

DESINFESTAÇÃO PARA ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE GENÓTIPOS DE *Manihot esculenta* Crantz COM SUBSESSILIDADE FOLIAR

Serli de Oliveira Cabral¹, Rafael Lara Rezende Cabral¹, Mariana Ribeiro de Almeida², Vitoria Ferreira Gomes², João Paulo de Moraes Oliveira¹, Tamyris de Mello², Rodrigo Sobreira Alexandre²

¹Universidade Federal do Espírito Santo - Campus Alegre, Alto Universitário, s/n, Guararema - 29500-000 - Alegre - ES, Brasil, ¹biologiaserli@gmail.com, ¹rafaelaraaaa@gmail.com, ¹joaopaulo.ueg@gmail.com.

²Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Agrárias e Engenharias/Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, Avenida Governador Lindemberg, 316, Centro, 29550-000, Jerônimo Monteiro, Brasil. ²mariribeiro11@hotmail.com, ²vitória.eng.for@gmail.com, ²tamyrisdemello@gmail.com, ²rodrigossobreiraalexandre@gmail.com

Resumo

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura de importância econômica e alimentar em regiões tropicais e subtropicais. Este estudo avaliou quatro tratamentos de desinfestação no estabelecimento *in vitro* de genótipos de mandioca, incluindo variedades com subsecessilidade foliar. Os tratamentos foram aplicados a micro manivas e cultivados em meio MS. Embora todos os tratamentos tenham resultado em alta contaminação, o tratamento 4 (hipoclorito de sódio 12% + Across®) evitou a contaminação, mas impediu a brotação em dois tubos. Não houve correlação clara entre os genótipos subsecessis e genótipo convencional quanto a taxa de contaminação, sugerindo a necessidade de novos testes de desinfestação.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*. Microrganismos endofíticos. Micropropagação. Subsecessilidade foliar.

Área do Conhecimento: Engenharia agrônoma

Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura de relevância econômica e alimentar significativa em diversas regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (Da Costa Nunes *et al.*, 2021; De Carvalho *et al.*, 2022). Pertencente à família Euphorbiaceae, esta planta produz raízes tuberosas ricas em carboidratos, constituindo uma fonte alimentar essencial para mais de 800 milhões de pessoas em todo o mundo (Sessou *et al.*, 2020; Amelework & Bairu, 2022; Gleadow *et al.*, 2023). Além disso, a mandioca é amplamente utilizada em diversos setores industriais, incluindo a produção de amidos, farinha e bioetanol.

A importância da mandioca vai além de suas raízes tuberosas, com seu potencial genético sendo explorado para aumentar a resistência a doenças e a produtividade. Estudos recentes têm destacado o papel da genômica funcional na identificação de características desejáveis, como genes relacionados às vias de tolerância à seca (Yan *et al.*, 2022) e resistência a patógenos (Sessou *et al.*, 2020). A aplicação de técnicas moleculares, como a edição de genes e a transgenia, tem permitido avanços significativos na melhoria de cultivares de mandioca, promovendo o desenvolvimento de variedades que atendam às necessidades do mercado e contribuam para a segurança alimentar global. Dessa forma, há um interesse crescente em protocolos eficientes e robustos para o sucesso no estabelecimento *in vitro*, voltados para o melhoramento genético pós-seleção de genótipos superiores.

A técnica de cultura de tecidos vegetais, amplamente explorada na agricultura, horticultura, silvicultura e melhoramento de plantas, tem se mostrado fundamental para a análise precisa em condições controladas e para a multiplicação em larga escala de genótipos selecionados, como variedades de *M. esculenta* resistentes à doença do mosaico da mandioca (CMD) (Sessou *et al.*, 2020). Contudo, o sucesso no estabelecimento *in vitro* de plantas de mandioca é frequentemente limitado por desafios, como a contaminação por microrganismos endofíticos, que podem comprometer o estabelecimento das culturas (Cassells, 2012). Portanto, protocolos eficientes de desinfestação são vitais para o sucesso na cultura de tecidos.

Além dos desafios técnicos para obtenção de planta matriz saudável, o processo de desinfestação é um passo crítico no processo de cultura de tecidos em qualquer espécie em estudo. A escolha adequada de agentes desinfestantes e a otimização dos protocolos são fundamentais para minimizar a contaminação microbiana e maximizar a sobrevivência e o crescimento dos explantes (Barampuram *et al.*, 2014). A identificação de métodos eficientes de desinfestação em diversas culturas com históricos de bons resultados pode fornecer insights valiosos para a elaboração de protocolos mais eficazes, que considerem a variação genética entre os genótipos de mandioca e suas respostas específicas aos agentes químicos utilizados.

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de quatro diferentes tratamentos de desinfestação no estabelecimento *in vitro* de genótipos de mandioca com subessilidade foliar, investigados por seus atributos agrônômicos decorrentes de uma mutação atípica. Além disso, busca-se aplicar a edição gênica para melhorar genótipos convencionais, o que necessitará de um protocolo de desinfestação eficaz para o estabelecimento desses novos genótipos editados. Para comparar a eficácia dos tratamentos, foi utilizado o genótipo convencional denominado 'Cacau Branca' como controle, uma vez que esse genótipo tem sido usado como referência em todas as nossas investigações.

Metodologia

O experimento foi conduzido no laboratório de cultura de tecidos vegetais do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo/UFES. Foram utilizados quatro genótipos de *Manihot esculenta* Crantz sendo três genótipos com subessilidade foliar (M1- Mackugy, M2- Aipim Abacate, e M3- Mimoso) e um genótipo convencional (C4- Cacau Branca). Utilizaram-se micro manivas de 3 cm contendo um broto xilar cada, oriundas de plantas cultivadas em casa de vegetação, mantidas em vasos com idade de 3 meses. O material foi submetido a quatro tratamentos de desinfestação, conforme descrito na Tabela 1. Os explantes foram cultivados em tubos de ensaio de vidro (25 x 150 mm), contendo aproximadamente 7 mL de meio MS (Murashige; Skoog, 1962), (Sigma-Aldrich®), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose (Dinâmica®), 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich®), 5,5 g L⁻¹ de ágar (Kasvi®), com pH ajustado a 5,7 ± 0,1 com a adição de hidróxido de potássio (KOH) 0,1 M e/ou ácido clorídrico (HCl) 1 M, antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 1 °C, com fotoperíodo de 16/8 horas e irradiância de 22,8 µmol m⁻² s⁻¹ para induzir as brotações, por 3 semanas. O ensaio consistiu de quatro genótipos, com quatro repetições de dez tubos cada, totalizando 160 tubos (40 tubos/explantes por tratamento). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R e o teste de Tukey para comparação de médias. A análise quanto a sobrevivência e a eficiência de brotação para os quatro genótipos foram estimadas após 3 semanas do estabelecimento.

Tabela 1- Tratamentos analisados

Id	Tratamentos
T1	Álcool 70% 2' + 3 lavagens H ₂ O + NaClO 6 %/10' com Tween 3 gotas/100 mL + 3 lavagens H ₂ O
T2	Álcool 70% 2' + 3 lavagens H ₂ O + NaClO 12 %/10' com Tween 3 gotas/100 mL + 3 lavagens H ₂ O
T3	Álcool 70% 2' + 3 lavagens H ₂ O + NaClO 6 %/10' com Tween 3 gotas/100 mL + 3 lavagens H ₂ O + Across® 2 mL/L/30' + 3 lavagens H ₂ O
T4	Álcool 70% 2' + 3 lavagens H ₂ O + NaClO 12 %/10' com Tween 3 gotas/100 mL + 3 lavagens H ₂ O + Across® 2 mL/L/30' + 3 lavagens H ₂ O

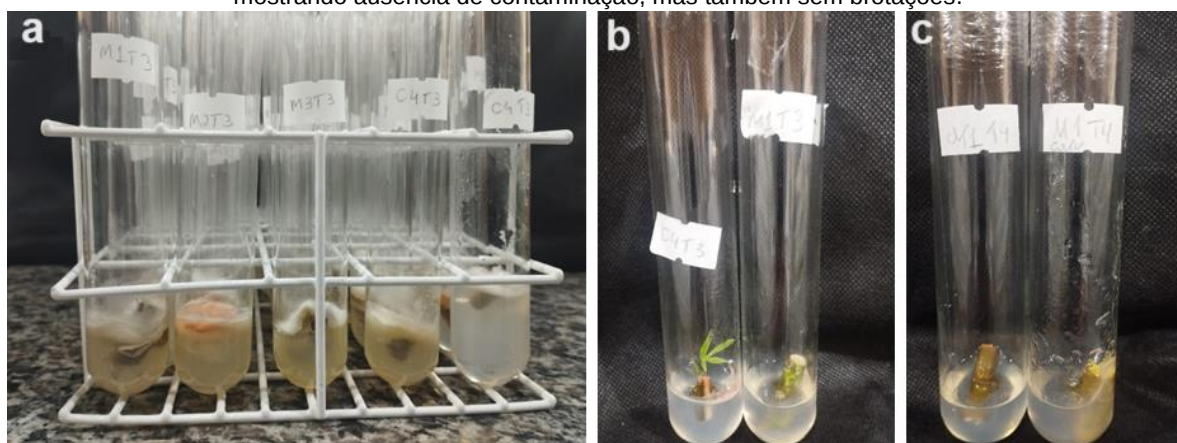
Fonte: Os autores

Resultados

As análises de contaminação não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, indicando uma alta taxa de contaminação em todos os genótipos e tratamentos testados. Quanto às taxas de sobrevivência e crescimento, o tratamento 4, que incluiu dois tubos do genótipo

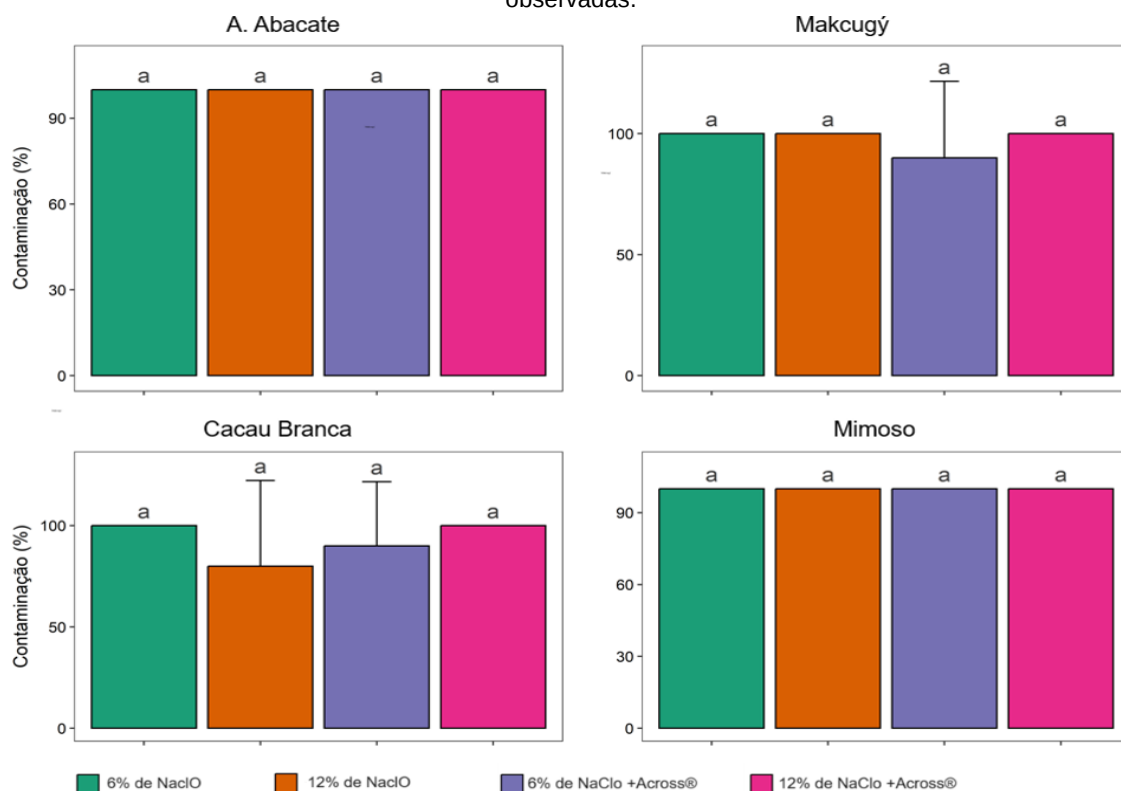
subséssil (M1 - Makcugý), não apresentou contaminação. Entretanto, a concentração de 12% de hipoclorito de sódio utilizada pareceu ser excessiva, inviabilizando a brotação. Baseando-se nas observações feitas no tratamento 3, novos testes podem ser realizados para aumentar o sucesso das brotações em experimentos futuros, além da necessidade de revisar e determinar um menor tempo de cultivo em casa de vegetação para a retirada das micro manivas. Não foi possível estabelecer uma correlação clara entre a taxa de contaminação e os diferentes genótipos investigados (Figuras 1 e 2).

Figura 1 - (a) Exemplo de contaminação por fungos e bactérias observada em todos os tratamentos, representado pelo Tratamento 3; (b) Brotações presentes nos tubos do Tratamento 3; (c) Tratamento 4 mostrando ausência de contaminação, mas também sem brotações.



Fonte: Os autores

Figura 2 - Comparação dos tratamentos e genótipos testados, sem diferenças estatisticamente significativas observadas.



Fonte: Os autores

Discussão

Os resultados deste estudo destacam um desafio significativo no estabelecimento *in vitro* de genótipos de mandioca, especialmente no que diz respeito à contaminação por microrganismos endofíticos. O uso de hipoclorito de sódio em concentrações de 6% e 12% mostrou-se ineficaz, embora na concentração de 12% (tratamento 4) associado com Across®, dois tubos não apresentaram contaminação. No entanto, essa concentração foi prejudicial ao desenvolvimento das brotações, corroborando estudos anteriores que destacam os efeitos tóxicos de altas concentrações de agentes desinfetantes em tecidos vegetais (Cassells, 2012). Em contraste, Mukami *et al.* (2022) relataram que uma concentração de 15% de hipoclorito de sódio não resultou na morte de manivas de 1,5 cm pré-propagadas dos genótipos testados.

No estabelecimento de sementes, Ali *et al.* (2007) observaram que o tratamento de desinfestação de sementes de *Psidium guajava* L. com 10% e 20% de NaClO por 30 minutos ainda resultou em taxas de contaminação de 82% e 67%, respectivamente. No entanto, a combinação de NaClO com ácidos fortes, como ácido sulfúrico (H₂SO₄) e ácido clorídrico (HCl), mostrou-se mais eficaz na eliminação da contaminação e promoção da germinação, alcançando até 87,7% de germinação após tratamento com 10% de HCl por 24 horas. Isso sugere que, embora o NaClO desempenhe um papel na desinfestação, a adição de ácidos fortes no estudo foi importante para melhorar a eficácia do processo e acelerar a germinação de sementes de *P. guajava*.

Neste estudo, o uso do Across® foi testado para maximizar o sucesso, mas a combinação de alta concentração de hipoclorito de sódio com Across®, associada a micromanivas de 3 meses, pode não ter sido ideal para o estabelecimento. A persistência da contaminação nos tratamentos que utilizaram Across® como adjuvante sugere uma possível resistência dos microrganismos endofíticos presentes nas manivas de mandioca aos métodos de desinfestação empregados. Cassells (2012) enfatiza que a propagação por meio de explantes nodais, como os testados neste estudo, apresenta um alto risco de contaminação por microrganismos endofíticos, ao contrário da cultura de meristemas. Ele também destaca que contaminantes endofíticos em culturas tropicais podem ter temperaturas ótimas mais elevadas, o que pode ter favorecido a contaminação nesse estudo.

É essencial que futuros testes considerem fatores adicionais, como a otimização das concentrações de desinfetantes, o ajuste dos tempos de exposição, adição de antibióticos, novos fungicidas, pH e temperatura, que podem influenciar o crescimento desses microrganismos. Além disso, o fator genótipo deve ser considerado, pois pode ser necessário desenvolver protocolos distintos, dada a variabilidade genética e as diferenças na interação planta-microrganismo bem como idade para retirada das micromanivas.

Devido à alta taxa de contaminação neste estudo, não foi possível correlacionar a contaminação com os diferentes genótipos presentes. Isso sugere que a variação genética intrínseca dos genótipos testados nas condições aqui relatadas não influenciou significativamente a resposta aos tratamentos de desinfestação. Ressalta-se, assim, a importância de considerar outros fatores, como o manejo prévio dos materiais vegetais e o uso de outros tipos de tecidos, como meristemas, ao desenvolver protocolos de cultura de tecidos para esses genótipos.

Conclusão

O estudo ressaltou a complexidade da desinfestação de genótipos de mandioca para o cultivo *in vitro*, especialmente no que diz respeito ao controle de contaminação. Embora não tenha havido diferença significativa entre os tratamentos em termos de contaminação, a inibição da brotação observada no tratamento 4 sugere a necessidade de ajustar a concentração de NaClO. A realização de novos testes e posteriormente estabelecer um melhor método de desinfestação será de suma importância a fim de viabilizar a diminuição de contaminação e aumentar o número de brotações, permitindo o avanço das pesquisas genéticas e de melhoramento dos genótipos de mandioca aqui investigados. Essa etapa é importante para o sucesso no estabelecimento *in vitro*, dando continuidade às investigações relacionadas ao hormônio e, futuramente, aos ensaios de reestabelecimento de plantas editadas geneticamente.

Referências

GOMES, R.S.S.; NUNES, M.C.; NASCIMENTO, L.C.; SOUZA, J.O.; PORCINO, M.M. Eficiência de óleos essenciais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Rev. Bras. Plantas Medicinai**s, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.279-287, 2016.

ALI, N.; MULWA, R. M. S.; NORTON, M. A.; SKIRVIN, R. M. Radical disinfestation protocol eliminates *in vitro* contamination in Guava *Psidium guajava* L. **seeds. Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, n. 3, p. 295-298, 2007.

AMELEWORK, A. B.; BAIRU, M. W. Advances in Genetic Analysis and Breeding of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): A Review. **Plants**, v. 11, n. 12, p. 1617, 20 jun. 2022.

BARAMPURAM, S., ALLEN, G. & KRASNYANSKI, S. Effect of various sterilization procedures on the *in vitro* germination of cotton seeds **Plant Cell Tiss Organ Cult** 118, P. 179–185, 2014.

CASELLS, A. C. Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture: Phytopathogens, vitro pathogens, and vitro pests. **In Plant Cell Culture Protocols**, V. 877, p. 57–80, 2012.

DA COSTA NUNES, E.; UARROTA, V. G.; MORESCO, R.; MARASCHIN, M.; DA COSTA NUNES, E.; UARROTA, V. G.; MORESCO, R.; MARASCHIN, M. Physico-chemical profiling of edible or sweet cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starches from Brazilian germplasm. **Food bioscience**, v. 43, n. 101305, 2021.

DE CARVALHO, R. R. B.; MARMOLEJO CORTES, D. F.; BANDEIRA E SOUSA, M.; DE OLIVEIRA, L. A.; DE OLIVEIRA, E. J. Image-based phenotyping of cassava roots for diversity studies and carotenoids prediction. **PloS one**, v. 17, n. 1, p. e0263326, 2022.

GLEADOW, R.; MAHER, K.; CLIFF, J. Cassava. **Current biology magazine**, v. 33, n. 10, p. R384– R386, 2023

MUKAMI, A. JUMA, BS, MWEU, C.; NGUGI, M.; ODUOR, R.; MBINDA, WM et al. Plant regeneration from leaf mesophyll derived protoplasts of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **PLOS ONE**, v. 17, n. 12, p. e0278717–e0278717, 1 dez. 2022.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

SESSOU, A. F., KAHIA, J. W., HOUNGUE, J. A.; ATEKA, E. M.; DADJO, C.; AHANHANZO, C. *In vitro* propagation of three mosaic disease resistant cassava cultivars. **BMC Biotechnology**, v. 20, n. 1, 29 set. 2020.

YAN, Y., WANG, P., LU, Y., BAI, Y., WEI, Y., LIU, G., & SHI, H. MeRAV5 promotes drought stress resistance in cassava by modulating hydrogen peroxide and lignin accumulation. **Plant Journal**, v. 107, n. 3, p. 847–860, 17 jun. 2021.

Agradecimentos

Ao Centro de Ciências Agrárias Engenharias CCAE/UFES. Ao apoio fornecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo FAPES Nº 24/2022 - PROGRAMA DE CAPACITAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS NA PÓS-GRADUAÇÃO - PROCAP 2023 DOUTORADO-Protocolo: 52803.810.17975.09112022. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).