

# Multiplicação vegetativa e eliminação dos fenômenos de degenerescência nos clones de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados *in vitro*

L. Fereol (\*)

G. Ducreux (\*)

## Resumo

Os clones africanos da mandioca cultivados tradicionalmente na África, apresentam freqüentemente certos sintomas de degenerescência (African Cassava mosaic). A repartição, a transmissão e a progressão do agente patogênico, foram estudadas a partir de experiências feitas através de transplantações ou enxertos, guardando como referência do clone indene de sintomas, proveniente do Vietnã. A cultura *in vitro* permitiu o aperfeiçoamento dos tratamentos de termoterapia conduzindo à cura de todos os clones estudados, e à obtenção de uma multiplicação vegetativa acelerada, que permite a reconstituição de clones saudáveis em pouco tempo.

## INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é, correntemente, multiplicada por meio do plantio de manivas. A prática ancestral desta multiplicação vegetativa favoreceu o aparecimento de fenômenos de degenerescência que se exprimem mostrando um fraco desenvolvimento ao nível da parte aérea, assim como por meio de mosaicos e de deformações nas folhas. Por outro lado, a produção média dos tubérculos pode ser diminuída de 30% ou mais, em função da sensibilidade da variedade (Beck & Chant, 1958; Magoon, 1967).

O aparecimento destas perturbações, conhecidas geralmente pelo nome de mosaicos, tem duas origens diferentes (Silva, 1962; Kitajima & Costa, 1966): "African Cassava Mosaic" (originário da África), e "Cassava Common Mosaic" (originário da América).

Estas duas formas distinguem-se igualmente ao nível da manifestação dos sintomas. Elas são transmissíveis por meio de estacas (manivas) e enxertos, mas, segundo o nosso conhecimento, apenas a forma americana foi identificada como sendo de natureza viral (Storey & Nichols, 1938; Kitajima & Costa, 1966). O nos-

so trabalho é sobre o "African Cassava Mosaic", cujo agente patológico não foi ainda isolado.

Diversos métodos permitem chegar a uma erradicação dos sintomas de degenerescência e foram aplicados à mandioca com maior ou menor sucesso. Assim, a existência de genes de resistência em espécies selvagens (Jennings, 1957, 1960), permitiu obter variedades híbridas resistentes ao mosaico (Maggon *et al.*, 1970). Tentativas feitas na variedade "Kalikalian" (de origem africana) permitiram a obtenção de 60% de plantas saudáveis a partir de regenerações em ápex meristemáticos isolados (Kantha & Gamborg, 1974).

Interessamo-nos pelo método termoterapêutico, utilizado até esta data *in vivo* sobre estacas transplantadas ou em plantas inteiras (Chant, 1959). Este método apresentava dois inconvenientes fundamentais: fraca taxa de cura e a lentidão da multiplicação vegetativa.

Para resolver estes problemas, procuramos beneficiar-nos das vantagens apresentadas pela cultura *in vitro*.

A utilização desta técnica, para os tratamentos de termoterapia já mencionados, de excelentes resultados, em particular no caso da videira (Galzy, 1964), para a qual este método já passou ao estado de aplicação prática (Valat & Mur, 1976) e no da batatinha (Nozeran *et al.*, 1977). Outro interesse destas culturas *in vitro* é que elas permitem acelerar, em grandes proporções, a taxa de multiplicação vegetativa.

Efetivamente, se nos situarmos num caso de multiplicação "conforme", queremos com isto dizer que ela é conservadora do patrimônio hereditário (Nozeran & Bancilhon, 1972), é possível obter um ritmo elevado de multiplicação vegetativa e, conseqüentemente, um ganho de tempo apreciável na reconstituição de clo-

(\*) — Laboratório de Estudos e Exploração do Polimorfismo Vegetal associado ao C.N.R.S. — Université Paris-Sud. 91 405 ORSAY CEDEX — France.

nes bem sucedidos. Este método revelou-se já particularmente eficaz, quando aplicado a vários materiais de estudo. Citemos, entre outros: *Vitis* (Favre, 1970, 1973), *Citrus* (Bou-zid, 1971, e Bouzid & Lasram, 1973), batata-do-ce (Sihaschackr, 1974), batatinha (Grenan, 1976), ananás (Pannetier & Lanaud, 1976).

## MATERIAL E MÉTODOS

### A — CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL

#### 1) A origem dos clones:

Utilizamos 7 clones apresentando ou não sintomas de degenerescência (Quadro 1) — 6 destes clones são de origem africana: "H<sub>58</sub>", "H<sub>60</sub>", "C B", "M Bengui", "Kataoli", "Abidjan"; a sétima é originária da baía de Along (Vietnã).

O material, constituído de estacas, foi colocado numa estufa tropicalizada, possuindo as seguintes condições médias: 25-30°C, umidade relativa de 80%, fotoperíodo - 12h.

#### 2) Sintomas e graus de intensidade da doença:

Os sintomas são essencialmente constatáveis ao nível do aparelho vegetativo e particularmente ao nível das folhas: deformações, mosaicos (Fig. 1).

A severidade dos sintomas é variável segundo os clones doentes e, no próprio local, os graus de intensidade da doença foram atribuídos em função da natureza e da importância das modificações manifestadas nas plantas atingidas (Storey & Nichols, 1938; Cours,

1951). Adaptamos, para este trabalho, os critérios de Cours, que permitem uma notação de 0 (planta saudável) a 5 (planta muito modificada pela doença) (Quadro 1).

### B — INDICAÇÕES FITOPATOLÓGICAS

#### 1) Transmissão e circulação do agente patológico

Para a experiência e para os controlos, a transmissão da doença é realizada numa estufa, a partir de enxertos em fenda. Geralmente, o clone saudável "Baía de Along", tomado como referência, é utilizado como garfo sobre o cavalo doente. O testemunho, quanto ao efeito do enxerto, é obtido quando realizamos a associação "Baía Along"/ "Baía Along". A circulação e a velocidade de progressão do agente patogênico são analisadas quando associamos à variação do tamanho do garfo as transplantações nó a nó realizadas a tempos variáveis após o início da experiência.

#### 2) Controle da presença do agente patogênico

A observação dos sintomas morfológicos está associada à realização dos enxertos. Consideramos como indenes da doença, os indivíduos sem sintomas e não contagiosos relativamente a garfos sensíveis (Baía de Along) ao fim de 4 meses. Vários enxertos complementares permitem afirmar este diagnóstico.

#### 3) Aplicação da termoterapia

Estas experiências são realizadas em plantas cultivadas *in vitro* apresentando 5 a 6 folhas totalmente desenvolvidas. Os tubos de

QUADRO 1 — Intensidade de ataque do vírus Mosaico Africano da Mandioca, com anotações, segundo a escala de Cours (1959), nos diferentes clones de mandioca utilizados, cultivados em estufa

Clones	Estado fitossanitário	Origem geográfica	Intensidade do Mosaico (escala de Cours)
Baía de Along	Saudável	Vietnã	0
H <sub>60</sub>	Saudável	Costa de Marfim	0
H <sub>60</sub>	Doente	Costa de Marfim	1
H <sub>58</sub>	Doente	Madagáscar	1
C B	Doente	Costa de Marfim	1
Mbengui	Doente	Togo	2
Kataoli	Doente	Togo	3
Abidjan	Doente	Costa de Marfim	4

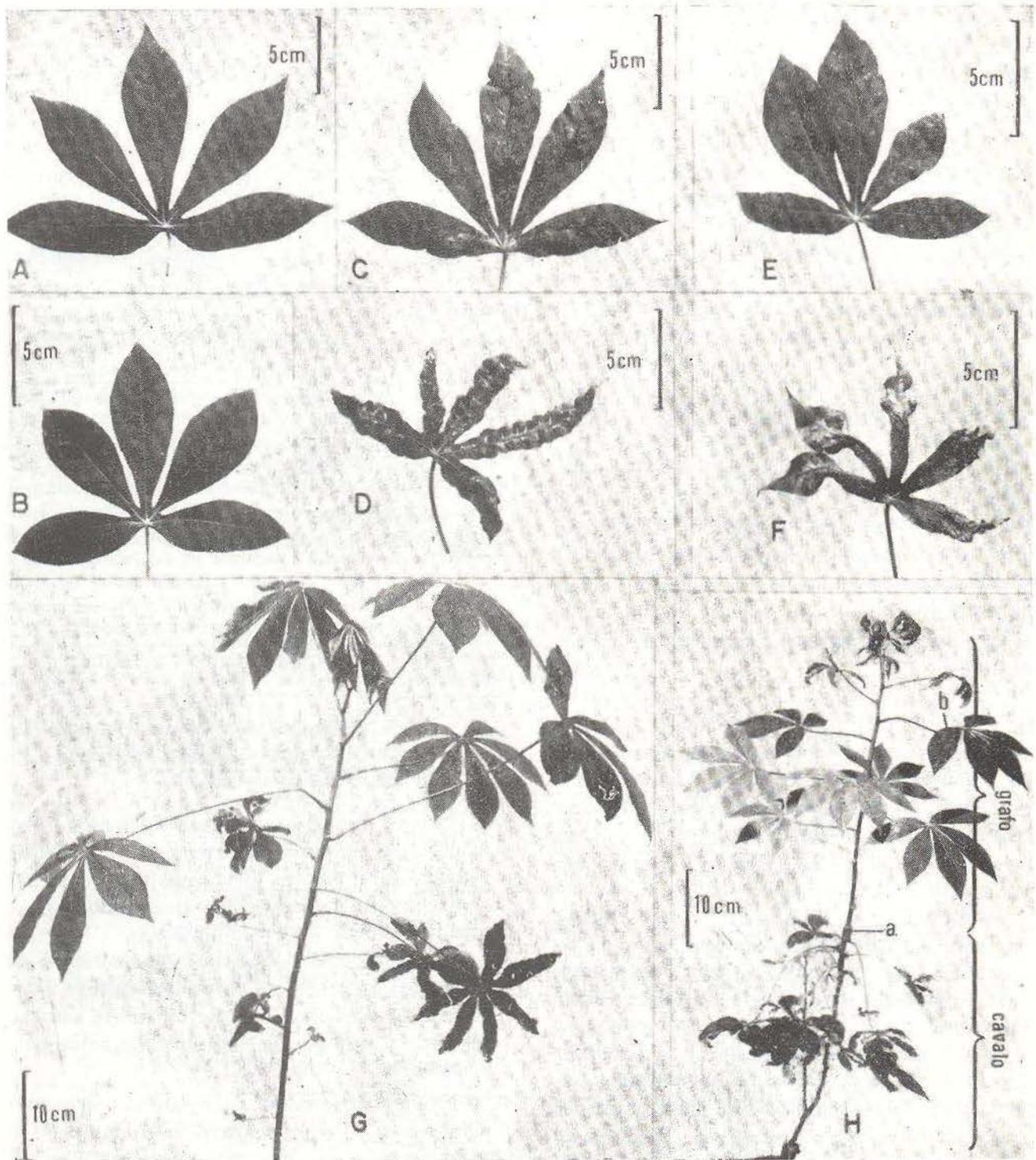


Fig. 1 — A a F — Exemplos de diferentes graus de intensidade da degenerescência: A) I<sub>0</sub> ("H<sub>60</sub>" saudável); B) I<sub>0</sub> ("Baía de Along" saudável); C) I<sub>1</sub> ("H<sub>60</sub>" doente); D) I<sub>3</sub> ("Kataoli" doente); E) "Baía de Along" contaminado pelo "H<sub>60</sub>" doente; F) "Baía de Along" contaminado pelo "Kataoli" doente; G) Variação da expressão dos sintomas foliares da doença num indivíduo do clone "C B"; H) Enxerto de uma estaca do clone saudável "Baía de Along" num "Abidjan" doente (Enxerto em fenda). Resultados obtidos, 6 semanas após a enxertia. — Notar a expressão da doença no cima da estaca (a, saliência devida ao enxerto; b, primeira folha exprimindo os sintomas da doença).

ensaio, colocados em estufas de tamanho reduzido (104 x 48 x 84) são submetidos às seguintes condições: temperatura 36-37°C ou 39-40°C segundo o tratamento administrado, luz artificial 3500 lux, fotoperíodo 12 h, umidade elevada.

## C — TÉCNICAS DE CULTURA "IN VITRO"

### 1) Início da cultura

No início, as culturas são constituídas de frações de caule, possuindo um gomo extraído do material cultivado na estufa.

As amostras são primeiramente esterilizadas em álcool a 70° (10 segundos), depois em hipoclorito de cálcio (17 g/l durante 30 minutos) e, finalmente, lavadas em água destilada estéril (3 banhos de 15 minutos). Estas amostras são depois transplantadas para um tubo pyrex (diâmetro 2,5 cm) num meio nutritivo de KNOP diluído pela metade e completado pela solução de oligo-elementos de Berthelot.

A partir desta primeira implantação, diversas transplantações por estaca sucessivas, *in vitro*, permitem a constituição de lotes experimentais.

### 2) Regresso às condições naturais

Após as experiências, os indivíduos tratados, bem como os testemunhos, depois de serem cultivados *in vitro* são transferidos para a estufa, ao estado de 5 a 6 folhas já bem desenvolvidas e tratadas segundo o protocolo indicado (Fig. 2).

As observações e os controles são realizados 4 meses mais tarde, tomando como referência os indivíduos sãos ao início desta pesquisa e segundo um dispositivo experimental totalmente casualizado. Quatro (4) petições são realizadas com o material: 1) saudável não cuidada pela termoterapia, 2) saudável tratado, 3) doente não tratado e 4) doente tratado.

As observações concernem à presença ou ausência de sintomas e sobre as seguintes medidas: tamanho dos indivíduos, número de rós, superfície foliar e rendimento sobre o peso dos tubérculos.

Os resultados são analisados segundo o método de análise de variância e de comparação das médias pelo teste dos contrastes de SCIFFE.

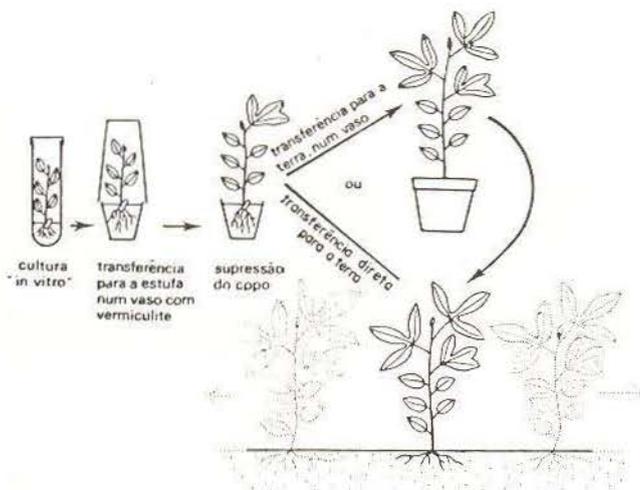


Fig. 2 — Esquema da transferência para a estufa, das plantas cultivadas *in vitro*. Os indivíduos, tirados dos tubos e libertados do agar, são depois plantados em vasos com vermiculite. Estas plantas são cobertas por um copo, formando um circuito fechado e guardando uma higrometria que é comparável à do tubo e evitando uma dessecação brusca do material. O copo é tirado 8 a 10 dias depois. Regamos as culturas de 2 em 2 ou de 3 em 3 dias, com uma solução nutritiva de Knop diluído a metade. Dez dias depois da supressão do copo, estas plantas são postas na terra.

## RESULTADOS

### A — ASPECTOS MORFOLÓGICOS E VARIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS SINTOMAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO

Nos clones apresentando uma grande intensidade de sintomas de mosaico ("Kataoli", "Abidjan"), todas as folhas são atingidas. Em contrapartida, naqueles em que a doença se manifesta com menor intensidade ("H<sub>∞</sub>", "C B"), a expressão dos sintomas observa-se de forma desigual (Fig. 3). Algumas folhas apresentam os mosaicos e as deformações características, e outras se mostram aparentemente saudáveis.

Observações mais sistemáticas, realizadas num clone "C B", mostram que a intensidade da expressão dos sintomas pode variar muito de uma folha à outra (Fig. 1G). Estas variações não parecem dependentes do meio ambiente, atendendo à relativa estabilidade das condições de temperatura da estufa.

Por outro lado, a repartição da experiência em dois períodos diferentes do ano (Verão e Inverno) não tem incidência sobre este fenô-

meno. Portanto, parece-nos razoável pensar que a variação da expressão dos sintomas de degenerescência está ligada a fenômenos endógenos. Podemos aproximar-nos desta interpretação pelo simples fato de que, durante o desenvolvimento do aparelho vegetativo das plantas saudáveis, o comprimento dos entrenós exprime também um certo ritmo (Cours, 1951). No que diz respeito às plantas doentes, Bourriquet (1932), Storey & Nichols (1938) fazem constatações análogas quando em condições habituais de cultura de mandioca.

Com o objetivo de obter indicações complementares sobre o significado deste problema, transplantamos sistematicamente cada um dos nós dos indivíduos apresentando irregularidades quanto à expressão da doença (clone "C B"), anotando bem a sua colocação no caule e o estado da folha correspondente (Fig. 3).

Entre os indivíduos provenientes desta transplantação, alguns nunca mostraram, atra-

vés dos meios de controle de que dispomos, a presença do agente patogênico. Mas, não há qualquer relação entre o estado da folha e o estado de saúde do botão axilar correspondente.

No entanto, continua a ser possível o isolamento de porções indenes de agente patológico, mesmo a partir de uma planta apresentando sintomas de degenerescência. No mínimo, este fato implica que a repartição do agente infeccioso não é regular no interior da planta. A transplantação dos diferentes nós permite revelar esta heterogeneidade.

Se esta observação é interessante, no quadro de estudos das relações entre o agente patogênico e a planta-hóspede, também o é na aplicação prática, permitindo regenerar, pelo menos parcialmente, alguns clones, aproveitando as possibilidades oferecidas pela multiplicação vegetativa *in vitro*.

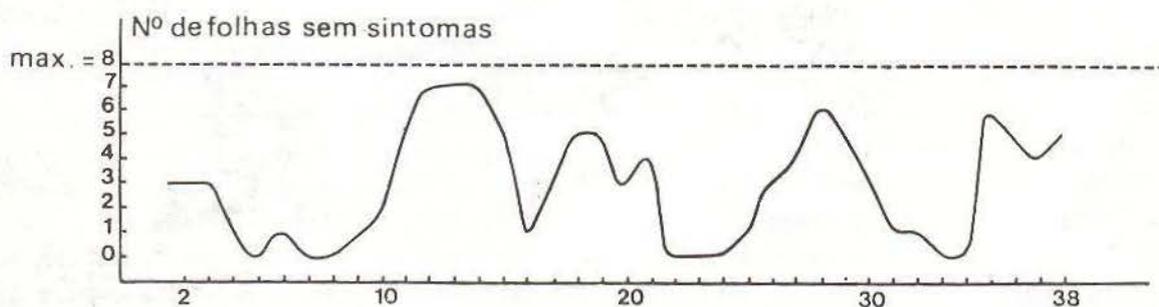
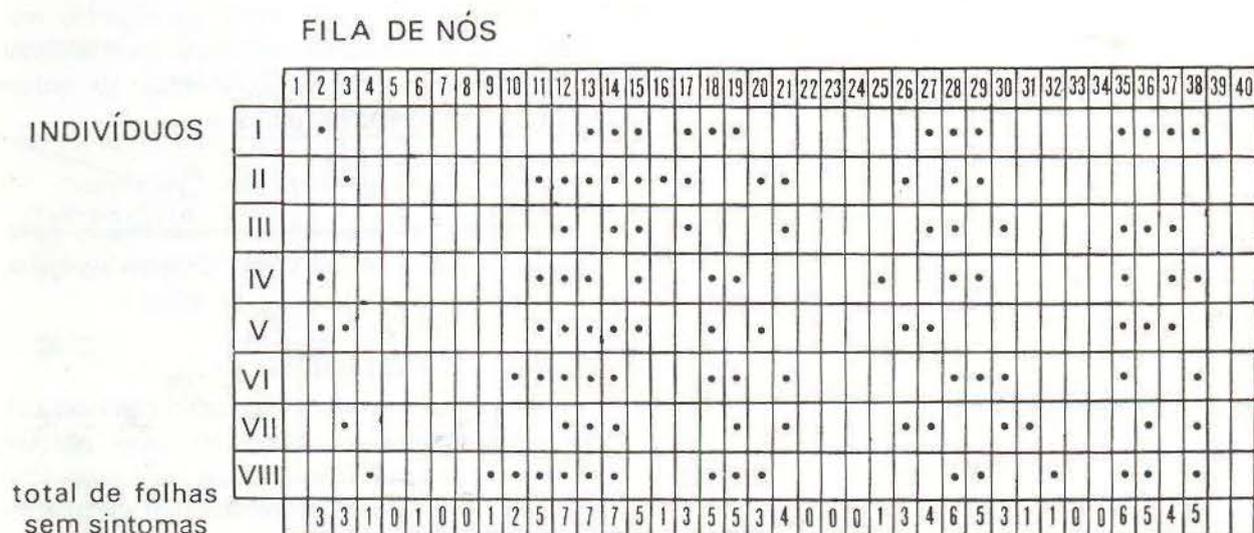


Fig. 3 — Presença de sintomas foliares do "Mosáico Africano da Mandioca" em função da linha do nó. Efetivo: 8 Indivíduos da linha "C B".

## B — TRANSMISSÃO DA DOENÇA PELO ENXERTO

Em todos os casos, a doença revelou-se transmissível e os sintomas de degenerescência exprimiram-se ao nível do garfo, nos casos em que o dispositivo experimental habitual foi utilizado (Fig. 1 H). Mas, a realização de enxertos inversos (garfo doente em cavalo saudável), mostrou que a transmissão do agente infeccioso pode operar-se nos dois sentidos.

### 1) Conservação da intensidade dos sintomas

Os sintomas do mosaico, que os clones de que dispomos exprimem, são mais ou menos fáceis de serem observados ( $I_1$  a  $I_4$ ). É interessante constatar que há equivalência entre a intensidade dos sintomas manifestados pelo cavalo e a intensidade manifestada ao nível do garfo contaminado; por exemplo,  $I_1$  relativamente aos enxertos saudáveis de "Baía de Along", sobre "H<sub>60</sub>", e  $I_2$  relativamente aos enxertos saudáveis de "Kaoli" ou "Abidjan" doentes. Ainda mais, esta intensidade mantém-se constante, mesmo após utilizar como estaca garfos aos quais a doença foi transmitida (Fig. 1 E e F).

### 2) Velocidade de propagação

Quando existe transmissão da doença pelo enxerto, esta exprime-se unicamente ao nível das folhas do garfo que são recém-formadas; as folhas que existiam, já no começo da experiência, não são modificadas.

Constatamos, porém, que o tempo decorrido entre o enxerto e a expressão dos sintomas de degenerescência é variável em grandes proporções (15 dias a 2 meses).

Uma experiência mais sistemática, fazendo intervir apenas a dimensão do rebento, e mantendo iguais todos os outros fatores, mostra claramente (Fig. 4) que o tempo latente, entre o momento do enxerto e o da expressão da doença, é tanto mais longo quanto maior for o garfo. Estes resultados indicam que a transmissão do agente patogênico intervém segundo um processo lento e progressivo.

Certas experiências de transplantações permitem completar esta interpretação. Quando um garfo manifesta sintomas de degenerescência, todas as estacas realizadas a partir dele exprimem a doença. Em contrapartida, antes da manifestação dos sintomas, apenas as

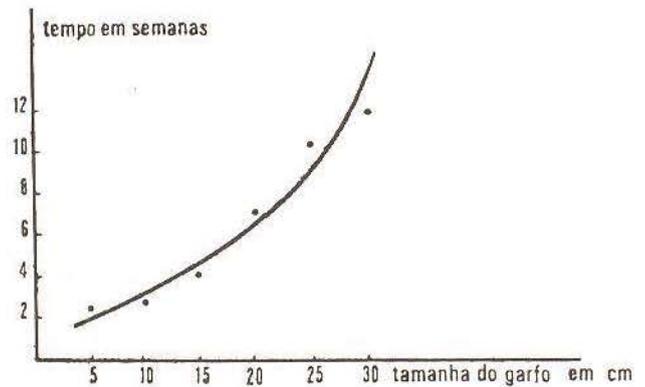


Fig. 4 — Tempo requerido para a expressão do "Mosaico Africano da Mandioca" em função do tamanho do garfo.

estacas provenientes da base dos garfos exprimem a degenerescência, enquanto que aquelas provenientes da parte superior continuam sãs.

Dispomos, deste modo, de um meio que nos permite analisar a velocidade de progressão do agente patogênico. Os resultados obtidos entre 15 dias e 3 meses, para garfos medindo respectivamente 5 a 30 centímetros, confirmam que a progressão é lenta: da ordem de alguns centímetros por semana.

## C — TENTATIVAS DE CULTURA "IN VITRO"

Todos os clones de que dispomos, apresentando ou não sintomas de degenerescência, puderam ser multiplicados *in vitro*.

### 1) Morfologia das plantas

As plantas mantidas nas condições de cultura acima citadas são caracterizadas por um tamanho miniatura (Fig. 5A) e pela aquisição de uma morfologia foliar lembrando a morfologia das primeiras folhas de uma planta diretamente nascida de uma semente (Fig. 5B). Estes fenômenos são atualmente conhecidos em plantas cultivadas *in vitro* (Nozeran & Bancilhon, 1972).

No caso da mandioca, podemos assistir a uma redução do número dos lóbulos foliares. Nas plantas cultivadas, segundo as condições da estufa, este número varia entre 3 e 7; em contrapartida, naquelas que são cultivadas num tubo de ensaio, a folha nunca excede os 3 lóbulos. Esta redução pode conduzir a uma folha simples, com uma série de intermediários que se diferenciam pelo número de lóbulos e

pela redução mais ou menos importante das reentrâncias da folha (Fig. 5B). A aparição de uma morfologia foliar simplificada, de tipo juvenil, intervêm progressivamente em função do número de novas transplantações, mas, no caso da mandioca, há sempre persistência de um certo polimorfismo foliar

O comportamento, *in vitro*, dos clones atingidos pelos sintomas de degenerescência, não é modificado; mas, apesar de tudo, manifestam um desenvolvimento menor do que nos saudáveis. As condições de cultura diminuem a expressão da doença, não só no que diz respeito à percentagem de folhas modificadas (99% em condições de estufa e 6% *in vitro* para o clone "Kataoli" doente) mas também quanto ao grau de intensidade dos sintomas. Mas, estes últimos são tanto mais fáceis de ser observados quanto o clone se encontra mais atingido pela doença, ao início da exposição.

## 2) Influência da temperatura

Esta tem uma grande influência na expressão da doença. A temperatura habitualmente utilizada (29°C), vimos que os sintomas são parcialmente mascarados. As temperaturas mais elevadas não se manifestam; isso já é uma indicação da existência de um efeito termoterapêutico. Em contrapartida, a 20°C, a expressão dos sintomas é muito mais marcada. Esta constatação, relacionada com as experiências de termoterapia é interessante, na medida em que nos oferece a possibilidade de efetuar um primeiro controle rápido quanto ao efeito terapêutico das temperaturas elevadas.

Por outro lado, estas condições de temperatura relativamente baixas afrouxa muito o desenvolvimento do aparelho vegetativo (Quadro 2): a produção é em média de 7 nós, em 5 meses, enquanto que o mesmo resultado é obtido em 6 semanas à temperatura de 29°C.

QUADRO 2 — Comportamento de  $H_{60}$  são e doente em função das temperaturas (20°, 29° e 37°C) após 3 meses de cultura.

Temperatura	clone	"H <sub>60</sub> "	"H <sub>60</sub> "	Teste de t
		são	doente	
20°C	M	3,0	2,5	1,83 <sup>+</sup>
	E-T	1,4	1,2	
29°C	M	11,2	11,5	- 0 NS
	E-T	1,7	1,4	
37°C	M	8,3	8,3	- 0 NS
	E-T	1,2	0,9	

Média do número de nós por planta.

		"H <sub>60</sub> "	"H <sub>60</sub> "	Teste de t
		são	doente	
M		3,0	1,2	9,66 <sup>**</sup>
	E-T	1,0	0,7	
M		5,4	5,7	-1,06NS
	E-T	1,5	1,4	
M		3,7	3,6	0 NS
	E-T	1,0	1,2	

Média do número de raízes por planta.

Temperatura	clone	"H <sub>60</sub> "	"H <sub>60</sub> "	Teste de t
		são	doente	
20°C	M	3,1	2,2	3,28 <sup>**</sup>
	E-T	1,4	1,2	
29°C	M	12,5	12,4	- 0 NS
	E-T	3,2	3,3	
37°C	M	7,2	7,4	- 0 NS
	E-T	3,2	3,3	

Tamanho médio em cm.

M = Média observada

E-T = Desvio-padrão

Teste t = Teste de Student

Valor das tábuas 5% = 2,00

1% = 2,66

NS = Diferença não significativa entre os clones.

+ = Diferença ligeira

\*\* = Diferença muito significativa

NÚMERO EFETIVO = 45 indivíduos para cada condição.

Multiplicação...



Fig. 5 — A) Pé de mandioca cultivado *in vitro*; 3.ª transplantação (clone "H<sub>60</sub>" saudável). a) raízes, b) folha simples; B) Diferentes tipos foliares obtidos em cultura *in vitro* (clone "H<sub>60</sub>" saudável); C) Indivíduos do clone "Kataoli", cultivados *in vitro*, exprimindo-se na estufa. 1) tratado pela termoterapia, 2) não tratado; D) Amostras do clone "H<sub>60</sub>" cultivados *in vitro*, transferidos depois para a estufa [experiência "bloc"; 1) doente não tratado; 2) doente tratado; 3) saudável não tratado; 4) saudável tratado.

Esta possibilidade de desenvolvimento reduzido apresenta um grande interesse no domínio da aplicação prática, pois nos permite construir, utilizando um pequeno volume e requerendo pouca manutenção, uma reserva de clones.

### 3) Taxas de multiplicação

Diversos fatores podem influenciar a eficácia das transplantações sucessivas realizadas *in vitro*. Numerosas tentativas mostraram que, com o meio de cultura utilizado, os melhores resultados eram obtidos quando se utilizavam, como estacas, indivíduos possuindo de 10 a 12 nós, a uma temperatura de 29°C.

Nestas condições, e a partir da 3ª transplantação, estado durante o qual o comportamento das plantas *in vitro* está estabilizado, podemos avaliar a velocidade teórica da multiplicação vegetativa.

Os resultados obtidos (Quadro 3) mostram, quando todas as outras condições são idênticas, as diferenças sensíveis em função dos clones. Apesar destas diferenças que podem ser atribuídas ou ao genótipo do clone ou aos efeitos da degenerescência, é possível obter, em todos os casos, uma taxa de multiplicação bem superior à observada na prática agrícola.

#### D — TRATAMENTOS DE TERMOTERAPIA

O material cultivado *in vitro* apresenta vantagens evidentes para a realização de tratamentos por termoterapia: material de tamanho pequeno (Fig. 5A); manutenção do aparelho vegetativo em condições ambientes idênticas

e ao abrigo de qualquer contaminação; taxa higrométrica elevada no interior do tubo, permitindo a ação prolongada de temperaturas elevadas; controle rigoroso das condições do meio ambiente: meio de cultura, temperatura, umidade.

Tentativas preliminares mostraram que a temperatura de 40°C constitui o máximo compatível com o tempo de sobrevivência suficientemente longo das amostras. Elas podem manter-se em vida durante várias semanas, mas a morfologia das plantas é muito modificada, sobretudo pela redução notável do tamanho dos entrenós.

A 37°C, porém, não constatamos modificações notórias no aparelho vegetativo; o tratamento pode, portanto, ser prolongado e, sobretudo, a transplantação continua possível.

#### 1) Busca de um tratamento eficaz

Levando em conta todas estas indicações, estabelecemos experiências comparativas, nas duas temperaturas citadas. O resultado é que a cura das plantas é função, simultaneamente, da duração do tratamento e do grau mais elevado de temperatura (Quadro nº 4). Mas o emprego da temperatura mais eficaz (da ordem dos 40°C) é limitado pelo estado de latência das plantas. Fomos, portanto, conduzidos a associar estas duas temperaturas em alternância (Fig. 6).

#### 2) Resultados obtidos

No protocolo experimental mais correntemente utilizado, as plantas atingidas pelos sintomas de degenerescência são primeiramente

QUADRO 3 — Velocidade de multiplicação vegetativa *in vitro* dos diferentes clones

Clones	Estado fitossanitário	Número de nós: planta de 2 meses de idade	Número de plantas que podem ser obtidas ao fim de um ano, a partir de 1 botão
H <sub>60</sub>	Saudável	10	10 <sup>6</sup> 1 000 000
H <sub>60</sub>	Doente	10	10 <sup>6</sup> 1 000 000
C B	Doente	10	10 <sup>6</sup> 1 000 000
H <sub>58</sub>	Doente	8	8 <sup>6</sup> 262 144
Mbengui	Doente	9	9 <sup>6</sup> 351 441
Kataoli	Doente	6	6 <sup>6</sup> 46 656
Abidjan	Doente	5	5 <sup>6</sup> 15 625

colocadas, 15 dias, numa estufa a 37°C, antes de ser transferidas para uma temperatura de 40°C, durante um mês e, para o final do tratamento, são reconduzidas, durante 45 dias a  $T^o = 37^oC$  (Fig. 6).

Este tratamento mostrou-se suficiente para a maioria dos clones, mas para outros, a obtenção da cura definitiva necessita de um complemento ao tratamento, o qual consiste na realização de novas transplantações durante o período, cuja temperatura é de 37°C. Deste modo, obtivemos a cura de todos os clones degenerescentes à nossa disposição.

### 3) Controle da cura e retorno às condições naturais

A passagem das plantas cultivadas *in vitro* às condições de estufa não apresenta dificuldades e triunfa em 98% dos casos. Os indivíduos transplantados adquirem, de novo, progressivamente, a morfologia normal (Fig. 5D). A passagem às condições de cultura *in vitro*, com tratamento térmico, ou sem ele não tem ação aparente sobre os indivíduos provenientes de clones sãos. Em contrapartida, constatamos que os indivíduos que vêm dos clones degenerescentes, tratados *in vitro* pela termoterapia, deixam de exprimir os sintomas da doença e apresentam um desenvolvimento vegetativo comparável ao dos indivíduos inicialmente sãos.

Diversos controles, fazendo intervir enxertos associados a estacas, mostram a erradicação completa da doença.

Para o clone "H<sub>16</sub>", fizemos uma experiência, a partir das 4 categorias (Fig. 5D) seguin-

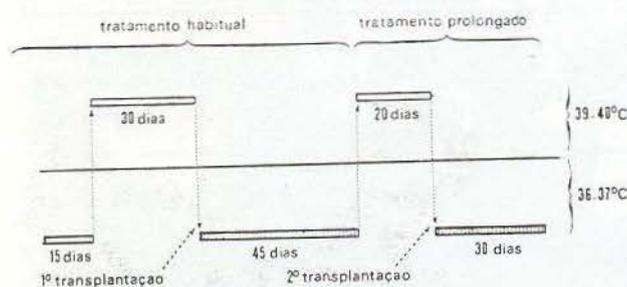


Fig. 6 — Esquema do tratamento pela termoterapia nas linhas da mandioca infectadas pelo "Mosaico Africano da Mandioca".

tes, todas submetidas anteriormente às condições de cultura *in vitro*: 1) saudável não tratada; 2) saudável tratada pela termoterapia; 3) doente não tratado; 4) doente tratado pela termoterapia.

Um estudo estatístico comparativo foi realizado a partir dos seguintes caracteres: tamanho dos indivíduos; número de nós; superfície foliar de 22<sup>a</sup> a 25<sup>a</sup> folha; rendimento, em peso, dos tubérculos.

Os resultados obtidos confirmam que, as plantas que provém de clones degenerescentes tratados pela termoterapia *in vitro* não exprimem diferenças significativas relativamente aos testemunhos saudáveis correspondentes (Fereol, 1978).

### DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Este trabalho foi empreendido com um objetivo muito preciso: o de encontrar condições eficazes ao tratamento de plantas doentes por meio da termoterapia e obter uma multiplicação rápida do clone curado, com vista à sua utilização na prática agrícola. Estes problemas puderam ser resolvidos graças à utilização das culturas *in vitro*.

Anteriormente, o estudo do material de origem, cultivado em estufa, permitiu especificar o comportamento fitopatológico das plantas atingidas pelos sintomas de degenerescência.

Assim, a heterogeneidade da repartição do agente infeccioso manifestado em certos clones, permitiu a obtenção de indivíduos sem sintomas, provenientes da transplantação de certas partes doentes de uma planta. Este fato implica que a multiplicação do agente patogênico não é regular no interior da planta. A conservação de partes indenes em indivíduos que se encontram muito atingidos, estabelece um problema importante. Constatamos que a transplantação de nós com gomos podia levar à produção de um ramo são e de um ramo doente. Esta observação deixa supor a existência de uma barreira impedindo a invasão de certos gomos pelo agente.

Bourriquet (1932), Storey & Nichols (1938) observam fenômenos análogos. Com efeito, eles indicam que uma planta doente pode pos-

QUADRO 4 — Taxa de cura de "H<sub>50</sub>" doente em função da temperatura e da duração do tratamento. São consideradas como curadas as plantas que, após ser sujeitas aos diversos meios de controle à nossa disposição, os ultrapassaram com sucesso

	36 — 37°C		39 — 40°C	
	n.º de plantas submetidas ao teste	n.º de plantas sãs	n.º de plantas submetidas ao teste	n.º de plantas sãs
3 semanas	12	0	13	1
4 semanas	12	0	10	2
5 semanas	11	0	12	6
6 semanas	12	2	12	6
12 semanas	10	7		
16 semanas	12	10		

suir certos ramos que não manifestam os sintomas de mosaico e que, ocasionalmente, uma estaca feita nesta planta pode conduzir a um indivíduo saudável. Casos similares foram assinalados em plantas de Tabaco infectadas pelo vírus do mosaico (TMV). Murakshi & Carlson (1975) mostraram que 50% das plantas regeneradas na cultura *in vitro*, a partir de placas foliares verde-escuros, revelaram-se indenes ao vírus.

As experiências de enxertos mostraram-nos a existência de um certo tempo de latência, precedendo a aparição dos primeiros sintomas na estaca. A partir de estacas de tamanhos diferentes e a partir de transplantações de nós isolados da estaca, não tendo ainda manifestado adoença, é possível determinar a velocidade de progressão do agente infeccioso. Levando em linha de conta os resultados obtidos (entre 15 dias e 3 meses para as estacas de 5 a 30 cm) esta velocidade parece lenta. É razoável deduzir que o agente não deve ser veiculado passivamente pela seiva. Com base nestas observações, outras investigações essencialmente histológicas e histoquímicas, deveriam permitir a delimitação das vias de progressão do agente, bem como do processo utilizado na transmissão da doença.

As técnicas tradicionais de multiplicação vegetativa da mandioca deram resultados limitados. A utilização de hormônios para o melhoramento das plantações permite, apesar de

tudo, triplicar a produção (Chant & Marden, 1958).

Segundo o nosso conhecimento, os melhores resultados foram obtidos pela C.I.A.T.<sup>(1)</sup>, por intermédio de microestacas, com toda a produção obtida, a partir de uma planta-mãe possuindo 300 nós que renderam 18.000 estacas comercializáveis num mesmo ano. As técnicas de multiplicação vegetativa *in vitro* permitiram-nos obter um ritmo de multiplicação particularmente elevado e, conseqüentemente, prever um ganho de tempo apreciável para a reconstituição dos clones. A adaptação da mandioca à cultura *in vitro* não levanta problemas. A eficiência da multiplicação é em função da origem do clone, mas continua a ser possível, mesmo nos casos mais desfavoráveis, obter resultados interessantes para a aplicação prática

A manutenção das plantas em cultura *in vitro*, pelo menos nas condições habitualmente utilizadas, traduz-se pela aquisição de uma morfologia particular, cujo caráter mais evidente é a miniaturização do conjunto formado pelo aparelho vegetativo. Uma observação interessante é que esta redução morfológica está ligada à aparição de caracteres que se manifestam habitualmente em plantas nascidas de uma semente, durante os primeiros estados de desenvolvimento, mostrando a aquisição de uma morfologia foliar simplificada de tipo juvenil. É possível que o estabelecimento destes caracte-

(1) — C.I.A.T. Centro Internacional de Agricultura Tropical.

teres esteja ligado, em parte, às modificações na organização anatômica, e também à redução do meristema terminal, como mostram investigações recentes (Nozeran & Bancilhon-Rossignol, 1977; Gonod, 1977; Nozeran *et al.*, 1979). A origem desta morfologia particular parece residir nas condições apresentadas pelo meio *in vitro*, e a temperatura parece ter um papel muito importante neste fenômeno.

Pelo menos, no quadro das experiências realizamos, estas condições provocam, nas plantas doentes, uma diminuição da intensidade e da expressão dos sintomas do mosaico. Na grande maioria dos casos, e fazendo exceção às temperaturas elevadas (37°-40°C), cujo efeito já foi analisado, trata-se de um simples disfarce da doença. O retorno às condições de estufa permite, de novo, a expressão dos sintomas habituais. Pudemos constatar que certos indivíduos, quando a 29°C, curavam-se espontaneamente. As razões deste fenômeno ficam por explicar. O estado atual das investigações não permite escolher entre o efeito direto do meio ambiente e a aquisição feita pela planta, sob estas condições, de propriedades fisiológicas eventualmente ligadas a um estado juvenil mais ou menos acentuado — estas propriedades podendo limitar a expressão dos sintomas ou mesmo a multiplicação do agente patogênico. Esta interpretação poderia ligar-se ao fato de o meristema terminal, assim como o embrião das plantas contaminadas, não alojarem o agente da doença (Kartha & Gamgorg, 1974).

Os tratamentos de termoterapia aplicados às plantas cultivadas *in vitro*, revelaram-se eficazes relativamente ao material que utilizamos. Estes nos permitiram dispor de novos materiais indenes de sintomas de mosaico, pelo menos quanto aos marcadores que usamos e com base nos controles que estabelecemos. É evidente que esta parte do trabalho deveria ser completada pela adaptação ao material das técnicas modernas de virologia, necessitando, num primeiro passo, da determinação e do isolamento do agente patogênico.

É preciso sublinhar que a realização do tratamento em plantas cultivadas *in vitro*, favorece dadas a miniaturização e as condições particulares do meio ambiente, o sucesso das

tentativas de termoterapia. A duração dos tratamentos é tal que podemos dificilmente imaginar a sua aplicação às plantas cultivadas em condições habituais.

Falta ainda definir os modos de ação da termoterapia. Vimos que, para certos clones, a cura é obtida pela ação isolada do tratamento térmico, enquanto, para outras, é necessário fazer transplantações durante o tratamento. Algumas experiências de termoterapia feitas *in vivo* por Chant (1959), dão resultados que estão de acordo com os precedentes. Eles demonstraram que o transplante de ramos recentemente formados sobre plantas doentes durante o tratamento, permite chegar mais facilmente à cura, do que no caso do transplante de plantas inteiras no fim do tratamento.

Estes fatos autorizam a pensar que as transplantações durante o tratamento intervêm isolando certas porções da planta, indenes do agente infeccioso. É preciso notar que, a partir da segunda transplantação, subsiste apenas o material formado durante o tratamento. É provável que, pelo menos nos casos dos clones que estudamos, as temperaturas elevadas tenham por efeito impedir a multiplicação do agente — sem necessariamente o destruir — e que apenas as partes da planta recentemente formadas lhes seriam indenes. Experiências de transplantação, nó a nó, de indivíduos que receberam um tratamento parcial de termoterapia, parecem verificar esta hipótese. Os resultados obtidos mostraram que as estacas da base (existindo já antes do tratamento), dão origem a indivíduos que manifestam os sintomas da degenerescência, enquanto que as estacas da parte superior (formadas durante o tratamento) originam plantas saudáveis.

O método que propomos parece oferecer perspectivas interessantes, sobretudo quando confrontado a outros utilizados com sucesso, na tentativa de eliminar as doenças virais na mandioca: criação de híbridos resistentes (Magoon *et al.*, 1970), culturas de meristemas (Kartha & Gamgorg, 1974; Berbee *et al.*, 1974).

Por um lado, a miniaturização das plantas cultivadas *in vitro* permite o tratamento simultâneo de um grande número de indivíduos em circuito fechado, condicionado, de tamanho reduzido, reforçando a eficiência dos tratamen-

tos. Por outro lado, esta técnica permite proceder imediatamente a uma multiplicação vegetativa acelerada conduzindo a reconstituição rápida de um clone saudável, desde que não sofra contaminações.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi proposto pelo Professor Nozeran, a quem agradecemos por seus inúmeros conselhos, assim como pelo material que trouxe de uma missão ao Vietnã. O material africano foi-nos concedido graças à gentileza do sr. Tardieu (I.R.A.T.).

#### SUMMARY

Cassava clones traditionally cultivated in Africa, frequently show some degenerating signs ("African Cassava mosaic"). Referring to an healthy clone from Viet-Nam, the distribution, transmission and progression of the causal agent have been observed from cutting and graft experiments. *In vitro* culture enable us to adjust thermotherapy treatments leading to the cure of all the studied clones and to obtain an accelerated vegetative multiplication leading to the rapid reconstitution of healthy clones.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECK, B.D. & CHANT, S.R.  
1958 — A preliminary investigation of the effect of mosaic virus on *Manihot utilissima* Pohl in Nigeria. — *Tropical Agriculturist* 1958, p. 59-64, janeiro.
- BERBEE, F.H.; BERBEE, J.G.; HILDEBRANDT, A.C.  
1974 — Induction of callus and virus — symptomless plants from stem tip cultures of cassava *in vitro*. *Annual Meeting Abstracts*, 8: 421.
- BORRIQUET, G.  
1932 — Les Maladies du Manioc à Madagascar. *Rev. Path. Veg.*, 19: 290.
- BOUZID, S.  
1973 — *Utilisation des cultures in vitro pour la solution de problèmes posés pour l'amélioration des agrumes (en particulier multiplication végétative)*. Thèse 3ème cycle. Fac. Sc. Tunis, 78.
- BOUZID, S. & LASRAM, M.  
1971 — Utilisation des cultures *in vitro* pour l'obtention de clones de *Citrus* homogènes et de bon état sanitaire. 8e Cong. Inst. Agron. Mediter. "Holland Peel" C.L.A.M. II, 1-16.
- CHANT, S.R.  
1959 — A note of the inactivation of mosaic virus in Cassava (*Manihot utilissima*) by heat treatment. *Exp. Journal Agric.*, 27: 55-58.
- CHANT, S.R. & MARDEN, J.A.  
1958 — A method for the rapid propagation of Cassava Cuttings. *Tropical Agriculture*, Trinidad, 35 (3): 195-199, tabl. (5), ill. bibl., 6 ref.
- COURS, G.  
1951 — *Le Manioc à Madagascar*. Mémoire de l'Institut Scientifique de Madagascar — Série B. Tome III. Fascículo 2.
- FAVRE, J.M.  
1970 — Influence de facteurs internes sur la cinétique d'enracinement de la vigne cultivée *in vitro*. *Rev. Gen. Bot.*, 77: 519-562.  
1973 — Effects corrélatifs de facteurs internes et externes sur la rhizogenese d'un clone de vigne cultivée *in vitro*. *Rev. Gen. Bot.*, 80, 273-361.
- FEREOL, L.  
1978 — *Multiplication végétative et élimination des phénomènes de dégénérescence chez des clones de Manioc (Manihot esculenta CRANTZ) cultivés in vitro*. Thèse 3ème cycle, Université Paris-Sud (Orsay).
- GALZY, R.  
1964 — Technique de thermothérapie des viroses de la vigne. *Ann. epiphytes*, 15/3: 245-256.
- GONOD, M.C.  
1977 — *Morphogénèse de divers clones de Dalhia variabilis multipliés végétativement in vitro: Miniaturisation, rejuvenissement, variabilité*. Thèse 3ème cycle, Université Paris-Sud (ORSAY).
- GRENNAN, S.  
1976 — *Analyse de phénomènes morphogénétiques posés par la multiplication végétative in vitro de la pomme de terre: Solarum tuberosum L. var. B.F. 15* — Thèse Université Paris-Sud.
- JENNINGS, D.L.  
1957 — Further studies of breeding Cassava for virus resistance. *East African Agricultural Journal*, 22 (4): 213-219.  
1960 — Observations on virus diseases of Cassava in resistant and susceptible varieties I, Mosaic disease II. Brown streak disease. *Empire journal of experimental Agriculture*, (28): 23-34 et 261-270.
- KARTHA, K.K. & GAMBORG, O.L.  
1974 — Elimination of Cassava mosaic disease by meristem culture. *Phytopathology*, 65: 826-828.
- KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S.  
1966 — Spheroidal particles associated with Cassava mosaic virus. *Bragantia*, 25: 211-221.

- MAGOON, M.L.; KRISHNAN, R.; JAYABAY, K.  
1970 — Cytogenetics of the F<sub>1</sub> hybrid between Cassava and Ceara rubber and its back cross. *Genética*, 41: 425-436.
- MARAKISHI, H.H. & CARLOS, P.S.  
1957 — Regeneration of virus free plants from dark green Islands of Tobacco mosaic virus infected tobacco leaves. *Phytopathology*, 66: 931-932.
- NOZERAN, R. & BANCILHON-ROSSIGNOL, L.  
1972 — Les cultures *in vitro* en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plants. *Ann. Amélior. Plantes*, 22: 167-185.  
1977 — La multiplication végétative chez les végétaux vasculaires — Soc. Bot. F.; *Coll. Mult. végét.* 124: 59-96.
- NOZERAN, R.; BANCILHON-ROSSIGNOL, L.; GREANAN, G.  
1977 — Nouveils possibilités d'obtention et de multiplication rapide de clones sains de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) L.C.R. Acad. Sci. Paris, — t: 285.
- NOZERAN, R.; DUCREUX, G.; NEVILLE, P.; BANCILHON-ROSSIGNOL, L.  
1979 — Ramifications et corrélations morphogènes — Soc. Bot. Fr.; *Act Bot* (sous presse).
- PANNETIER, C. & LANAUD, C.  
1976 — Divers aspects de l'utilisation possible des cultures *in vitro* pour la multiplication de l'*Ananas Comosus* LL. MERR, variété "Cayenne lisse". *Fruits*, 31 (12): 739-750.
- SIHASCHAKR, A.  
1974 — Contribution à l'étude du phénomène de tubérisation et premiers essais de multiplication végétative en culture "*in vitro*" de la patate douce. Mémoire diplôme d'études approfondies. Orsay.
- STOREY, H.H. & NICHOLS, R.F.W.  
1958 — Virus diseases of East African plants. VII. A field experiment in the transmission of Cassava mosaic. *East Afric.* 5, III, 6: 446-449.
- SILVA, D.H.  
1962 — Obtaining an antiserum against Cassava mosaic virus. — *Bragantia*, 21 XCIX — C II.
- VALAT, C. & MUR, G.  
1976 — Thermothérapie du Cardinal rouge. *Progres. agric. vitic.* 6: 200-202.

(Aceito para publicação em 03/09/79)