP AK, NAIK VN (1991) Anatomical nature of resistance in mulberry genotypes against *Cerotelium fici* causing leaf rust. *Indian Phytopath* 44(2):249–251
- ROMÁN-AVILES, B.; SNAPP, S.S.; KELLY, J.D. Assessing root traits associated with root rot resistance in common bean. *Field Crops Research*, v.86, p.147-156, 2004.

THOMAS, R.; FANG, X.; RANATHUNGE, K.; ANDERSON, T.R; PETERSON, C.A.; BERNARDES, M.A. Soybean root suberin: anatomical distribution, chemical composition and relationship to partial resistance to *Phytophthora sojae*. Plant Physiology, v.144, p.299-311, 2007.

## 2 MORFOANATOMIA E HISTOQUÍMICA DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA RESISTENTES E SUSCETÍVEIS A PODRIDÃO MOLE DA RAIZ

### RESUMO

O cultivo da mandioca tem um papel importante no Brasil, tanto como fonte de alimento, quanto como geradora de emprego e renda. Como toda monocultura, a mandioca tem sua produção limitada pela incidência de doenças, especialmente pela podridão mole da raiz, em regiões quentes e úmidas. A obtenção de variedades resistentes é uma das formas de controle da doença e a identificação de características que facilitem a identificação da resistência é o primeiro passo para o melhoramento genético. Diante disso, o objetivo do trabalho foi verificar se há características morfoanatômicas na raiz da mandioca que estejam associadas à resistência a podridão mole da raiz. Para isso, foram avaliados parâmetros morfológicos, físicos, anatômicos e histoquímicos nas raízes de quatro variedades resistentes a podridão mole da raiz e de outras cinco variedades suscetíveis. As coletas foram realizadas no município de Igarapé-Açu-PA, em área livre do histórico de infestação da podridão mole da raiz. As amostras coletadas foram submetidas a medições da periderme, periderme e córtex, e do xilema. Foi medida a força de penetração (textura), feitas a contagem do número de células da periderme e a quantificação de lignina e monômeros de lignina. Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelos testes de Scott-Knot ( $p>0,05$ ), que constatou diferenças estatísticas para a maioria. Das variáveis analisadas os dados quantitativos obtidos a partir de nove genótipos foram submetidos à análise de variância, gerando diferenças estatísticas entre os genótipos, para a maioria dos testes a nível de 5% de significância, e algumas com 1% de significância. Diante de todas as análises realizadas não foi possível estabelecer uma distinção de genótipos resistentes dos suscetíveis, mas deixou implícito que devem existir componentes químicos presentes na raiz associados à resistência a podridão radicular em mandioca.

Palavras chaves: Anatomia; histoquímica; melhoramento genético; *Manihot esculenta* Crantz.

## ABSTRACT

Manioc growth has an important role in Brazil as a source of both food and job and income. As any monoculture, manioc has a production limited by the incidence of diseases, mainly the soft rot of the root, in hot and humid regions. The acquisition of resistant varieties is a form of disease control, and the identification of characteristics that facilitate the resistance is the first step for genetic improvement. Therefore, the aim of this paper was to verify if there are morpho-anatomical characteristics in the manioc root associated with resistance of soft rot of the root. For this purpose, it was analyzed the morphological, physical, anatomical and histochemical parameters from the roots of four varieties resistant to soft rot of the root and from other five susceptible varieties. The collection was done in the Municipality of Igarapé-Açu-PA, with a history free of occurrences of soft rot of the root. The collected samples were subjected to measurement of periderms, periderms and cortex, and xylem. Measurements were done in the root penetration force (texture), and also counting of the number of periderms cells, and quantification of lignin and monomers and monomers of lignin. The results were subjected to analysis of variance and the means compared to Scott-Knot tests ( $p>0.05$ ) which showed statistical differences for most of them. From the analyzed variables, the quantitative data obtained from nine genotypes were subjected to variance analysis which showed statistical differences between the genotypes for most of the tests at level of 5% of significance, and some with 1% of significance. Based on the analysis it was not possible to determine a differentiation between resistant genotypes from the susceptible ones, but suggested that there must be chemical components in those roots associated with resistance to soft rot of manioc root.

Keywords: Anatomy; histochemical; genetic improvement; *Manihot esculenta* Crantz.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O cultivo da mandioca no Brasil é fundamental tanto como fonte de alimento, quanto como geradora de emprego e renda. Nas regiões norte e nordeste, para famílias com renda de um salário mínimo em média, apresenta-se como principal fonte de carboidratos.

Do ponto de vista econômico, o Brasil destaca-se como segundo maior produtor mundial de mandioca, atrás somente da Nigéria. Segundo dados do IBGE a produção brasileira totalizou 23,4 milhões de toneladas o equivalente a 11,9% do total produzido no mundo e o Pará teve participação de 4,77 milhões de toneladas (IBGE, 2012).

Como toda monocultura, a mandioca tem sua produção limitada pela incidência de doenças. A região do trópico úmido apresenta-se com maior incidência, já que o clima com alta pluviosidade facilita a proliferação dos agentes causais das podridões. A principal doença da mandioca nas regiões úmidas do Brasil é a podridão mole da raiz, cujos principais sintomas são amarelecimento, murcha e queda das folhas e raízes com coloração marrom, desintegração com aspecto aquoso e odor fétido, podendo levar à perda total das lavouras. No Estado do Pará POLTRONIERI et al. (1997) identificaram, além de *P. drechsleri*, *P. nicotianae*, *P. richardiae* e *Pythium scleroteichum* como responsáveis por podridões moles.

A produtividade da mandioca tende a aumentar conforme a época mais tardia de colheita, já que se obtém maior produtividade, maior teor de amido e menor teor de umidade da raiz (MOURA, 1998). Porém, em fases mais tardias, a incidência da podridão mole da raiz é bem maior.

Diante de tais problemas sanitários e dos grandes debates sobre a utilização dos defensivos agrícolas, os pesquisadores buscaram no melhoramento uma saída no combate dos principais patógenos que prejudicam a cultura da mandioca. A intensificação dos trabalhos de recombinação por meio de cruzamentos tem apresentado ganhos significativos nos últimos anos, com o lançamento de híbridos resistentes a insetos-pragas e doenças, com alto potencial de rendimento de raízes e aceitação (Fukuda, 2007).

Diante dos estudos a cerca do melhoramento da mandioca este trabalho tem como objetivo principal verificar se existe relação entre características morfoanatômicas e a resistência ou a suscetibilidade das raízes de mandioca a podridão mole da raiz.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados nove genótipos de mandioca com conhecido histórico de resistência e suscetibilidade à doença podridão mole da raiz. Os genótipos pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de mandioca da Embrapa Amazônia Oriental. Foram plantados em Igarapé Açu, em área livre da ocorrência da doença. A região de Igarapé-Açu possui clima tropical úmido,

com temperatura média anual de 32 °C e precipitação média anual de 3000 mm (INMET, 2011). As plantas foram cultivadas a pleno sol, sob espaçamento de 1,0 x 1,0 m em fileiras de dez plantas por genótipo. A condução da cultura seguiu as recomendações preconizadas no sistema de produção da mandioca (MATTOS AND BEZERRA, 2003).

Foram utilizados os genótipos resistentes lançados pela Embrapa BRS Kiriris (FUKUDA et al., 2006), BRS Poti, BRS Mari (ALBUQUERQUE, 2008 -A, B) e o genótipo CPATU 193 (somente para análise microscopia de varredura) que segundo as sucessivas propagações realizadas pela Embrapa, apresenta resistência a podridão mole da raiz. Os demais materiais (01 Pacaja, Manivão, Jurará, Inha e Olho Verde) utilizados já demonstraram sinais de suscetibilidade nas avaliações do BAG de mandioca.

Para todos os testes foram utilizadas três materiais resistentes (BRS Kiriris, BRS Poti e BRS Mari) e cinco suscetíveis (01 Pacaja, Manivão, Jurará, Inha e Olho Verde) com exceção apenas para a microscopia de varredura que teve acréscimo do genótipo CPATU 193 (resistente).

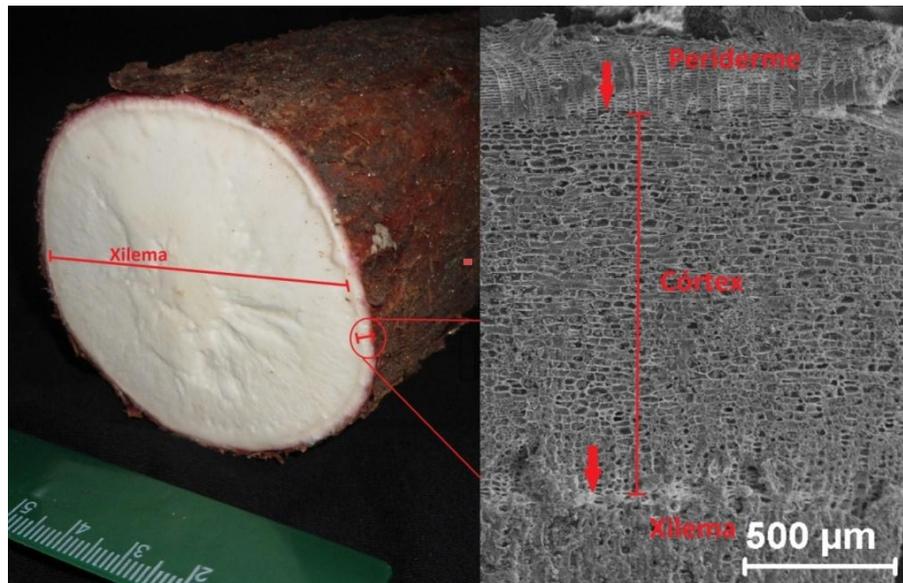
Para todos os testes foram utilizadas raízes com 12 meses de idade a partir do plantio.

As coletas foram realizadas na cidade de Igarapé-Açu e destinadas primeiramente à confecção de lâminas semi-permanentes, a fim de realizar a contagem de células, e medir a espessura da periderme. Foram ainda realizadas medições biométricas de periderme+córtex e xilema, testes histoquímicos, a fim de constatar qualitativamente a partir dos reagentes Sudan IV e Lugol a presença de ácido graxo e amido. Também foi realizada a análise de textura, assim como a quantificação de lignina e monômeros de lignina.

As amostras destinadas à confecção de lâminas semi-permanentes foram submetidas à fixação por FAA 70% durante 24 horas e subsequente armazenamento em álcool etílico PA 70%.

### 2.2.1 Avaliações das características morfoanatômicas

Após doze meses do plantio, cortes transversais nas raízes foram submetidas à mensuração da periderme, do conjunto periderme + córtex e xilema (Figura 1).



**FIGURA 1:** Esquema de corte transversal de raiz de mandioca, exemplificando os componentes.

Foram realizadas com um paquímetro as medições do diâmetro do xilema e da espessura da casca em três segmentos apical, mediano e basal da raiz (Figura 2). Essas medições foram realizadas em três raízes de uma planta, totalizando três plantas de cada um dos oito genótipos analisados, totalizando nove medições por planta e 27 medições por genótipo.

A periderme situa-se na porção mais externa da raiz, já o córtex é a porção que compreende a fração entre a periderme e o xilema mais especificamente entre o câmbio e a periderme (Figura 1). Em cada um desses segmentos (Figura 2) da raiz da mandioca foram feitos cortes a faca e escolhidos pontos aleatoriamente no cilindro vascular (área cortada) para as medições de periderme/córtex e xilema.



**FIGURA 2:** Diferentes seções da raiz de mandioca

### 2.2.2 Lâminas semi-permanentes

Foram realizados cortes anatômicos a mão livre e montadas lâminas semi-permanentes, para cada genótipo, nos planos longitudinais radial e transversais principalmente. Os cortes foram corados com Astrablau 1% e fucsina básica 1% em corpos de prova devidamente orientados, seguindo técnica usual em anatomia vegetal (KRAUS & ARDUIN, 1997). Nesses cortes foram medidas espessura (em micrômetros) e quantidade de células da periderme da raiz de mandioca.

### 2.2.3 Microscópio Eletrônico de Varredura

Foram utilizados nove genótipos diferentes sendo acrescido apenas a CPATU 193 distinto dos materiais já utilizados. Os fragmentos foram submetidos ao processo de desidratação em série alcoólica etanólica (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%), em um período total de 2 horas e 20 minutos. Em seguida, foram conduzidos ao processo de obtenção de ponto crítico e metalização com pó de ouro, a fim de que possam ser depositados, devidamente organizados, em suportes circulares de metal (*stubs*), com a finalidade de obtenção de eletromicrografias em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JMS-5400 LV, JEOL, do Laboratório de Geologia do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará. As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio de luz com câmara digital acoplada.

A mensuração dos cortes foi basicamente através de comparações entre genótipos resistentes e suscetíveis a partir da periderme.

### 2.2.4 Testes histoquímicos

Foram confeccionadas lâminas a partir de materiais coletados com 12 meses de idade no município de Igarapé-Açu, fixados em FAA 70% e armazenados em álcool 70%. Foram feitos cortes a mão livre com lâminas de aço no sentido transversal.

O material foi submetido a testes histoquímicos para identificação de grãos de amido, utilizando solução de Lugol 1%, por cinco segundos, sobre os cortes (BERLYN E MIKSCHE, 1976).

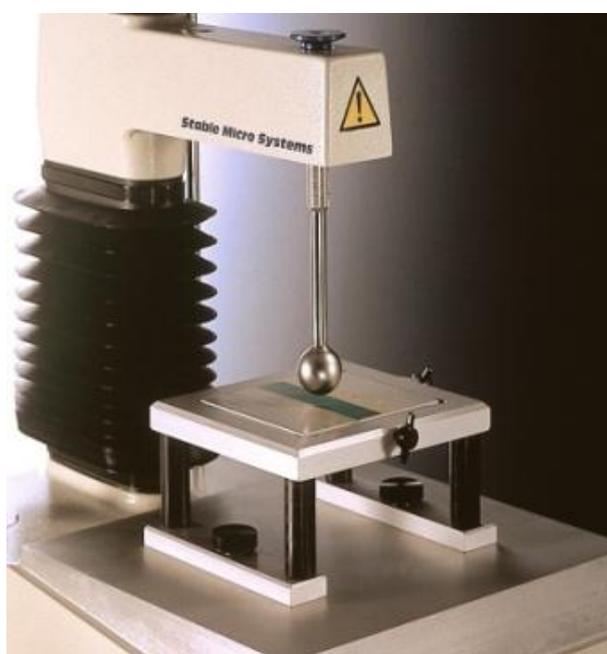
Para identificação de ácidos graxos foi utilizado Sudan IV 1% por 30 minutos, em álcool 30% por 15 minutos (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951; MENEZES-NETO, et al., 1997). As lâminas com os testes histoquímicos foram montadas em glicerina 50%.

As lâminas foram visualizadas em microscópio ótico com câmera Olympus BX60M acoplada, para captura de imagem, imediatamente após a montagem da lâmina.

Para a quantificação de lignina e monômeros de lignina foram retiradas periderme+córtex de três raízes de cada um dos oito genótipos com 12 meses de idade que foram posteriormente congelados e acondicionados em freezer por 15 dias. Após ter sido feita a coleta em todos os genótipos as amostras foram, secadas em estufa a 65° C por 48 horas e trituradas em moinho e mantidas em sacos plásticos para manter a umidade. As amostras secas e trituradas (pó) foram homogeneizadas em fosfato de sódio 50 mM tampão (pH 7,0) e purificadas em 1% de Triton X-100, NaCl 1M e acetona 80%, como proposto por (KOVÁČIK, KLEJDUS, 2008). A lignina foi quantificada a partir da reação de ácido tioglicólico com os monômeros de lignina através da peroxidação alcalina do nitrobenzeno (KOVÁČIK, KLEJDUS, 2008).

### 2.2.5 Textura da casca da raiz

Para promover uma leitura da análise de textura da raiz, foram realizados testes em material *in natura*, já que testes em material mal armazenado ou pós-congelado acarretariam extravasamento celular, impactando na integridade celular e conseqüentemente nos resultados. Foram determinadas as medições com auxílio do aparelho texturômetro modelo TAXT2 (Figura 3). Foi feita uma pré-regulagem de acordo com normas técnicas ditadas pelo fabricante, que para a mandioca foram ajustadas (Tabela 1). Para análise de textura foram utilizados três pontos (apical, mediano e basal) de cada raiz sendo três raízes de cada planta e três plantas para cada um dos oito genótipos. A medição de textura tem por finalidade analisar qual dos genótipos utilizado tem maior ou menor resistência à penetração física. Essa análise foi realizada no Laboratório de Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental.



**FIGURA 3:** Texturômetro TAXT2

**TABELA 1:** Requisitos utilizados na calibração do texturômetro TAXT2 para avaliação da resistência a penetração em raiz de mandioca

Requisito	Valor
Velocidade de penetração	1,5 mm/seg
Velocidade de teste	2 mm/seg
Velocidade de pós-teste	10 mm/seg
Distancia	5 mm
Trigger force	25 g
Probe	P/2

Velocidade de penetração: velocidade de penetração do probe; velocidade do teste: velocidade do probe sem o material; velocidade de pos-teste: velocidade de retorno; distancia: quanto o probe vai penetrar; trigger force: força que a maquina utiliza; Probe: ferramenta removível e ajustável que perfura o material. Todos medidos em mm/s.

### 2.2.6 Análise estatística

O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente ao acaso (DIC). Foi realizada a análise de variância para todas as variáveis gerando dados quantitativos, seguindo o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \varepsilon_{ij}, \text{ sendo:}$$

$Y_{ij}$ : é a observação do genótipo  $i$  na repetição (raiz)  $j$ ;

$\mu_i$ : média do experimento;

$\varepsilon_{ij}$ : é o erro médio associado à observação  $Y_{ij}$

Em caso de teste F significativo para as variáveis, foi aplicado o teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade e os dados foram apresentados sob a forma de tabelas que discriminassem claramente a segregação dos grupos iguais estatisticamente, a fim de verificar se havia associação com a resistência ou suscetibilidade a podridão mole da raiz.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar 5.1 (Ferreira, 2011) e os gráficos elaborados por meio da planilha do Excel 2010.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de variâncias foram na maioria das análises significativas a nível de 5% de probabilidade (Tabela 2).

**TABELA 2:** Caracteres analisados em raiz de genótipos de mandioca pertencente ao Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, suscetíveis e resistentes a podridão mole de raiz com seus respectivos números de aferições, unidades de medida e médias

Componentes anatômicos da raiz	Numero de aferições	Tipos de análises	Unidades de medidas	Médias
Periderme Córtex	216	Biometria	cm	0,261
Xilema	216	Biometria	cm	4,370
N° Células	120	Biometria	N° Células	27,750
Esp. Periderme	120	Biometria	$\mu\text{m}$	343,125
Lignina	24	Físico-químico	PPM	0,092
Monômeros de lignina	24	Físico-químico	PPM	0,154
Textura	72	Físico-químico	Newton	19,523

Os dados gerados por todas as análises quantitativas estão dispostos na Tabela 3 na forma de médias gerada a partir de cada análise para cada genótipo, assim como a média da variável.

**TABELA 3:** Médias obtidas de todas as variáveis mensuradas em raiz de genótipos de mandioca resistentes e suscetíveis a podridão mole da raiz

Genótipos	Periderme+córtex			Xilema			N° células	Textura	Espessura da periderme	Lignina	Monômeros de lignina
	Proximal	Mediana	Apical	Proximal	Mediana	Apical					
01 Pacajá	0,34	0,36	0,28	4,67	4,54	3,14	29	18,7	336	0,047	0,123
BRS Poti	0,23	0,25	0,21	4,85	4,92	3,6	28	23,6	334	0,103	0,164
BRS Mari	0,24	0,24	0,21	4,6	4,82	3,48	21	20,0	248	0,053	0,142
BRS Kiriris	0,29	0,32	0,25	4,83	5,97	2,98	31	19,2	402	0,082	0,147
Jurará	0,21	0,26	0,22	4,87	4,78	3,31	35	15,4	435	0,123	0,180
Inha	0,26	0,27	0,24	4,73	4,91	3,54	20	16,8	251	0,130	0,178
Olho verde	0,24	0,23	0,23	4,38	5,23	4,52	40	22,1	513	0,099	0,142
Manivão	0,28	0,26	0,25	3,83	5,52	2,76	18	20,5	226	0,099	0,153
Média geral por genótipo	0,26	0,27	0,24	4,60	5,09	3,42	27.75	19,52	343,13	0,092	0,154

Os dados quantitativos obtidos a partir dos oito genótipos foram submetidos à análise de variância gerando diferenças estatísticas, entre os genótipos, para a maioria dos testes a nível de 5% de significância, e algumas com 1% de significância (Tabela 4).

**TABELA 4:** Resumo dos resultados da análise de variância para os 11 caracteres mensurados em raiz de genótipos de mandioca resistentes e suscetíveis a podridão mole da raiz

Variáveis	Teste F	CV%	
Periderme córtex proximal	0,0039**	20,63	cm
Periderme córtex mediana	0,0034**	21,2	cm
Periderme córtex apical	0,0029 <sup>ns</sup>	22,78	cm
Xilema Proximal	0,89 <sup>ns</sup>	26,66	cm
Xilema Mediano	0,854*	18,16	cm
Xilema Apical	1,50**	27,54	cm
Nº células	28,54**	19,19	-
Espessura da Periderme	5847,50**	22,28	µm
Textura	6,96**	13,51	Newton
Lignina	0,0011 <sup>ns</sup>	34,12	ppm
Mon. Lignina	0,005 <sup>ns</sup>	14,07	ppm

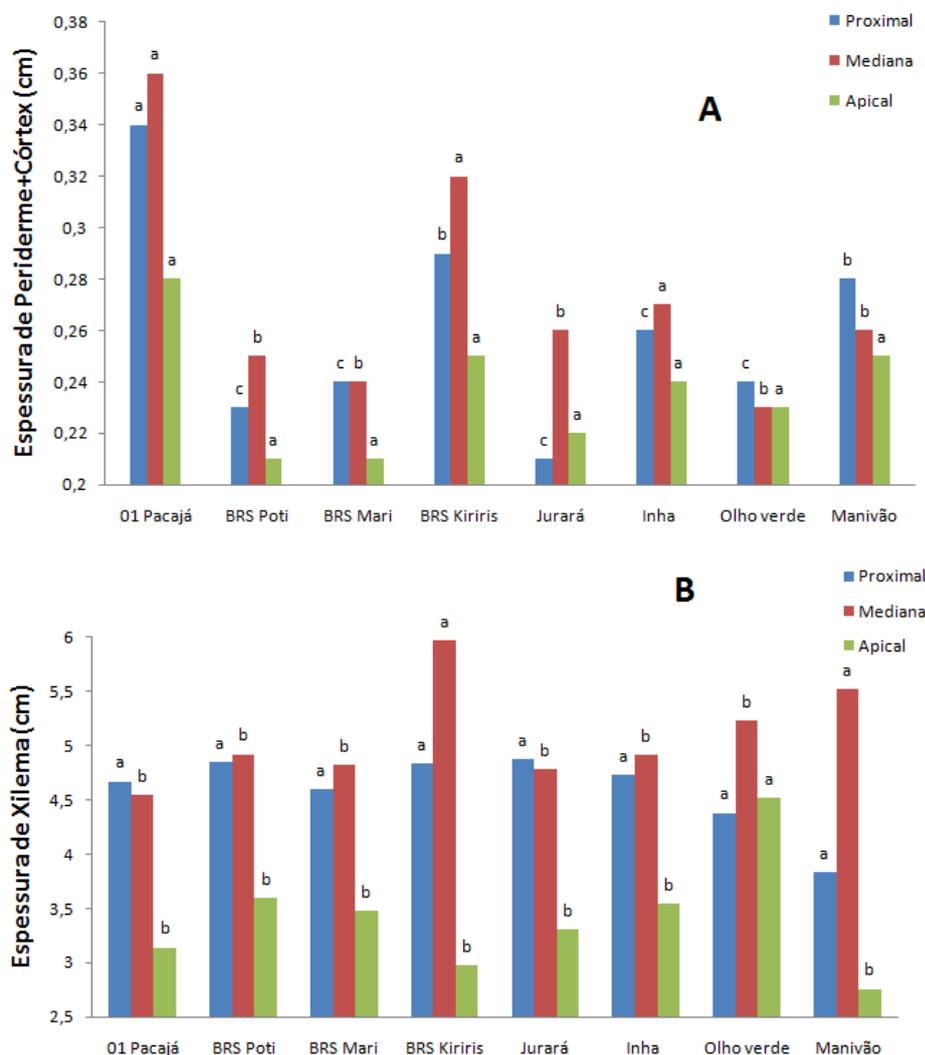
\*\*Significativo em nível de 1%; \*Significativo em nível de 5%

### 2.3.1 Características morfoanatômicas

As diferentes secções utilizadas para mensurar espessura da periderme+córtex, apresentaram espessamentos distintos conforme as posições (apical, mediano e proximal), ou seja, as médias de espessuras obtidas a partir da secção mediana apresentaram maiores valores, em relação aos valores obtidos a partir da secção apical (Gráfico 1 A). Esse padrão se manteve em todos os genótipos e também para xilema.

Ao observar os resultados compreendidos na Gráfico 1A, verifica-se que os valores médios de espessura de periderme+córtex dos genótipos resistentes se apresentam similares aos resultados obtidos a partir das médias dos genótipos suscetíveis (Gráfico 1). A espessura da periderme+córtex não parece ser uma característica que influencie na resistência física de um genótipo de mandioca, já que a BRS Kiriris, que corresponde a um material notadamente resistente (Fukuda, 2006), dentre os genótipos avaliados apresentou estatisticamente uma espessura de periderme+córtex muito similar ao genótipo 01 Pacajá (Gráfico 1), que é suscetível a podridão mole da raiz.

**GRÁFICO 1:** Gráfico comparativo de espessura de periderme+córtex em **A** e xilema em **B** de raiz de mandioca em três pontos de medições (proximal, mediano e apical), pelo teste Scott-knot a nível de 5% de probabilidade (as letras nas barras diferem apenas os genótipos)



A porção mais externa da mandioca, por incluir periderme e córtex pode variar bastante de espessura podendo conferir uma maior espessura para genótipos suscetível tal qual a de um resistente, levando a pressupor que a espessura da periderme+córtex não influencia diretamente a resistência à podridão mole.

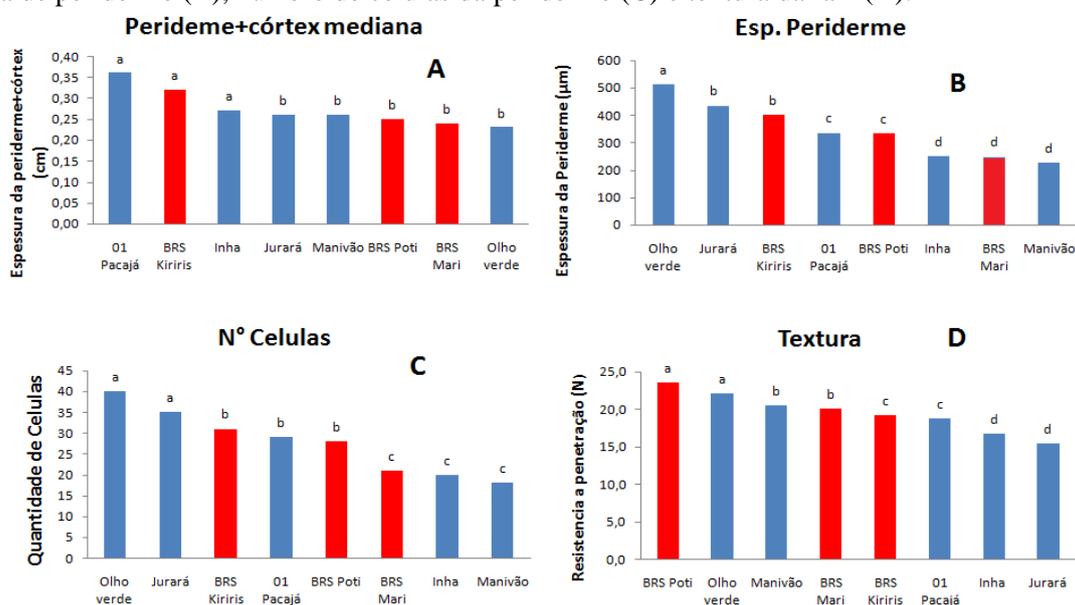
Testes em casa de vegetação com inoculação do patógeno *P. drechsleri* diretamente no xilema da raiz mostrou que a BRS Kiriris é suscetível (Tremacoldi, dados não publicados). Testes estes que instigam a acreditar que a resistência física pode estar associada à periderme+córtex.

Os resultados obtidos a partir do diâmetro de xilema bem como de periderme+córtex foram estatisticamente diferentes na maioria dos casos (Gráfico 1 A e B). Numa visão geral os genótipos apresentaram o mesmo padrão de espessamento da periderme+córtex, ou seja, um diâmetro que muda conforme a secção (proximal, mediana e apical). Quando focamos no genótipo BRS Kiriris os resultados, novamente, são muito semelhantes aos materiais suscetíveis. Pelas avaliações testes

biométricas realizadas no xilema, pode-se concluir que a espessura do xilema não é característica chave que confere resistência física à podridão mole da raiz em mandioca, mas pode esta ligada ao conjunto de características responsáveis pela resistência física.

Trabalhos indicaram que raízes com um maior número de elementos de vasos, parênquima mais denso, compactos e espessos são desejáveis, pois contribuem para uma maior reserva de amido e translocação de água e nutrientes (NASSAR et al., 2008), além de essas características estarem associadas à resistência a patógenos, já que tecidos compactos e espessos oferecem uma barreira física para microorganismos (PHILIP et al., 1991).

**GRÁFICO 2:** Análises de caracteres da raiz de mandioca, realizadas em genótipos resistente (em vermelho) e suscetíveis (em azul) a podridão mole da raiz, espessura da periderme+córtex mediano (A), espessura de periderme (B), número de células da periderme (C) e textura da raiz (D).

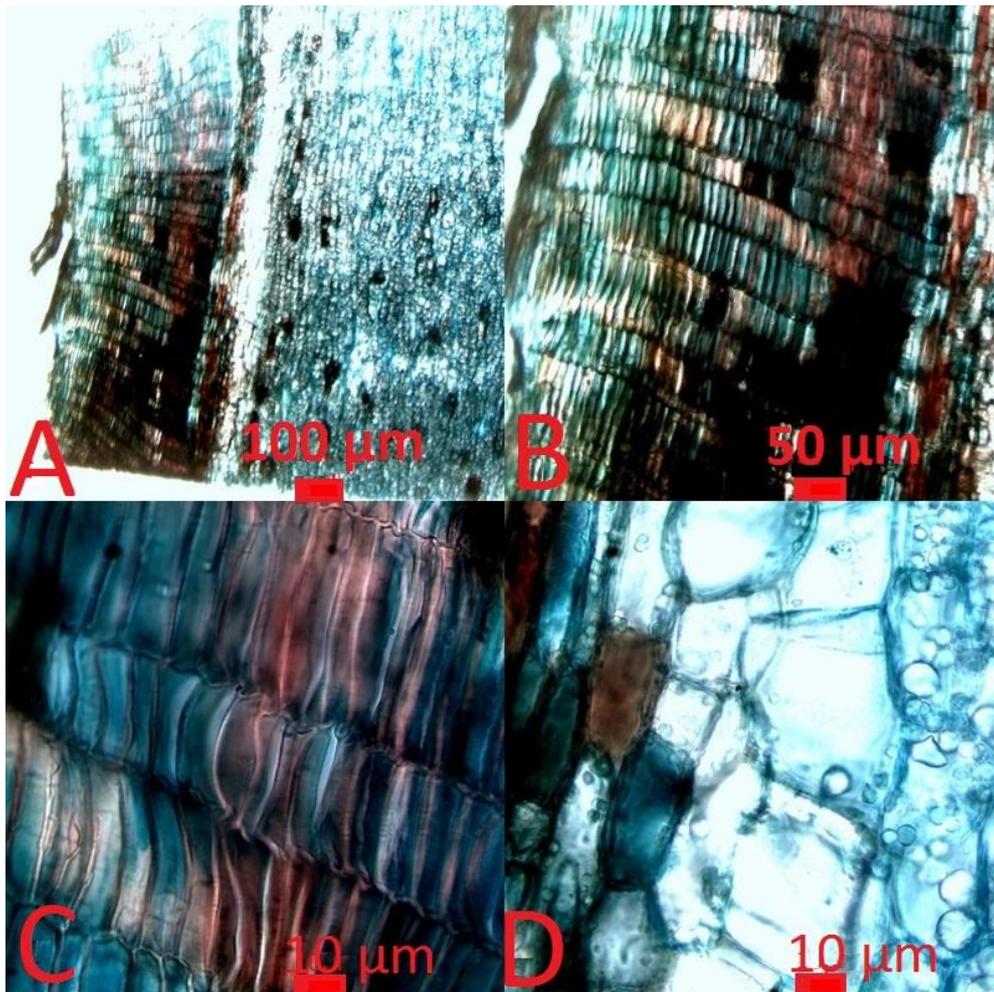


Entre as características comparadas na Gráfico 2 como a espessura de periderme+córtex (na porção mediana) (Gráfico 2A), contagem de células da periderme (Gráfico 2C), medição da periderme (Gráfico 2B) e a de determinação da textura (Gráfico 2D) em oito genótipos, pode-se observa que os materiais resistentes (barras vermelhas na Gráfico 2) se apresentaram com valores de espessura, textura e número de células muito similar aos de materiais suscetíveis. Esses resultados impossibilitam a segregação estatística dos genótipos resistentes dos suscetíveis. O teste de s (Scott-knott) constatou diferença para a maioria das características nos diferentes genótipos, porém não necessariamente na distinção de resistentes dos suscetíveis, verificando assim (Gráfico 2D) que os materiais resistentes não possuem melhores resultados.

O teste de médias separou estatisticamente os genótipos quanto às análises empregadas, possibilitando observar que os genótipos resistentes além de possuírem em geral resultados com valores medianos sua amplitude de variação das médias nas diferentes análises é bem menor.

### 2.3.2 Lâminas semi-permanentes

Nos oito genótipos estudados a periderme encontra-se estratificada, partida em alguns pontos, com 10 a 73 camadas de felema de células tabulares (Figuras 6A, B e C) e o córtex ate três camadas de células parenquimáticas, grandes com formato isodiamétrico a oblongo (Figura 6 A, D).



**FIGURA 4:** Cortes transversais da raiz de mandioca do genótipo BRS Kiriris corados com Astra Blue e Fuccina básica. Imagens correspondentes a sucessivos aumentos de objetiva no microscópio (10x (a), 25x (b) e 100x (c e d)). A imagem D é a continuação da periderme (c) e início do córtex

Ao aplicar testes quantitativos de espessura e número de células na periderme o teste de média mostrou a formação de grupos distintos com diferencia estatística a nível de 1% (Tabela 4).

As médias geradas pela contagem do número de células influenciaram diretamente no padrão de variação dos valores de espessura da periderme, já que quanto maior o numero de células maior

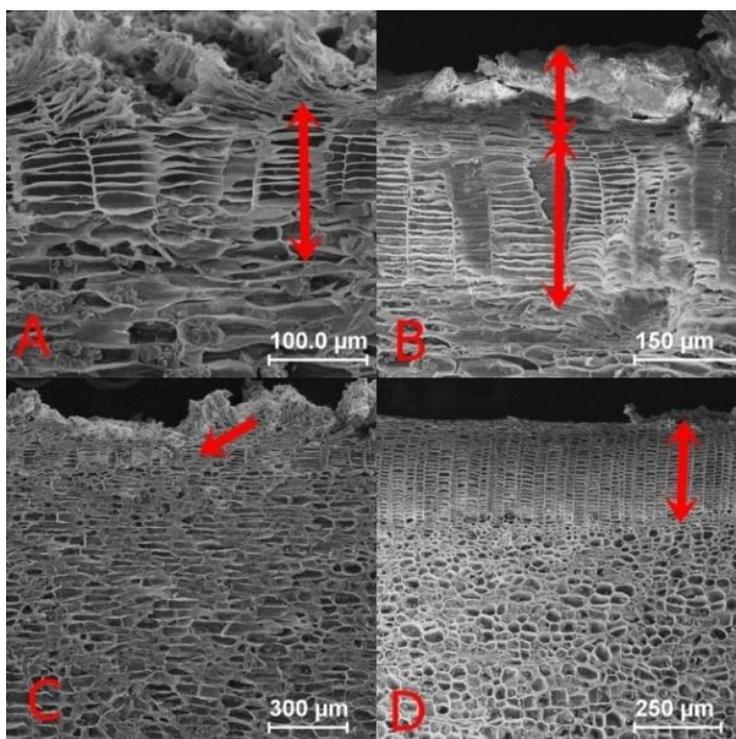
será a espessura. Esses resultados não influenciaram necessariamente na textura, pois quando observamos no Gráfico 2D temos materiais como a olho verde, que apresentou bons resultados de textura, espessura de periderme e conseqüentemente número de células, enquanto sua espessura de periderme+córtex se apresentou com valores inferiores aos dos demais genótipos (Gráfico 2A).

Esses resultados inferem dizer que apesar da espessura e número de células da periderme ter apresentaram diferença estatísticas, isso não leva necessariamente à segregação dos genótipos resistentes dos suscetíveis. No entanto verificou-se que os genótipos resistentes se apresentaram tanto com maiores valores como menores valores de médias, assim como os materiais suscetíveis (Gráfico B e C), impossibilitando dizer qual genótipo é resistente a partir dessas análises métricas.

### 2.3.3 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens obtidas a partir da microscopia de varredura demonstraram qualitativamente que as diferenças entre os genótipos estudados são sucintas restringindo-se dizer que são basicamente de periderme.

Ao comparar genótipos suscetíveis com resistentes, constatou-se diferenças marcantes (Figura 5) que podem ser mensuráveis nas imagens a seguir.



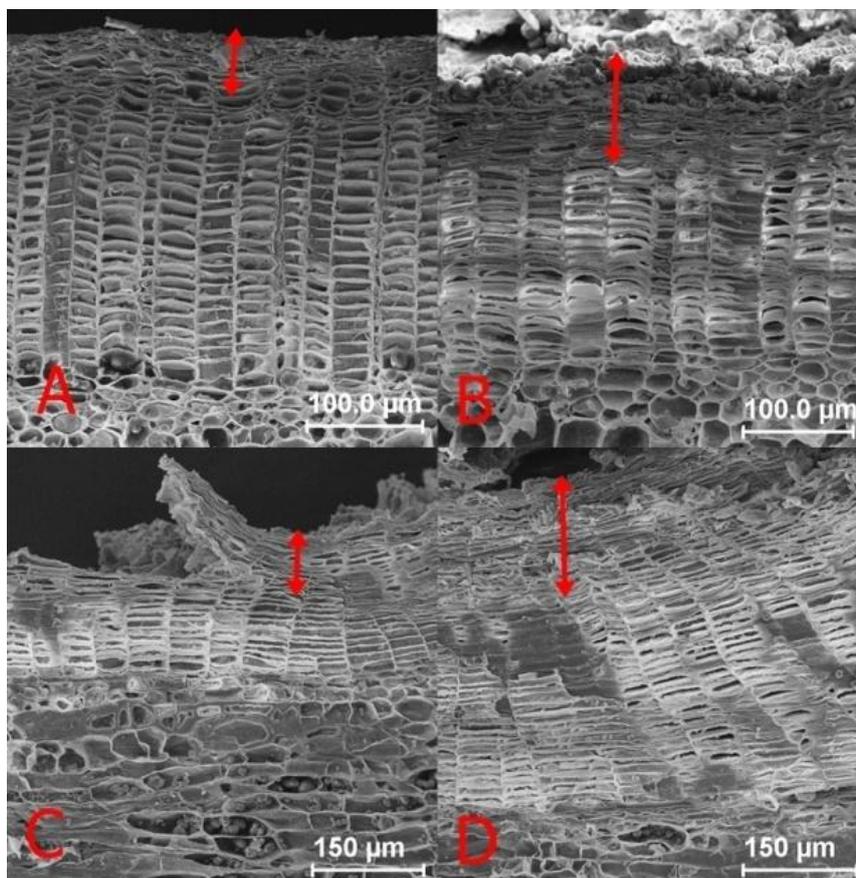
**FIGURA 5:** Cortes transversais de raiz de mandioca visualizados em microscopia eletrônica de varredura, comparando a periderme entre genótipo suscetível Inha (A e C) e resistente BRS Kiriris (B e D)

Nos materiais resistentes (Figura 5 B e D), observa-se claramente que existe diferença na periderme. Na imagem, o genótipo suscetível se configura com o número de camada de células bem menor (Gráfico 2C) juntamente com a deposição de células mortas na superfície quase desprezível

(Figura 5A). Em contra ponto o genótipo resistente apresentou uma deposição muito maior de células inativas proporcionando um maior espessamento (barreira física) juntamente com seu número elevado de células que eleva o grau de resistência física.

O câmbio da casca origina a periderme, que é composta pelo felema (súber), felogênio e feloderme. A periderme substitui a epiderme à medida que o órgão cresce em diâmetro. O felema por sua vez é constituído por células de formato irregular oriundas da descamação da periderme, são células mortas na maturidade devido à impregnação com suberina. Devido a isso, é altamente impermeável, evitando a perda excessiva de água (CURVELO, 2004).

Quando comparados os materiais resistentes (Figura 6), observou-se grande similaridade quanto à deposição de células mortas e espessura da periderme (Figura 6).

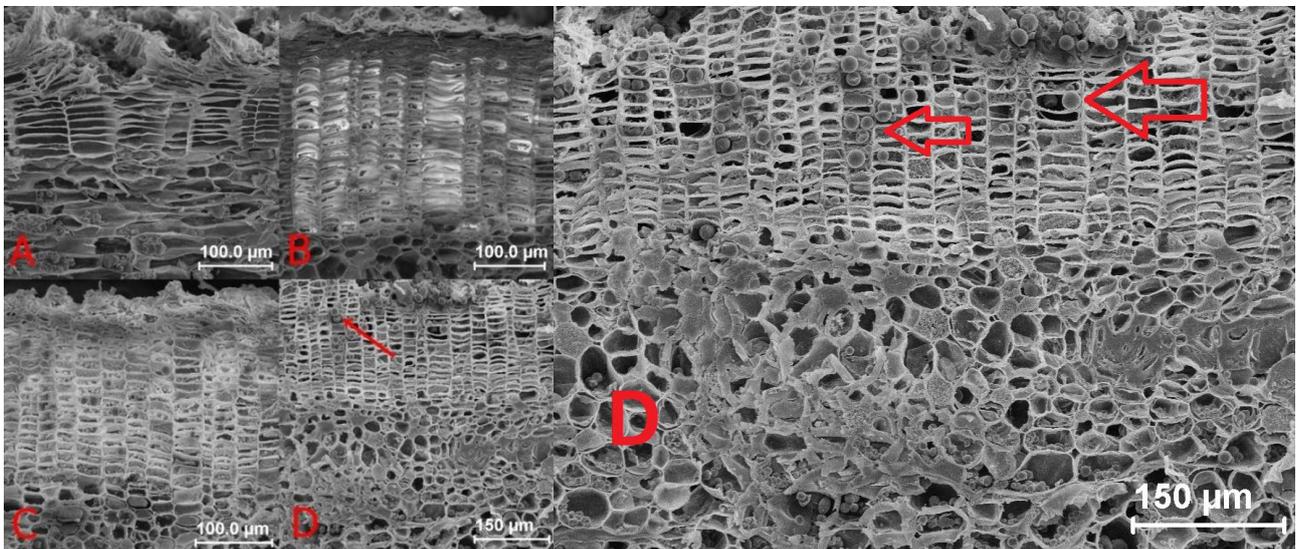


**FIGURA 6:** Cortes transversais comparando a periderme dos genótipos resistentes BRS Kiriris (A), BRS Poti (B), BRS Mari (C) e CPATU 193 (D)

Na Figura 6 pode ser observado claramente que os materiais resistentes apresentaram um padrão de espessamento muito similar com diferença marcante apenas para o genótipo BRS Mari (Figura 6C), que apresentou um espessamento inferior. Foi constatado ainda que os materiais resistentes apresentaram uma alta deposição de células mortas na superfície da periderme com

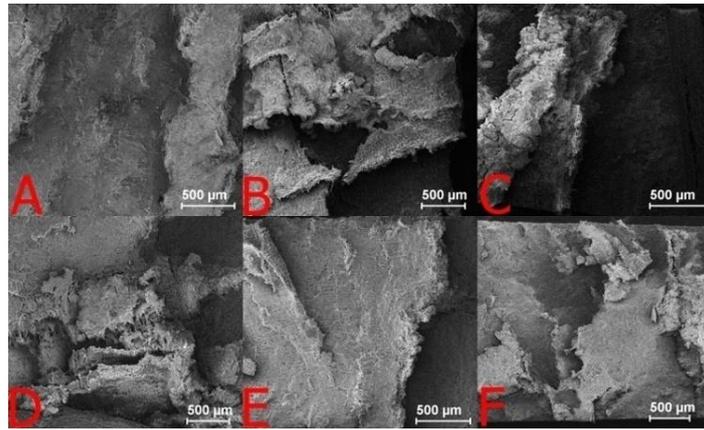
ênfase no material CPATU 193 que além de uma alta deposição ainda apresenta um número de camadas de células muito elevada (Figura 6 C).

Ao comparar as peridermes dos genótipos suscetíveis notamos peculiaridades em cada genótipo. Nos genótipos B e C (Figura 7), nota-se um padrão de periderme qualitativamente igual aos genótipos resistente, no entanto o genótipo A (Figura 7) apresentou uma periderme de espessura muito inferior juntamente com os números de células abaixo. O genótipo da figura 7 D (Tumase) apresentou uma grande concentração de amido nas células (seta) da periderme fato esse que se apresentou mais evidente somente nesse genótipo, o que pode estar associado à suscetibilidade visto que uma maior concentração de amido na periderme é favorável ao ataque de fitopatogenos do solo, pois oferece uma fonte energética de fácil aquisição proporcionando assim uma maior suscetibilidade apesar de ter uma espessura de periderme avantajada.



**FIGURA 7:** Cortes transversais comparando a periderme entre os genótipos Inha (A), Jurara (B), Manivão (C) e Tumase (D), setas em D mostrando a presença de amido na periderme

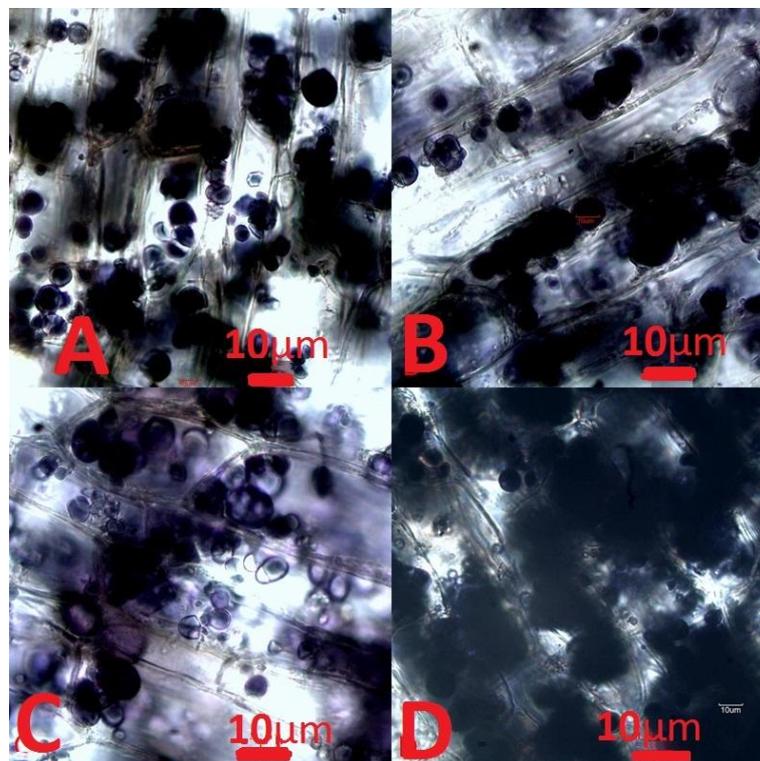
A imagem panorâmica da periderme não se apresentou qualitativamente diferente, pois todas as peridermes observadas apresentaram um grau de similaridade muito grande diferindo apenas pelo grau de descamação das camadas de felemas pertencente à periderme (Figura 8), como pode ser facilmente observadas na figura 8.



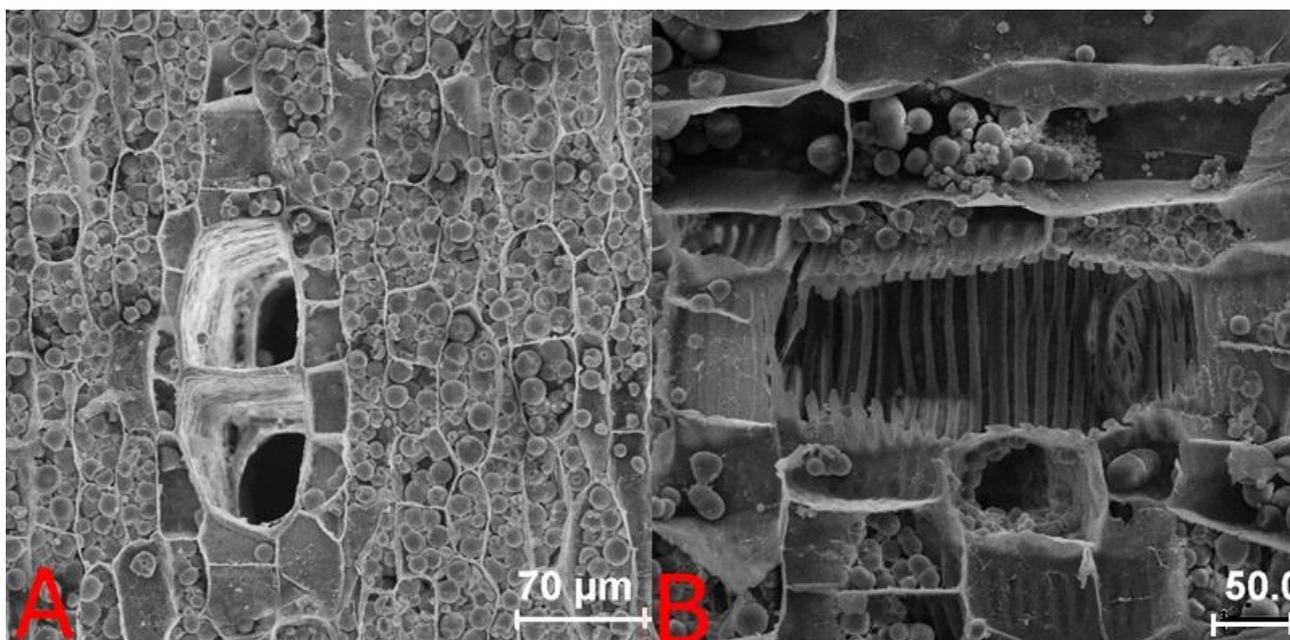
**FIGURA 8:** Superfície da periderme de diferentes genótipos

#### 2.3.4 Testes histoquímicos

As avaliações histoquímicas demonstraram características que devem ser mais bem analisadas. As imagens obtidas em microscópio óptico a partir da aplicação do teste histoquímico para determinação do amido mostrou genótipos qualitativamente muito similares quanto a morfologia do grânulo de amido, sem a visualização do amiloplasto. No período avaliado o grânulo de amido não apresentou diferença visual entre os genótipos quanto à forma (Figura 9), muito pouca variação quanto à disposição e quantidade (visualmente). Os grânulos de amido apresentaram uma disposição uniforme quanto ao formato e tamanho, disposto em torno dos elementos de vasos (Figura 10).



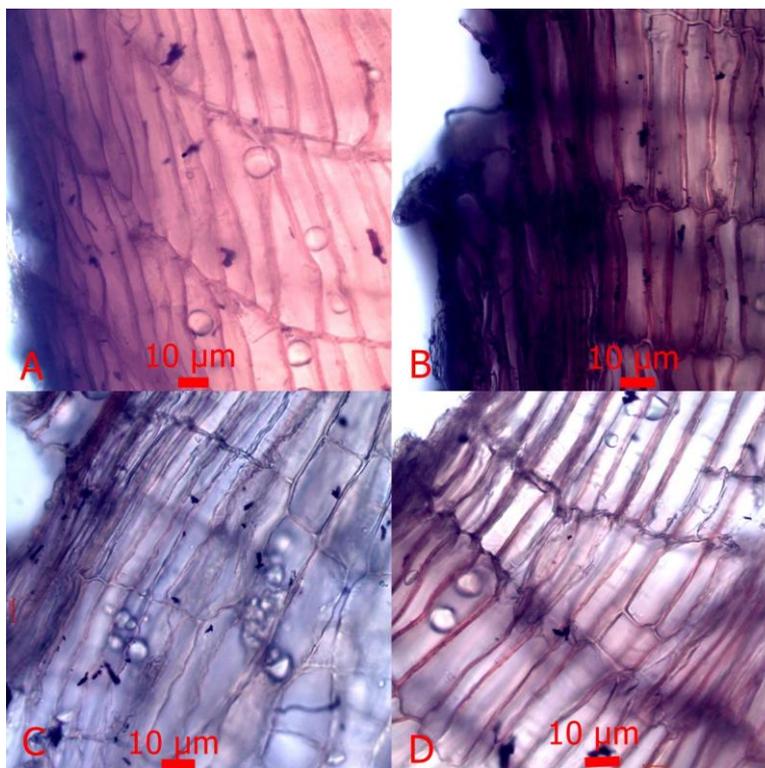
**FIGURA 9:** Secções de raiz de mandioca coradas com lugol evidenciando grânulos de amido. A: BRS Kiriris; B: BRS Poti; C genótipo Inha e D Olho verde. A e B materiais resistentes; C e D suscetíveis a podridão mole da raiz



**FIGURA 10:** Micrografia em Xilema especificando o componente de vaso cortados transversalmente no genótipo BRS Kiriris (A) e longitudinalmente no genótipo Tumase (B)

Ao serem empregado os testes histoquímicos para determinação de ácido graxo nos oito genótipos, observou-se qualitativamente diferenças sucintas na tonalidade, sugerindo diferença entre os genótipos na quantidade de ácidos graxos presente principalmente na periderme (Figura 11), já que estas apresentaram tonalidades mais intensa, no entanto o córtex apresentou uma menor reação consequentemente uma coloração com menor intensidade.

Quando se observa os genótipos BRS Kiriris (Figura 11A) e BRS Poti (Figura 11B), estas apresentaram tonalidade rosácea tendendo para o vermelho escuro, ou seja, uma tonalidade mais forte o que possibilita inferir que houve um maior percentual de ação do reagente Sudan IV pela maior concentração de ácido graxo presente na amostra. Em contra ponto os genótipos Inha (Figura 11C) e Olho verde (Figura 11D) apresentaram uma tonalidade tendendo para o azulado e rosácea mesclada com azul esmaecida conferindo assim menores percentuais de reatividade por parte do Sudan IV, indicando qualitativamente menor quantidade de reação consequentemente de ácido graxo.



**FIGURA 11:** Teste histoquímicos com reagente Sudan IV em raiz de genótipos de mandioca ressaltando as diferentes tonalidades. Imagens correspondem à periderme dos genótipos BRS Kiriris em A, BRS Poti em B, genótipo Inha em C e Olho verde em D

Os genótipos Inha e Olho verde vêm sendo caracterizados pelo BAG como suscetíveis podridão mole da raiz. Dessa forma, são necessárias maiores investigações acerca da relação entre ácidos graxos na raiz e resistência a podridão mole.

Ao se empregar a quantificação de lignina e monômeros de lignina dentro da metodologia indicada pela literatura, verificou-se que não houve diferença estatística (Tabela 2), implicando em dizer que os percentuais de lignina e monômeros presentes na periderme+córtex são iguais estatisticamente para materiais resistentes e suscetíveis, não distinguindo qualquer genótipo analisado. Os resultados não significativos devem estar associados ao emprego da análise no conjunto periderme+córtex, já que, este conjunto tem basicamente na sua constituição macerada uma maior quantidade de córtex (Córtex>90%) e justamente esse componente deve ter mascarado os resultados. Pois a periderme é quem apresenta a deposição de células mortas originando o felema que apresenta níveis de concentração de lignina bem maior.

Thomas (2007) demonstrou a partir de seu experimento em raiz de soja que percentuais de suberina estão dipostas em concentrações diferentes ao longo do comprimento da raiz e que essas concentrações podem ser alteradas por diversos fatores externos bióticos ou abióticos tais como patógeno e ou déficit hídrico. Além de essas características estarem relacionadas à resistência a

patógenos, uma vez que tecidos mais compactos e espessos (xilema) oferecem uma barreira mecânica para microorganismos.

### 2.3.5 Análise de textura

Quanto aos testes realizados a partir do texturômetro obtivemos diferença estatística a nível de 1% de significância (Tabela 2). A análise de textura gerou médias de dados correspondentes à resistência a penetração na porção superficial da raiz de mandioca com cerca de 5,0 mm de profundidade, ou seja, a medição de textura foi realizada basicamente na periderme e no córtex. Nesta análise, o genótipo BRS Poti foi o que apresentou o melhor resultado assim como o genótipo Olho verde que é suscetível (Figura 5C). Dessa forma a variação das médias de textura indicam novamente uma similaridade de genótipos resistentes e suscetíveis e mostra ainda baixa influência da espessura da periderme+cortex (Figura 5A) ou mesmo da espessura da periderme sobre à resistência a penetração (Figuras 5 B e 5D).

## 3 CONCLUSÃO

As medições de espessura da casca, xilema, componentes de vasos e a textura, não são determinantes para indicar se o genótipo de mandioca é ou não resistente a podridão radicular. As análises qualitativas de ácidos graxos que mostram em imagens diferentes tonalidades implicam em possíveis concentrações de ácido graxos que podem estar associado à resistência física bem como aos componentes de parede (suberina, tanino entre outro) que precisam ser mensurados para complementar a análise de resistência. As imagens obtidas pela microscopia de varredura demonstraram que apesar das espessuras de periderme ser muito similares existe uma diferença marcante principalmente na deposição de células do felema na superfície da raiz fato esse que deve ser melhor analisado para se buscar uma característica que esteja associado a resistência ou a suscetibilidade da mandioca a podridão mole da raiz.

## BIBLIOGRAFIA

ALBUQUERQUE, A., 2008 -a, Cultivar de Mandioca BRS Maris, in E. A. Oriental, ed., <<http://www.cpatu.embrapa.br/>>, Belém, Pará.

Albuquerque, A., 2008 -b, Cultivar de Mandioca BRS Poti in E. A. Oriental, ed., <<http://www.cpatu.embrapa.br/>>, Belém, Pará.

CHAVES, A. ; PEDROSA, E.M.R ;PIMENTEL, R.M.M.; MARANHÃO, S.R.V.L. Resistance Induction for *Meloidogyne incognita* in Sugarcane through Mineral Organic Fertilizers. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY, v52, n. 6: p.1393-1400, 2009.

- KOVÁČIK, J. & KLEJDUS, B. Dynamic of phenolic acid and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* root. *Plant cell Rep.* v.27, p.605-615. 2008.
- MATTOS, P. L. P., AND V. S. BEZERRA, 2003, Cultivo da mandioca para o estado do Ámama, <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>.
- FERREIRA, DANIEL FURTADO. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, v.35, n.6 1039-10742, 2011
- FUKUDA, WANIA. Variedades de mandioca para a produção de fécula. Disponível em: <[http://www.abam.com.br/mat\\_tecnicos](http://www.abam.com.br/mat_tecnicos)>. Acesso em: 24 abr. 2007.
- FUKUDA, W., C. FUKUDA, L. SOUZA, and H. CARVALHO, 2006, BRS KIRIRIS híbridos de mandioca resistentes a podridão de raiz, *in* E. t. costeiro, ed., 2006, <<http://www.cnpmf.embrapa.br>>.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Editora da Universidade Rural, Rio de Janeiro, 1997.
- INMET, I. n. d. m., 2011, *in* M. d. a. p. e. abastecimento, ed., <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção Agrícola Municipal, Culturas Temporárias e Permanentes. Rio de Janeiro: IBGE, 2005.p.101. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 18 ago. 2013.
- IBGE. Produção agrícola municipal. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. P.93. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 01 jan. 2013.
- IBGE. LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. P.126. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 18 jun. 2013.
- JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York: Mc Graw Hill. 523 p. 1940.
- MENEZES-NETO, M.A.; MENDES, A.M.C. de M.; MENDES, A.C. de B. Práticas de Anatomia Vegetal, 84p. 1997.
- MOURA, G.deM. Avaliação de cultivares de mandioca em diferentes épocas de colheita, no Estado do Acre. *Revista Brasileira de Mandioca*, v.17, p.13-23, 1998.
- NASSAR NM, HASHIMOTO DY AND FERNANDES SD (2008). Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. *Genet. Mol. Res.* 7: 16-28.
- 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, 1997.
- PHILIP T, GOVINDAIAH C, SENGUP AK, NAIK VN (1991) Anatomical nature of resistance in mulberry genotypes against *Cerotelium fici* causing leaf rust. *Indian Phytopath* 44(2):249–251
- SIDRA, S. I. d. R. A., 2008, Pesquisa de Orçamento Familiar, <http://www.sidra.ibge.gov.br>.

SASS, J.S. Botanical microtechnique. Iowa: The State College Press. 228p. 1951.

THOMAS, R.; FANG, X.; RANATHUNGE, K.; ANDERSON, T.R; PETERSON, C.A.; BERNARDES, M.A. Soybean root suberin: anatomical distribution, chemical composition and relationship to partial resistance to *Phytophthora sojae*. Plant Physiology, v.144, p.299-311, 2007.