

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE MAMOEIRO  
'TAINUNG 01'**

**OMAR SCHMILDT**

**ALEGRE  
ESPÍRITO SANTO - BRASIL  
FEVEREIRO - 2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE MAMOEIRO  
'TAINUNG 01'**

**OMAR SCHMILDT**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt

Co-orientadores: Prof. Dr. José Augusto Teixeira do Amaral  
Prof. Dr. Sebastião Martins Filho

**ALEGRE  
ESPÍRITO SANTO - BRASIL  
FEVEREIRO – 2006**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

S354m Schmidt, Omar, 1972-  
Multiplicação *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01' / Omar Schmidt. –  
2006.  
46 f. : il.

Orientador: Edilson Romais Schmidt.

Co-Orientadores: José Augusto Teixeira do Amaral, Sebastião  
Martins Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo,  
Centro de Ciências Agrárias.

1. Mamão - Propagação-in vitro. 2. Tecidos (Anatomia e fisiologia) -  
Cultura e meios de cultura. 3. Reguladores de crescimento. I. Schmidt,  
Edilson Romais. II. Amaral, José Augusto Teixeira do. III. Martins Filho,  
Sebastião. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
Agrárias. V. Título.

CDU: 63

---

# MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE MAMOEIRO 'TAINUNG 01'

**OMAR SCHMILDT**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada: 23 de fevereiro de 2006.

---

Prof. Dr. Ruimário Inácio Coelho  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Prof. Dr. Silvio Lopes Teixeira  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro

---

Prof. Dr. José Augusto Teixeira do  
Amaral  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Co-orientador)

---

Prof. Dr. Sebastião Martins Filho  
Universidade Federal de Viçosa  
(Co-orientador)

---

Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Banco do Nordeste do Brasil S/A, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Ao professor Edilson Romais Schmildt, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio e pelo incentivo.

Ao professor José Augusto Teixeira do Amaral, pela atenção e pelas sugestões.

Ao Professor Sebastião Martins Filho, pela atenção, pelas sugestões e pelo auxílio na condução das análises estatísticas.

À Célia Cristina Costa S. Lima, pela correção do português e inglês da dissertação.

A todos os professores das disciplinas cursadas, pelos ensinamentos transmitidos.

À secretária da Pós-Graduação, Madalena Caetana Capucho de Oliveira, pela atenção e amizade.

Aos estagiários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Alaert Zini Júnior e Wanderson Souza Rabello, pelo auxílio na condução dos experimentos e pela amizade.

Aos meus colegas de curso, que de alguma forma contribuíram para o cumprimento desta jornada.

À Fertilizantes Heringer, pela doação de adubos, para o preparo das mudas.

## **BIOGRAFIA**

Omar Schmidt, filho de Laureço Schmidt e de Ernestina Schmidt, nasceu em 06 de abril de 1972, em Linhares, Estado do Espírito Santo.

Em maio de 2001, diplomou-se Engenheiro Agrônomo, pela Universidade Federal do Espírito Santo.

Trabalhou como autônomo no período compreendido entre os anos de 2002 e 2003.

Em Março de 2004, iniciou o curso de mestrado em Produção Vegetal na Universidade Federal do Espírito Santo, situada no município de Alegre-ES.

## CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE ABREVEATURAS .....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
INTRODUÇÃO .....	1
REVISÃO DE LITERATURA .....	4
Considerações Gerais .....	4
Fase de Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	5
Fase de Multiplicação <i>in vitro</i> .....	9
REFERÊNCIAS .....	12
CAPÍTULO 1 – Influência de níveis de ANA e Cinetina na multiplicação <i>in vitro</i> de mamoeiro ‘Tainung 01’ .....	17
CAPÍTULO 2 – Multiplicação <i>in vitro</i> de ramos de mamoeiro ‘Tainung 01’ em diferentes níveis de sulfato de adenina .....	29
CONCLUSÕES GERAIS .....	42
ANEXO .....	43

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Resumo da análise de variância para a porcentagem de culturas sobreviventes, porcentagem de culturas reativas e massa de calos de mamoeiro 'Tainung 01', após 30 dias em meio de estabelecimento com diferentes níveis de ANA e Cinetina ..... 22
- Tabela 2.** Resumo da análise de variância da taxa de multiplicação dos 3 melhores tratamentos da fase de estabelecimento de mamoeiro 'Tainung 01', ao longo de 5 subcultivos em meio de multiplicação ..... 26

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Resumo da análise de variância para a massa fresca da parte aérea, número de ramos aptos e não aptos ao enraizamento de mamoeiro 'Tainung 01', após 30 dias em meio de multiplicação, com diferentes níveis de sulfato de adenina (SA), com a remoção ou não de folhas no recultivo ..... 33
- Tabela 2.** Massa fresca da parte aérea de mamoeiro 'Tainung 01', após 30 dias em meio de multiplicação, com a remoção ou não das folhas no recultivo . 34
- Tabela 3.** Número de ramos aptos e não aptos ao enraizamento de mamoeiro 'Tainung 01', após 30 dias em meio de multiplicação, em função dos níveis de sulfato de adenina, com a remoção ou não das folhas no recultivo ..... 38
- Tabela 4.** Aspecto visual dos tufo de ramos de mamoeiro 'Tainung 01', após 30 dias em meio de multiplicação, em função dos níveis de sulfato de adenina, com a remoção ou não das folhas no recultivo ..... 39

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Porcentual de culturas sobreviventes de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de estabelecimento contendo diferentes níveis de ANA (A) e Cinetina (B). (As barras verticais indicam os erros padrões da média) ..... 23
- Figura 2.** Porcentual de culturas reativas de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de estabelecimento contendo diferentes níveis de ANA e Cinetina. (As barras verticais indicam os erros padrões da média) ..... 24
- Figura 3.** Massa de calos de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de estabelecimento contendo diferentes níveis de ANA e Cinetina. (As barras verticais indicam os erros padrões da média) ..... 25
- Figura 4.** Taxa de multiplicação do mamoeiro ‘Tainung 01’, durante 5 subcultivos, em meio de multiplicação ..... 26

### CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Massa fresca da parte aérea de mamoeiro ‘Tainung 01’, em função dos níveis de sulfato de adenina, após 30 dias em meio de multiplicação. (As barras verticais indicam os erros padrões da média) ..... 34
- Figura 2.** Número de ramos aptos ao enraizamento ( $\geq 5$  mm) de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de multiplicação, em função dos níveis de sulfato de adenina, com a remoção ou não das folhas no recultivo. (As barras verticais indicam os erros padrões da média) ..... 36
- Figura 3.** Número de ramos não aptos ao enraizamento ( $< 5$  mm) de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de multiplicação, em função dos níveis de sulfato de adenina, com a remoção ou não das folhas no recultivo ..... 37

**ANEXO**

**Figura 1A** – Plantas doadoras de explantes de mamoeiro ‘Tainung 01’ produzidas em casa de vegetação. CCAUFES, Alegre, ES, 2005 ..... 44

**Figura 2A** – Explantes de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de estabelecimento, com diferentes níveis de ANA e Cinetina (CIN) em mg L<sup>-1</sup> (A = 0,093 ANA + 5,38 CIN; B = 0,093 ANA + 10,76 CIN; C = 0,093 ANA + 21,52 CIN; D = 0,931 ANA + 5,38 CIN; E = 0,931 ANA + 10,76 CIN; F = 0,931 ANA + 21,52 CIN; G = 1,862 ANA + 5,38 CIN; H = 1,862 ANA + 10,760 CIN; I = 1,862 ANA + 21,52 CIN). CCAUFES, Alegre, ES, 2005 ..... 45

**Figura 3A** – Brotações de mamoeiro ‘Tainung 01’, em meio de multiplicação com utilização de 30 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina (A = no frasco de cultivo; B = ampliação mostrando detalhes dos novos ramos sendo formados). CCAUFES, Alegre, ES, 2005 ..... 46

## LISTA DE ABREVIATURAS

### **Auxinas:**

ANA – Ácido  $\alpha$ -Naftalenoacético

AIB – Ácido 3-Indolilbutírico

AIA – Ácido 3-Indolilacético

2,4-D – Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

### **Citocininas:**

CIN – 6-Furfurilaminopurina (Cinetina)

BAP – 6-Benzilaminopurina

2<sub>i</sub>P – 6-(Y,Y-dimetilamino) Purina

### **Meio Nutritivo:**

MS – Meio de cultura proposto por Murashige & Skoog (1962)

## RESUMO

SCHMILDT, Omar, M.Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, Fevereiro de 2006. **Multiplicação *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'**. Orientador: Edilson Romais Schmidt. Co-orientadores: José Augusto Teixeira do Amaral; Sebastião Martins Filho.

Foram realizados experimentos em meio de estabelecimento e de multiplicação com o objetivo de avaliar a micropropagação do mamoeiro (*Carica papaya* L.) Híbrido 'Tainung 01', geração F<sub>1</sub>, utilizando-se segmentos apicais e segmentos apicais de brotações laterais provenientes das plantas juvenis cultivadas em casa de vegetação. No meio de estabelecimento MS, utilizando-se segmentos apicais, foram testadas diferentes combinações dos reguladores de crescimento ANA (0,093; 0,931 e 1,862 mg L<sup>-1</sup>) e Cinetina (5,38; 10,76 e 21,52 mg L<sup>-1</sup>) para identificação da melhor relação para a sobrevivência, a reatividade e a massa de calo. Com a utilização de 0,093 mg L<sup>-1</sup> de ANA combinado com 5,38 mg L<sup>-1</sup> de Cinetina, obteve-se a melhor formação de roseta foliar com 100% de culturas reativas, indicando haver adaptação dos explantes *in vitro*, além da menor formação de calo, podendo ser comprovado com a boa reação destes explantes em meio de multiplicação MS com ANA a 0,093 mg L<sup>-1</sup> e BAP a 0,45 mg L<sup>-1</sup>, durante cinco subcultivos, com taxa de multiplicação constante de 5,288:1. Numa segunda etapa, com a utilização de segmentos apicais de brotações laterais, avaliou-se a multiplicação em meio MS com diferentes níveis de sulfato de adenina. Para o preparo do meio de estabelecimento, utilizou-se a melhor combinação dos reguladores de crescimento ANA e Cinetina obtidos anteriormente, enquanto que

para o meio de multiplicação, usou-se ANA a  $0,093 \text{ mg L}^{-1}$ , BAP a  $0,45 \text{ mg L}^{-1}$  e diferentes níveis de sulfato de adenina (0; 30; 60; 90 e  $120 \text{ mg L}^{-1}$ ), associados com remoção ou não das folhas da roseta foliar formada no meio de estabelecimento. Os tufos de ramos foram subcultivados a cada 30 dias em tufos menores, e ao final do quarto subcultivo, foram feitas as avaliações da massa fresca da parte aérea, número de ramos aptos ( $\geq 5 \text{ mm}$ ) e não aptos ( $< 5 \text{ mm}$ ) ao enraizamento e o aspecto visual dos tufos de ramos. As melhores respostas para o número de ramos aptos ao enraizamento ( $\geq 5 \text{ mm}$ ) foram encontradas com a presença das folhas para os tratamentos 0, 30, 60 e  $90 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfato de adenina. Recomenda-se utilizar  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfato de adenina no meio de multiplicação pela qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas, com ramos alongados e pecíolos longos, com bom padrão para posterior enraizamento.

**Palavras-chave:** *Carica papaya* L., cultura de tecidos, meio de estabelecimento, reguladores de crescimento, sulfato de adenina, taxa de multiplicação.

## ABSTRACT

Experiments were accomplished in establishment and multiplication medium with the objective of evaluating the micropropagation of the papaya tree (*Carica papaya* L.) Hybrid 'Tainung 01', generation F<sub>1</sub>, being used apical sections and apical sections of lateral buds of juvenile plants, cultivated in greenhouse. In the MS establishment medium, being used apical sections, different combinations of growth regulators were tested NAA (0.093; 0.931 and 1.862 mg L<sup>-1</sup>) and kinetin (5.38; 10.76 and 21.52 mg L<sup>-1</sup>) for identification of the best relationship for the survival, reactivity and callus mass. With the use of 0.093 mg L<sup>-1</sup> of NAA combined with 5.38 mg L<sup>-1</sup> of kinetin was obtained the best rosette of leaves formation with 100% of cultures reactivate, indicating there to be adaptation of the explants *in vitro*, besides to smallest callus formation, could be proven with the good reaction of these explants in MS multiplication medium with NAA to 0.093 mg L<sup>-1</sup> and BAP to 0.45 mg L<sup>-1</sup> during five subculture, with rate of constant multiplication of 5.288:1. In a second stage, with the use of apical sections of lateral buds, the adenine sulfate was evaluated in the multiplication medium. For the preparation of the establishment medium the best combination of the growth regulators was used NAA and kinetin obtained previously, while for the multiplication medium NAA was used to 0.093 mg L<sup>-1</sup> and BAP to 0.45 mg L<sup>-1</sup>, and different levels of adenine sulfate (0; 30; 60; 90 and 120 mg L<sup>-1</sup>), associated with removal or not of the leaves of the rosette of leaves formed in the establishment medium. The tufts of shoots were subculture every 30 days in smaller tuft and, at the end of the fourth subculture they were made the evaluations of the fresh mass of the aerial part, number of capable shoots ( $\geq 5$  mm) and no capable ( $< 5$  mm) to the promoting root formation, and the visual aspect of the tufts of shoots.

The best answers for the number of capable shoots to the promoting root formation ( $\geq 5$  mm) they were found with the presence of the leaves, for the treatments 0, 30, 60 and 90 mg L<sup>-1</sup> of adenine sulfate. It is recommended to use 30 mg L<sup>-1</sup> of adenine sulfate in the multiplication medium for the quality and homogeneity of the produced aerial parts, with prolonged shoots and long petiole, with good pattern for subsequent promoting root formation.

**Key Words:** *Carica papaya* L., tissue culture, establishment medium, growth regulators, adenine sulfate, multiplication rate.

## INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma espécie típica de regiões tropicais e subtropicais da América, sendo uma das principais fruteiras cultivadas. As regiões produtoras estão localizadas em uma faixa do globo terrestre compreendida entre os trópicos de Câncer e Capricórnio, a 21° de latitude Norte e 21° de latitude Sul (Alves, 2003). No Brasil, o mamoeiro é cultivado praticamente em todos os Estados brasileiros. Porém, Bahia e Espírito Santo são os dois maiores produtores e, mais recentemente, no Estado do Rio Grande do Norte a cultura apresenta maiores índices tecnológicos em sua produção (Costa et al., 2005).

O Brasil é o maior produtor de mamão, contribuindo com 25% da produção mundial (AGRIANUAL, 2004).

As cultivares de mamoeiro mais utilizadas no Brasil são: 'Sunrise Solo', 'Improved Sunrise Solo Line 72/12' e 'Sunrise Golden', (grupo Solo), como linhagens puras; 'Tainung 01' (grupo Formosa), como híbrido simples, sendo as sementes deste híbrido importadas de Taiwan; e, mais recentemente, o primeiro híbrido de mamão Formosa brasileiro, o 'Calimosa' (UENF-Caliman 01). O Híbrido 'Tainung 01' foi desenvolvido pela Estação Experimental de Fengshan, em Formosa, China, e é resultante do cruzamento entre 'Sunrise Solo' e uma seleção da Costa Rica, de polpa vermelha (Costa & Pacova, 2003). Este híbrido é altamente produtivo e apresenta grande aceitação no mercado interno brasileiro, sendo, também exportado para a Europa e os Estados Unidos.

A propagação do mamoeiro em plantios comerciais tem sido realizada por meio de sementes, porém induz à ocorrência de variações genéticas indesejáveis nas suas descendências devido à polinização livre (Drew, 1987; Costa & Pacova,

2003). Outro problema verificado é a necessidade de se colocar de duas a três mudas por cova, tendo que fazer o desbaste das plantas após o início do florescimento, em torno de três a quatro meses após o plantio, quando se torna possível a identificação do sexo das plantas, deixando uma planta por cova, preferencialmente plantas hermafroditas, devido ao fruto desta apresentar bom padrão comercial (Costa et al., 2003). Essas situações contribuem para o encarecimento das lavouras e dos frutos que chegam aos consumidores, visto que as sementes do mamoeiro 'Tainung 01' são importadas de Taiwan a um preço elevado.

As desvantagens atribuídas à utilização de sementes, demonstram a necessidade da procura por alternativas à propagação seminífera. A propagação vegetativa pode ser realizada por estaquia e enxertia, no entanto não é eficiente em escala comercial pela pequena quantidade de brotos laterais produzidos pela planta-matriz, em face da sua forte dominância apical (Modesto & Siqueira, 1981; Reuveni & Shlesinger, 1990), e também devido à dificuldade de enraizamento das estacas (Grana Jr., 2000).

A obtenção de grande número de mudas de mamoeiro com alta qualidade fitossanitária e genética, pode ser obtida de um único explante através da cultura de tecidos vegetais. Para a propagação clonal do mamoeiro podem ser utilizados como explantes segmentos apicais e gemas laterais de plantas adultas (Drew, 1987; Vianna, 1996), embora com limitações no subcultivo *in vitro*. A micropropagação também pode ser realizada utilizando como explantes os segmentos nodais (Drew, 1992), podendo ser provenientes tanto de plantas adultas (brotações laterais), quanto de plântulas. Outra opção de micropropagação é por meio da utilização dos segmentos apicais de planta juvenis (Schmildt, 1994; Teixeira & Teixeira, 2004) tendo mostrado-se mais eficiente no desenvolvimento *in vitro*. O uso tanto de segmentos apicais, quanto de segmentos nodais apresentam um rendimento maior quando se usa plantas juvenis ao invés de plantas adultas, conseguindo-se obter maior número de subcultivos *in vitro* (George & Sherrington, 1984).

Este trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de propagação vegetativa para o mamoeiro 'Tainung 01', por cultivo *in vitro* de explantes provenientes de plantas juvenis:

- 1) para o meio de estabelecimento MS, por meio da melhor combinação dos reguladores de crescimento ANA e Cinetina, utilizando-se segmentos apicais;

2) para o meio de multiplicação MS, por meio do melhor nível de sulfato de adenina, associado com a remoção ou não das folhas formadas no meio de estabelecimento da cultura, utilizando-se segmentos apicais de brotações laterais.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Considerações Gerais

As técnicas de cultura *in vitro* são excelentes instrumentos auxiliares no melhoramento das culturas de interesse econômico, como o mamoeiro, bem como na propagação vegetativa das espécies (Carrer, 1988).

Para o mamoeiro a propagação clonal *in vitro* ainda não é utilizada comercialmente (McCubbin & Van Staden, 2003). Oliveira et al. (1996) e Teixeira & Teixeira (2004) afirmam que os protocolos de micropropagação descritos por outros autores, ainda não se encontram suficientemente aperfeiçoados para o uso comercial.

Protocolos têm sido desenvolvidos para a propagação *in vitro* de espécies de plantas, podendo ser dividido em três sistemas conforme Drew (1992): sistema 1 que é baseado na cultura de calos, seguido pela organogênese ou embriogênese somática; o sistema 2 compreende a multiplicação de gemas axilares e/ou gemas adventícias através de repetidos subcultivos em meio de multiplicação contendo citocinina; e o sistema 3 por meio de segmentos nodais contendo gemas axilares a partir de ramos com dominância apical, sendo crescidos em meio sem reguladores de crescimento ou meio com baixos níveis de citocininas.

Segmentos apicais e gemas axilares são os explantes mais indicados na propagação clonal *in vitro*. Eles possuem determinação para o crescimento vegetativo e, satisfeitas as necessidades nutricionais, irão se desenvolver naturalmente em novas plantas (Grattapaglia & Machado, 1998). A cultura de segmentos apicais apresenta como vantagens, na maioria dos casos a manutenção

da identidade do genótipo regenerado, em virtude das células do meristema manterem mais uniformemente a sua estabilidade genética (Murashige, 1974; Grout, 1990). O explante usado para iniciar uma cultura pode ser um segmento apical de ramo principal ou lateral, de até 20 mm de comprimento em posição vertical (George & Sherrington, 1984). Em mamoeiro, o bom desenvolvimento e adaptação dos explantes ao meio de estabelecimento são observados com segmentos apicais entre 5 e 10 mm de comprimento (Rajeevan & Pandey, 1983; Schmildt, 1994; Vianna, 1996; Schmildt & Amaral, 2002). Yie & Liaw (1977) e Litz & Conover (1978a) foram os primeiros a contribuírem para o desenvolvimento *in vitro* de mamoeiro (*Carica papaya* L.) por meio do sistema 2, utilizando como explantes segmentos apicais provenientes de plântulas e plantas adultas, respectivamente.

O conceito de estádios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro* foi descrito por Murashige (1974). Ele estabeleceu uma seqüência de três estádios. O estádio I compreende a seleção, a desinfestação e o cultivo dos explantes em meio nutritivo (fase de estabelecimento), sob condições assépticas; no estádio II, se processa a multiplicação dos propágulos, por meio de sucessivos subcultivos em meio próprio para a multiplicação; o estádio III é a fase de transferência dos ramos formados na fase anterior, para o meio de enraizamento, visando o transplantio das plantas obtidas para um solo ou substrato. George & Sherrington, (1984) descrevem ainda, o estádio 0, que corresponde ao tratamento dado à planta-matriz, e o estádio IV, que diz respeito à aclimatização das mudas produzidas. A atenção a todos esses estádios é muito importante para o sucesso de um protocolo micropropagativo.

### **Fase de Estabelecimento *In Vitro***

Esta etapa inicia-se com a seleção dos explantes mais adequados para a micropropagação e termina com a obtenção de uma cultura livre de contaminantes visíveis e suficientemente adaptadas às condições *in vitro*, de modo que apresente reação à aplicação de reguladores de crescimento na fase seguinte de multiplicação (Grattapaglia & Machado, 1998).

A melhor fonte para retirada de explantes deve ser plantas saudáveis e vigorosas, mantidas em crescimento ativo e sem estresse (Schmildt, 1994).

Litz & Conover (1978b, 1981) afirmam que a estação do ano e a aplicação de fertilizantes e água nas plantas de mamoeiro, no campo, contribuem para a resposta do incremento *in vitro* e que, especialmente a adubação insuficiente ou coleta dos explantes nos meses de inverno contribuem para a alta contaminação bacteriana e fúngica dos explantes na fase de estabelecimento. Esses pesquisadores observaram 95% de contaminação, em explantes de mamoeiro, provenientes do campo, mesmo passando pelo processo de descontaminação. Winnaar (1988) observou 4% de contaminação bacteriana, quando os explantes eram retirados nos meses de verão, e 29%, quando retirados no outono. Vianna (1996) utilizou como explantes segmentos apicais de plantas provenientes do campo e, mesmo nos meses quentes e úmidos, não obteve sucesso sem a utilização de antibióticos.

A manutenção das plantas-matrizes em casas de vegetação permite o controle e a manipulação do fotoperíodo, da intensidade luminosa, da temperatura e estado nutricional, visando estimular novas brotações, independente da época do ano, ou simular os períodos de vernalização nas plantas para obter explantes mais adequados, sendo também possível o melhor controle de insetos e microorganismos mediante aplicação de fungicidas, bactericidas e inseticidas (Grattapaglia & Machado, 1998). A condução e a manutenção de plantas em casa de vegetação têm contribuído para a redução dos contaminantes microbianos no meio de estabelecimento. Schmildt (1994) verificou apenas 7,5 e 10,0% de contaminação microbiana, respectivamente, para os segmentos apicais das cultivares de mamoeiro 'Solo' e 'Formosa', proveniente de plantas mantidas em casa de vegetação. Em outro trabalho conduzido por Schmildt & Amaral (2002), pode-se observar 87,34% de contaminação bacteriana, quando os segmentos apicais procederam de plantas cultivadas no campo, e 25,97 e 44,89% em segmentos apicais de brotações laterais e segmentos apicais, respectivamente, quando estes eram provenientes de plântulas de três meses de idade cultivadas em casa de vegetação.

Uma das grandes limitações ao estabelecimento da cultura do mamoeiro *in vitro* são os contaminantes microbianos (Schmildt, 1994), especialmente as bactérias endógenas (George & Sherrington, 1984; Grattapaglia & Machado, 1998; Agnihotri et al., 2004). Em cultura de tecidos para qualquer espécie é necessário fazer a desinfestação dos explantes antes da inoculação em meio de estabelecimento próprio. Várias substâncias com ação germicida são utilizadas para

fazer a desinfestação. Os mais comuns são o etanol e os compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio (Grattapaglia & Machado, 1998). Outra substância utilizada são os antibióticos para o controle de bactérias, que no entanto, possuem apenas ação bacteriostática, e não bactericida (Phillips et al., 1981; Grattapaglia & Machado, 1998), podendo também ser fitotóxicos aos explantes (Yepes et al., 1994; Peros et al., 1998).

De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), os explantes de plântulas apresentam algumas vantagens, como a grande disponibilidade de explantes sem contaminação e a pronta capacidade de crescimento e rápida resposta a aplicação de reguladores de crescimento, sendo, portanto, importantes na determinação de um protocolo de propagação para uma espécie.

Outras limitações à cultura de tecidos, consistem na necessidade de ajustes no balanço de nutrientes, reguladores de crescimento e condições da cultura para cada cultivar maximizar o seu desenvolvimento *in vitro* (Arora & Singh, 1978; Drew & Smith, 1986).

Várias formulações de sais minerais, com variações nos níveis ou nas fontes de elementos essenciais são testadas para satisfazer as necessidades das plantas *in vitro*. George & Sherrington (1984) citam cerca de 130 formulações de macro e microelementos formulados para atender estas necessidades. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), não existe uma formulação padrão, mas o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com suas modificações e diluições tem apresentado bons resultados. Este meio é frequentemente o mais usado, sendo também o preferido para o mamoeiro, para o início da proliferação a partir de segmentos apicais de plantas provenientes tanto de plântulas como de plantas adultas (Litz & Conover, 1977, 1981; Rajeevan & Pandey, 1983, 1986; Schmildt, 1994; Vianna, 1996; Schmildt & Amaral, 2002; Saha et al., 2004; Teixeira & Teixeira, 2004).

Desde o trabalho de Skoog & Miller (1957), tem-se demonstrado que a morfogênese *in vitro* é dependente da presença de auxinas e citocininas. A formação da raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação destas duas classes de reguladores de crescimento (Skoog & Miller, 1957; Hussey, 1978). Segundo Castro & Vieira (2001), as citocininas e as auxinas continuam sendo as classes de reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos.

Normalmente, na micropropagação, os reguladores de crescimento constituem-se numa primeira etapa a ser abordada, em que o modo de interação entre auxina e citocinina é frequentemente dependente da espécie de planta e do tipo de tecido utilizado na cultura (Coenen & Lomax, 1997). A ausência na resposta a um regulador de crescimento é frequentemente um problema maior quando são utilizados explantes de plantas adultas em comparação com o material juvenil (Bonga & Vonaderkas, 1992).

As auxinas atuam na expansão e alongamentos celulares, bem como na divisão celular juntamente com as citocininas na cultura de tecidos vegetais (Krikorian, 1991). O levantamento feito por Hu & Yang (1983) revela que apenas 40% dos meios de estabelecimento contêm auxina em sua constituição, e desses meios, o ANA é o mais utilizado com 51%, seguido de 27% AIB, 22% AIA e 6% 2,4-D. Estes autores também afirmam que existem diferenças entre as citocininas, onde o BAP e o 2iP são importantes para induzir a formação de um grande número de brotações e aumentar a taxa de multiplicação, enquanto a Cinetina não promove brotações múltiplas, havendo somente o crescimento normal de plântulas.

Conforme explicado anteriormente, o ANA combinado com a Cinetina são os reguladores de crescimento mais indicados para a fase de estabelecimento da cultura de várias espécies, inclusive para o mamoeiro, sendo a mais utilizada pelos pesquisadores. Litz & Conover (1977), ao utilizar  $1,86 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e  $10,76 \text{ mg L}^{-1}$  de Cinetina, produziram plantas com grande número de folhas expandidas de coloração verde escura, sem ocorrer a formação de calos, tendo, no entanto, lenta proliferação. Rajeevan & Pandey (1986) testaram as combinações dos níveis de ANA ( $0,093$ ,  $0,931$  e  $1,862 \text{ mg L}^{-1}$ ) e Cinetina ( $5,38$ ,  $10,76$  e  $21,52 \text{ mg L}^{-1}$ ) para a variedade 'Coorg Honey Dew', e obtiveram uma taxa de sobrevivência e reatividade de 50 e 40%, respectivamente, quando usaram  $5,38 \text{ mg L}^{-1}$  de Cinetina, combinado com todos os níveis de ANA. Schmildt (1994) obteve uma taxa de sobrevivência de 92,5 e 90%, e reatividade de 27,5 e 37,5%, respectivamente, para mamoeiro do tipo 'Solo' e 'Formosa', utilizando  $0,093 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e  $5,38 \text{ mg L}^{-1}$  de Cinetina. Em outro trabalho realizado por Schmildt & Amaral (2002), observa-se o bom desempenho dos explantes, onde 83,42% formaram roseta foliar em meio de estabelecimento com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e  $5,38 \text{ mg L}^{-1}$  de Cinetina, para segmentos apicais oriundos de plântulas cultivadas em casa de vegetação.

As condições do ambiente da sala de incubação dos propágulos, em todos os estádios em laboratório, devem ser similares às condições da cultura no campo. Segundo Grattapaglia & Machado (1998) estas condições são satisfatórias para a maioria das espécies, quando a intensidade luminosa está compreendida entre 20 a 70  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com o fotoperíodo de 16 horas de luz por 8 horas de escuro, e temperatura entre 20 a 27 °C. Na micropropagação do mamoeiro, estas condições citadas se enquadram no processo, visto que a cultura do mamoeiro é cultivada em regiões tropicais.

### **Fase de Multiplicação *In Vitro***

A fase de multiplicação começa após o final da fase de estabelecimento da cultura (segmentos apicais), com as culturas que se apresentam reativas, ou seja, formaram roseta foliar e estão isentas de contaminates microbianos (Rajeevan & Pandey, 1983, 1986; Winnaar, 1988; Schmildt, 1994). Nesta fase o objetivo é produzir o maior número de ramos possível, no menor espaço de tempo, com uma taxa satisfatória, com o mínimo de variação de explante para explante, além da qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas, pois esta vai determinar o sucesso na fase seguinte de enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1988).

O meio de cultura básico utilizado para a multiplicação geralmente é o mesmo da fase de estabelecimento, sendo, portanto, o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) bastante usado.

De acordo com Lundergan & Janick (1980), a presença de auxina no meio de multiplicação anula o efeito inibitório das citocininas no alongamento dos explantes, ajudando aumentar o tamanho das brotações, diminuindo o efeito do rosetamento ou entufamento causados pelas citocininas. No entanto, concentrações excessivas de auxinas podem inibir a multiplicação ou favorecer demasiadamente o enraizamento ou formação de calo, não sendo adequado para esta fase (Grattapaglia & Machado, 1998). Na multiplicação *in vitro*, além de determinar qual o melhor meio, tipo e concentração de citocinina, é necessário também estudar a interação desses dois últimos com as auxinas, a fim de melhorar os protocolos e otimizar os resultados (Silveira et al., 2002). As citocininas são fundamentais na etapa de regeneração a partir de calos ou na multibrotação de gemas axilares ou

apicais de plantas lenhosas ou herbáceas (Cid, 2000). O BAP tem sido muito eficaz para promover multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias, além de ser o mais barato de todos (Hasegawa, 1980; Zaerr & Mapes, 1985). O BAP atua principalmente na superação da dominância apical sobre gemas axilares (Goussard, 1981).

No entanto, concentrações excessivas de BAP promovem o desbalanceamento endógeno dos reguladores de crescimento, reduzindo o crescimento das brotações e aumentando a hiperhidricidade (Jona & Webb, 1978). A eficácia do BAP no meio de multiplicação para o mamoeiro foi observada por Drew & Smith (1986) onde verificaram que a maior taxa de multiplicação de mamoeiro foi com o uso de BAP com ANA em relação ao uso de Cinetina, 2<sub>i</sub>p, ou Zeatina combinado com ANA. Outros pesquisadores (Litz & Conover, 1981; Schmildt, 1994) propuseram um meio com os reguladores de crescimento BAP a 0,45 mg L<sup>-1</sup> e ANA a 0,093, os quais permitiram uma alta proliferação de ramos em tufos, com folhas pequenas e discretas, de crescimento rápido, próprio para os subcultivos a cada 20 a 30 dias. Litz & Conover (1981) mantiveram o material adulto por 13 subcultivos, com taxa de multiplicação constante. Schmildt (1994) obteve com este mesmo meio uma boa taxa de multiplicação de 8,4 e 5,4, respectivamente, para o mamoeiro tipo 'Formosa' e 'Solo' no primeiro subcultivo, porém ao longo dos subcultivos a taxa de multiplicação foi inconstante.

Diversas substâncias têm sido utilizadas em meio de multiplicação para aumentar a taxa de proliferação e melhorar a qualidade dos ramos de mamoeiro, dentre elas a riboflavina, a caseína hidrolizada, e o sulfato de adenina. Drew & Smith (1986) observaram incremento do peso fresco da parte aérea dos ramos de mamão, resultando no aumento no crescimento dos mesmos, com baixa produção de calo, ao combinar riboflavina e citocinina. Teixeira & Teixeira (2004) obtiveram 53,3% de culturas brotadas na combinação de 7,52 mg L<sup>-1</sup> de riboflavina, com 1 ou 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Cohen & Cooper (1982), conseguiram na média de dois subcultivos 37,5 ramos com a adição de caseína hidrolizada a 500 mg L<sup>-1</sup> e sulfato de adenina a 80 mg L<sup>-1</sup>.

A adenina na forma de sulfato (SA) é muito utilizada em culturas de tecidos, seu efeito pode ser comparado ao de uma citocinina fraca ou ainda haver uma interação com a própria citocinina (Grattapaglia & Machado, 1998). Segundo George & Sherrington (1984), o sulfato de adenina parece estimular a proliferação de ramos,

principalmente em combinação com as citocininas. Cohen & Cooper (1982) obtiveram aumento da taxa de multiplicação de ramos até  $80 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfato de adenina, acima do qual houve redução. Ramos com bom aspecto, com folhas verdes escuras, sem hiperhidricidade e boa taxa de multiplicação foram obtidos por Vianna (1996) com  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfato de adenina, ocorrendo redução na taxa de multiplicação e presença de hiperhidricidade, quando utilizou  $160 \text{ mg L}^{-1}$ . Saha et al. (2004) também utilizaram o sulfato de adenina no meio de multiplicação, no entanto, não discutiu seus efeitos nos ramos.

A qualidade e a homogeneidade das partes aéreas produzidas nesta fase de multiplicação é um dos fatores predeterminantes para o sucesso na fase seguinte de enraizamento. O tamanho dos ramos também tem importância (Bhojwani & Razdan, 1983). Miller & Drew (1990) verificaram que o tamanho ideal dos ramos de mamoeiro era o de 5 mm de comprimento, abaixo do qual os ramos não enraizavam, necessitando de uma fase intermediária de alongamento. No entanto, do aspecto de eficiência, a fase de alongamento é antieconômica por demandar mão de obra adicional que não resulta em multiplicação, e sim, num simples ajuste da cultura (Grattapaglia & Machado, 1998).

## REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S.; SINGH, S.K.; JAIN, M.; SHARMA, M.; SHARMA, A.K.; CHATURVEDI, H.C. *In vitro* cloning of female and male *Carica papaya* through tips of shoots and inflorescences. **Indian Journal of Biotechnology**, v.3, p.235-240, 2004.
- AGRIANUAL 2004: **Anuário estatístico da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2004. 496 p.
- ALVES, F. de L. A cultura do mamão *Carica papaya* no mundo, no Brasil e no estado do Espírito Santo. In: MARTINS, D. dos S.; COSTA, A. de F.S. da (Ed.). **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: INCAPER, 2003. p.13-34.
- ARORA, I.K.; SINGH, R.N. *In vitro* regeneration in papaya. **Current Science**, v.47, n.22, p.867-868, 1978.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983. 502p.
- BONGA, J.M.; VONADERKAS, P. ***In vitro* culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236 p.
- CARRER, H. **Controle da morfogênese em mamão (*Carica papaya* L.) *in vitro***. 1988. 138f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1988.
- CASTRO, P.R. de C.; VIEIRA, E.L. **Aplicações de reguladores de crescimento na agricultura tropical**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 132p.
- CID, L.P.B. Citocininas. In: CID, L.P.B (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p.55-81.
- COENEN, C.; LOMAX, T.L. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. **Trends in Plant Science**, v.2, n.9, p.351-356, 1997.

COHEN, D.; COOPER, P.A. Micropropagation of babaco – A carica hybrid from Ecuador. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURES, 5, 1981, Tóquio. **Proceedings**. Tóquio: Japanese Association for Plant Tissue Culture, 1982. p.743-744.

COSTA, A. de F.S. da; COSTA, A.N. da; SANTOS, F.A.M. dos; BARRETO, F.C.; ZUFFO, V.J. Plantio, formação e manejo da cultura.. In: MARTINS, D. dos S.; COSTA, A. de F.S. da (Ed.). **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: INCAPER, 2003. p.127-159.

COSTA, A. de F.S. da; MARTINS, D. dos S.; COSTA, A.N. da; FASSIO, L.H. Evolução da cultura e do mercado mundial de mamão. In: MARTINS, D. dos S. (Ed.) **Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão**. Vitória: INCAPER, 2005. p.647-652.

COSTA, A. de F.S. da; PACOVA, B.E.V. Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. In: MARTINS, D. dos S.; COSTA, A. de F.S. da (Ed.). **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: INCAPER, 2003. p.59-102.

DREW, R.A. Improved techniques for *in vitro* propagation and germoplasm storage of papaya. **HortScience**, v.27, n.10, p.1122-1124, 1992.

DREW, R.A.; SMITH, N.G. Growth of apical and lateral buds of papaw (*Carica papaya* L.) as affected by nutritional and hormonal factors. **Journal of Horticultural and Science**, v.61, n.4, p.535-543, 1986.

DREW, R.A. The effects of medium composition and conditions on *in vitro* initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of Horticultural Science**, v. 62, n.4, p.551-556, 1987.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley: Exegetics, 1984. 709p.

GOUSSARD, P.G. Effects of Cytokinins on elongation, proliferation and total mass of shoot derived from shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. **Vitis**, v.20, n.3, p. 228-34, 1981.

GRANA JR., J.F. **Fitorreguladores na quebra da dominância apical e no enraizamento das brotações laterais em mamoeiros (*Carica papaya* L.)**. 2000. 68f. Dissertação (Mestrado em Horticultura) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Miropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPQ, 1998. v.1, p.183-260.

GROUT, B.W.W. Meristem tip culture. In: POLLARD, J.W.; WALKER, J.M. (Ed.). **Methods in molecular biology: Plant cell and tissue culture**. New Jersey: Humana Press, 1990. 597p.

HASEGAWA, P.M. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.105, p.216-220, 1980.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip, and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.177-227.

HUSSEY, G. The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. **Science Progress**, v.65, p.185-208, 1978.

JONA, R.; WEBB, J.C. Axillary-bud culture of *vitis vinifera* 'Sylvaner Riesling'. **Scientia Horticulturae**, v.9, p. 55-60, 1978.

KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición e preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p.41-77.

LITZ, R.E.; CONOVER, R.A. Effect of sex type, season, and other factors on *in vitro* establishment and culture of *Carica papaya* L. explants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.106, n.6, p.792-794, 1981.

LITZ, R.E.; CONOVER, R.A. *In vitro* propagation of papaya. **HortScience**, v.13, n.3, p.241-242, 1978a.

LITZ, R.E.; CONOVER, R.A. Recent advances in papaya tissue culture. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.91, p.180-182, 1978b.

LITZ, R.E.; CONOVER, R.A. Tissue culture propagation of papaya. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.90, p.245-246, 1977.

LUNDERGAN, C. A.; JANICK, J. Regulation of apple shoot proliferation and growth *in vitro*. **Horticultural Research**, n.20, p.19-24, 1980.

McCUBBIN, M.J.; VAN STADEN, J. A modified technique for *in Vitro* propagation of papaya (*Carica papaya* L.). **South African Journal of Botany**, v.69, n.3, p.287-291, 2003.

MILLER, R.M.; DREW, R.A. Effect of explant type on proliferation of *Carica papaya* L. *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, n.1, p.39-44, 1990.

MODESTO, Z.M.; SIQUEIRA, M.J.B. **Botânica**. São Paulo: EPU, 1981. 341 p.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p.135-166, 1974.

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

OLIVEIRA, R.P.; DANTAS, J.L.L.; ALMEIDA, E.P.; NICKEL, O.; VILARINHOS, A.D.; MORALES, C.F.G. Uso da biotecnologia no melhoramento genético e propagação do mamoeiro. In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. (Ed.). **Mamão no Brasil**. Cruz das Almas: UFBA/EMBRAPA-CNPMF, 1996. 179p.

PEROS, J.P.; TORREGROSSA, L.; BERGER, G. Variability among *vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogeneses and antibiotic sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, v.49, p.171-179, 1998.

PHILLIPS, R.; ARNOTT, S.M.; KAPLAN, S.E. Antibiotics in plant tissue culture: Rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant cultures of *Heliantus Tuberosus*. **Plant Science Letters**, v.21, p. 235-240, 1981.

RAJEEVAN, M.S.; PANDEY, R.M. Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya* L.) for clonal propagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.6, n.2, p.181-188, 1986.

RAJEEVAN, M.S.; PANDEY, R.M. Propagation of papaya through tissue culture. **Acta Horticulturae**, v.131, p.131-139, 1983.

REUVENI, O.; SHLESINGER, D.R. Rapid vegetative propagation of papaya plants by cuttings. **Acta Horticulturae**, n.275, p.301-306, 1990.

SAHA, M.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. *In vitro* culture studies in four dioecious varieties of *Carica papaya* L. using axillary buds from field-grown plants. **Journal of Tissue Research**, v.4, n.2, p.211-214, 2004.

SCHMILDT, E.R.; AMARAL, J.A.T. do. Contaminação e reação morfogênica *in vitro* de explantes de mamoeiro. **Revista Ceres**, v.49, n.281, p.63-70, 2002.

SCHMILDT, E.R. **Enraizamento *In vitro* e *Ex vitro* de Ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 1994. 76f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.

SILVEIRA, C.A.P.; FORTES, G.R. de L.; FACHINELLO, J.C.; RODRIGUES, A.C.; CITADIN, I.; QUEZADA, A.C.; SILVA, J.B. da. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto do gênero *prunus* sob baixas concentrações e diferentes tipos de auxinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.3, p.608-610, 2002.

SKOOG, F; MILLER, F.O. Chemical regulation of organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium Society Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.

TEIXEIRA, M.T; TEIXEIRA, S.L. Estabelecimento de segmentos apicais de mamoeiro *in vitro*. **Revista Ceres**, v.51, n.296, p.477-483, 2004.

VIANNA, G.R. **Micropropagação do mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizando ápices caulinares de plantas adultas**. 1996. 66f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

WINNAAR, W. Clonal propagation of papaya *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.12, n.3, p.305-310, 1988.

YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Micropropagation of 13 *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. **Plant Growth Regulation**, v.15, p.55-67, 1994.

YIE, S.T.; LIAW, S.I. Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. **In Vitro**, v.13, n.9, p.564-567, 1977.

ZAERR, J.B.; MAPES, M.O. Action of growth regulators. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). **Tissue culture in forestry**. 2.ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p.231-255.

## CAPÍTULO 1

### **Influência de níveis de ANA e Cinetina na multiplicação *in vitro* de mamoeiro ‘Tainung 01’**

Omar Schmidt<sup>(1)</sup>, Edilson Romais Schmidt<sup>(1)</sup>, Sebastião Martins Filho<sup>(1)</sup>  
José Augusto Teixeira do Amaral<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Caixa Postal 16, CEP 29500-000, Alegre, ES, Brasil. E-mail: omar-schmidt@ig.com.br, edilson@cca.ufes.br, smartins@dpi.ufv.br, jata@cca.ufes.br

**Resumo** – O mamoeiro (*Carica papaya* L.) apresenta dificuldades de propagação vegetativa, sendo o plantio comercial feito tradicionalmente por meio de sementes, que também têm limitações devido à polinização livre. A micropropagação surge como alternativa por permitir a produção de plantas de boa qualidade e em grande quantidade de um único explante. Este trabalho teve o objetivo de identificar a melhor combinação dos diferentes níveis de ANA (0,093; 0,931 e 1,862 mg L<sup>-1</sup>) e Cinetina (5,38; 10,76 e 21,52 mg L<sup>-1</sup>) para o estabelecimento *in vitro* em meio de cultura MS. Os explantes que melhor formaram roseta foliar foram inoculadas no meio de multiplicação durante cinco subcultivos, com repicagem a cada 30 dias. Os explantes utilizados foram segmentos apicais de plantas juvenis de mamoeiro ‘Tainung 01’ com 10 semanas de idade. Após 30 dias, avaliaram-se as taxas de culturas sobreviventes, culturas reativas, massa de calos e, a cada subcultivo a taxa de multiplicação dos explantes. Os melhores resultados para as culturas reativas, a massa de calos, e a taxa de multiplicação foram observados na combinação de 0,093 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 5,380 mg L<sup>-1</sup> de Cinetina no meio de estabelecimento.

**Termos de indexação:** *Carica papaya* L., cultura de tecidos, meio de estabelecimento, segmentos apicais, taxa de multiplicação.

## **Influence of levels of NAA and Kinetin in *in vitro* multiplication of papaya tree 'Tainung 01'**

**Abstract** - The papaya tree (*Carica papaya* L.) it presents difficulties of vegetative propagation, being the commercial planting done traditionally for midst seeds, that also have limitations due to the free polinization. The micropropagation appears as alternative for allowing the production of seedlings of good quality and great amount of a single explant. This work had the objective to identify the best combination of different levels NAA (0.093; 0.931 and 1.862 mg L<sup>-1</sup>) and Kinetin (5.38; 10.76 and 21.52 mg L<sup>-1</sup>) for the establishment *in vitro* in MS culture medium. The explants that best formed rosette of leaves they were inoculated in proliferation medium during five subcultures, with transplantation every 30 days. The used explants were apical sections of juvenili plants of papaya tree 'Tainung 01' with 10 weeks of aged. After 30 days the rates of surviving cultures were evaluated, reactivate cultures, the calluses of mass and, to each subculture the multiplication rate of the explants. The best results for the reactivate cultures, callus of mass, and multiplication rate was observed in the combination of 0.093 mg L<sup>-1</sup> of NAA and 5.380 mg L<sup>-1</sup> of Kinetin in the establishment medium.

**Index terms:** *Carica papaya* L., tissue culture, establishment medium, apical sections, multiplication rate.

### **Introdução**

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma espécie típica de regiões tropicais e subtropicais da América, sendo uma das principais fruteiras cultivadas. O Brasil é o maior produtor de mamão, contribuindo com 25% da produção mundial (AGRIANUAL, 2004).

A propagação em plantios comerciais de mamoeiro tem sido efetuada tradicionalmente por meio de sementes. A maioria das sementes das cultivares utilizada nas regiões produtoras de mamão é proveniente de frutos de polinização livre, sem controle efetivo da polinização. Desse modo, as cultivares sofrem variações na sua descendência, causando descaracterização dos genótipos, comprometendo a qualidade das lavouras (Drew, 1987; Costa & Pacova, 2003). Outra desvantagem é a necessidade de se colocar de duas a três mudas por cova, tendo que fazer o desbaste das plantas após o início do florescimento, em torno de três a quatro meses após o plantio, quando se torna possível a identificação do sexo

das plantas, deixando uma planta por cova, preferencialmente hermafrodita, devido ao fruto desta apresentar bom padrão comercial (Costa et al. 2003).

A propagação vegetativa é uma forma de multiplicar plantas de modo a manter as características genéticas das plantas-matrizes (São José & Marin, 1988). No entanto, para a cultura do mamoeiro, a propagação vegetativa (estaquia e enxertia) não é utilizada em escala comercial. Isto ocorre em função da pequena quantidade de brotos laterais produzidos pela planta mãe, em face da sua forte dominância apical (Modesto & Siqueira, 1981; Reuveni & Shlesinger, 1990) e também devido à dificuldade de enraizamento das estacas (Grana Jr., 2000).

Observadas as desvantagens na utilização de sementes, assim como as dificuldades na propagação vegetativa por estaquia ou enxertia para o mamoeiro, a cultura de tecidos pode constituir um método auxiliar na produção eficiente de mudas de mamoeiro com alta qualidade fitossanitária e genética, além de produzir um grande número de mudas provenientes de um único explante.

Em mamoeiro é possível o cultivo de segmentos apicais e gemas laterais de plantas adultas (Drew, 1987; Vianna, 1996), embora com limitações nos subcultivos *in vitro*. Uma alternativa apropriada é efetuar a multiplicação de segmentos apicais a partir de plantas juvenis (Schmidt, 1994; Teixeira & Teixeira, 2004).

Normalmente, na micropropagação, os reguladores de crescimento constituem-se numa primeira etapa a ser abordada, em que o modo de interação entre auxinas e citocininas é freqüentemente dependente da espécie da planta e do tipo de tecido utilizado na cultura (Coenen & Lomax, 1997). A ausência na resposta a um regulador de crescimento é freqüentemente um problema maior quando são utilizados explantes de plantas adultas, em comparação com o material juvenil (Bonga & Vonaderkas, 1992).

A adição de reguladores de crescimento em meios de cultura tem o objetivo de suprir possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta-matriz. As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos vegetais. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos vegetais é regulada pela disponibilidade e interação destas duas classes de reguladores de crescimentos (Skoog & Miller, 1957; Hussey, 1978).

Os níveis e os tipos de reguladores de crescimento são de grande importância nas etapas de estabelecimento e multiplicação dos explantes em meios de cultura. Para explantes de mamoeiro, uma das combinações mais utilizadas e eficazes para a fase de estabelecimento é ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenoacético) e Cinetina (6-furfurilaminopurina), e para a fase de

multiplicação dos explantes, a combinação entre ANA e BAP (6-benzilaminopurina) (Litz & Conover, 1977; Rajeevan & Pandey, 1986; Schmildt, 1994). As auxinas atuam na expansão e alongamentos celulares, bem como na divisão celular juntamente com as citocininas na cultura de tecidos vegetais (Krikorian, 1991). De acordo com Hu & wang (1983), existem diferenças entre as citocininas, onde o BAP é importante para induzir a formação de grande número de brotações e aumentar a taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação, enquanto que a cinetina não promove brotações múltiplas, havendo somente o crescimento normal dos explantes.

O sistema de multiplicação por meio da proliferação das gemas axilares, utilizando como explantes segmentos apicais de plantas juvenis pode constituir-se numa forma alternativa para o estabelecimento e multiplicação do mamoeiro ‘Tainung 01’.

Este trabalho teve o objetivo determinar a melhor combinação de diferentes níveis dos reguladores de crescimento ANA e Cinetina no meio MS, para o estabelecimento *in vitro* de mamoeiro ‘Tainung 01’. Avaliou-se, também, o comportamento das plântulas até o quinto subcultivo.

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado no município de Alegre, situada a uma altitude aproximada de 270 m e coordenadas geográficas de 20° 45’ 48” S e 41° 31’ 57” W (Espírito Santo, 1994).

Em casa de vegetação foram produzidas as plantas doadoras de explantes. A semeadura foi feita em sacolas de polietileno pretas de 15 x 20 cm, com uma semente por recipiente, utilizando-se mamoeiro ‘Tainung 01’, geração F<sub>1</sub>, contendo substrato constituído de terriço, areia e esterco bovino na proporção de 3:1:1, respectivamente. O substrato foi adubado com 0,2 kg de sulfato de amônio, 0,2 kg de cloreto de potássio e 0,6 kg de superfosfato simples para cada 150 litros da mistura. As plantas receberam uma pulverização com o fungicida Metilthiofan a 0,5 g L<sup>-1</sup>, dois dias antes da retirada dos explantes.

Os explantes utilizados foram segmentos apicais de plantas juvenis de mamoeiro ‘Tainung 01’ com 10 semanas de idade e aproximadamente 5 mm de comprimento, obtidos de plantas com altura entre 40 e 70 cm (Figura 1A). A desinfestação dos explantes foi feita em câmara de fluxo laminar horizontal, com álcool a 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 1% por 15 minutos. Em seguida foram enxaguados por três vezes com água deionizada e

autoclavada.

O meio de cultura de estabelecimento constituiu-se de sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de agar marca Proquímios<sup>®</sup>, e 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e reguladores de crescimento, constituindo os tratamentos: ANA, nas concentrações (0,093; 0,931 e 1,862 mg L<sup>-1</sup>), associados aos níveis de Cinetina, (5,38; 10,76 e 21,52 mg L<sup>-1</sup>). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da adição do agar. O meio foi distribuído em tubos de ensaio com dimensão de 25 x 150 mm, contendo 20 ml por tubo, e autoclavado por 20 minutos a temperatura de 121°C e a pressão de 1,05 kg cm<sup>-2</sup>. Foi utilizado um explante por tubo e levados para sala de crescimento sob lâmpadas fluorescentes fornecendo 25,2 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de fluxos de fótons fotossintéticos, 16 horas de fotoperíodo e temperatura de 27 ± 2 °C, permanecendo nestas condições de cultivo por um período de 30 dias. Após este período foram avaliadas as porcentagens de culturas sobreviventes, reativas e massa fresca de calos, sendo consideradas reativas as culturas que formaram roseta foliar. Para calcular a porcentagem de culturas reativas foram utilizadas as culturas sobreviventes.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando o esquema fatorial 3x3 (3 níveis de auxina e 3 níveis de citocinina), com 3 repetições e a parcela experimental foi constituída de 10 tubos de ensaio. Os tratamentos constaram da adição ao meio de cultura dos reguladores de crescimento auxina (ANA) e citocinina (Cinetina) nas diferentes combinações dos níveis destes fatores. Os dados foram analisados por meio da análise de variância e as médias dos tratamentos representadas por análise estatística descritiva.

As culturas reativas foram recultivadas em meio de multiplicação, constituído de sais e vitaminas de MS, suplementado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de agar marca Proquímios<sup>®</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, 0,093 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,45 mg L<sup>-1</sup> de BAP. As condições de ambiente de cultivo foram as mesmas utilizadas para o meio de estabelecimento. Os tufos de ramos foram subcultivados a cada 30 dias, durante 5 meses. O meio foi colocado em frascos de capacidade de 240 ml, contendo 30 ml de meio de cultura. Nesta fase, o experimento foi disposto em um delineamento inteiramente casualizado. Os três melhores tratamentos da fase de estabelecimento da cultura (0,093 ANA com 5,38 Cinetina; 0,931 ANA com 5,38 Cinetina; 1,862 ANA com 5,38 Cinetina) foram utilizados neste meio, tendo avaliado o número de ramos aptos ao enraizamento (maiores que 5 mm) ao longo de 5 subcultivos. O experimento teve 7 repetições por tratamento, e a parcela experimental foi

constituída de 9 frascos. Os dados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão.

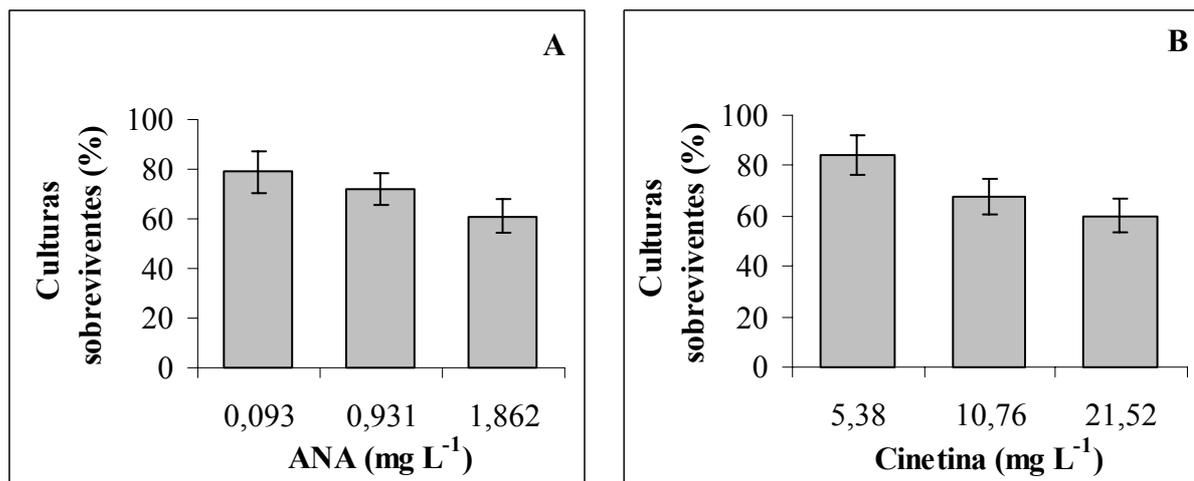
### Resultados e Discussão

Pelo resumo da análise de variância apresentado na Tabela 1, pode-se observar que houve diferença significativa para as médias de culturas sobreviventes para os diferentes níveis de ANA e de Cinetina, o mesmo não ocorrendo para a interação entre os dois fatores. As culturas sobreviventes são todas aquelas que não foram contaminadas por fungos e bactérias e apresentam-se sem clorose ao final do experimento no meio de estabelecimento. Observa-se, na Figura 1, que os melhores níveis de ANA e de Cinetina foram respectivamente 0,093 e 5,38 mg L<sup>-1</sup>, atingindo aproximadamente 80% de explantes estabelecidos. Em condições experimentais semelhantes Rajeevan e Pandey (1983), obtiveram apenas 50% de sobrevivência, trabalhando com a variedade ‘Coorg Honey Dew’. Resultados superiores foram obtidos por Schmildt (1994), conseguindo 90% de sobrevivência para o híbrido ‘Tainung 01’ geração F<sub>2</sub> e, 92,5% para a variedade ‘Sunrise Solo Line 72/12’.

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância para a porcentagem de culturas sobreviventes, porcentagem de culturas reativas e massa de calos de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de estabelecimento com diferentes níveis de ANA e Cinetina

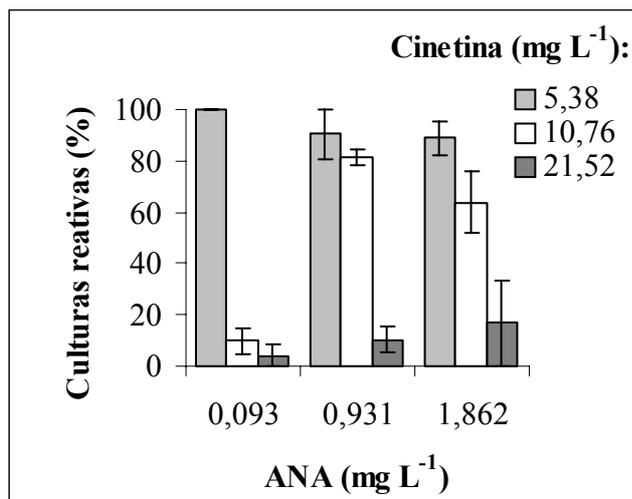
Fontes de variação	G. L.	Quadrados médios		
		Sobreviventes (%)	Reativas (%)	Calos (g)
ANA	2	725,9259*	1315,8880**	1,8575**
Cinetina	2	1403,7040**	15400,8600**	1,4096*
ANA X Cinetina	4	81,4815 <sup>ns</sup>	1544,0860**	1,0289*
Resíduo	18	188,8889	212,5678	0,2377
CV (%)		19,43	28,20	72,24

ns, não significativo, \* e \*\*, significativo a 5% e 1%, respectivamente pelo teste F.



**Figura 1.** Porcentual de culturas sobreviventes de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de estabelecimento contendo diferentes níveis de ANA (A) e Cinetina (B). (As barras verticais indicam os erros padrões da média).

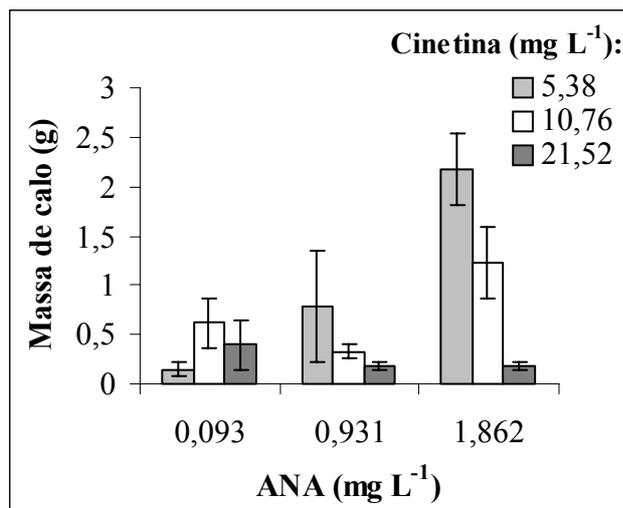
Para a característica culturas reativas, houve diferença significativa para a interação entre os fatores ANA e Cinetina (Tabela 1). A combinação de ANA e Cinetina de 0,093 e 5,38 mg L<sup>-1</sup> proporcionou 100% de culturas reativas (Figura 2). Esses valores são superiores: aos 40% observados por Rajeevan & Pandey (1986), tanto em explantes de plântulas quanto em plantas adultas; aos 11% obtidos por Winnaar (1988) em explantes de plantas adultas; aos 37,5% encontrados por Schmildt (1994) com tecido juvenil; e aos 83,4% detectados por Schmildt & Amaral (2002), utilizando explantes de plântulas de três meses de idade. As culturas reativas são todos aqueles explantes que formaram roseta foliar em meio de estabelecimento, visíveis a olho nu a partir de 18 dias após a inoculação nos tubos de ensaio. A roseta foliar é de grande importância para a cultura na micropropagação durante a fase de estabelecimento, indicando haver uma adaptação dos explantes às condições *in vitro* e isenção de contaminantes, de modo que estas irão propiciar reação à aplicação de reguladores de crescimento na fase seguinte, que é a de multiplicação. Esta reatividade dos explantes pode ser observada em alguns tratamentos utilizados, conforme a Figura 2A.



**Figura 2.** Porcentual de culturas reativas de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de estabelecimento contendo diferentes níveis de ANA e Cinetina. (As barras verticais indicam os erros padrões da média).

Na avaliação feita para massa de calos, houve diferença significativa para a interação entre os fatores ANA e Cinetina (Tabela 1). A combinação de ANA e Cinetina que proporcionou a menor massa de calo foi de 0,093 e 5,38 mg L<sup>-1</sup>, verificando ser a mais importante para a produção de clones que é o objetivo do trabalho, e a combinação que proporcionou a maior massa de calo foi de 1,862 e 5,38 mg L<sup>-1</sup>, sendo a mais indicada para os trabalhos de micropropagação usando as vias organogênética e embriogênética indiretas (Figura 3). Todavia, em condições experimentais semelhantes, os resultados discordam daqueles encontrados por Vianna (1996), onde ele obteve intenso calejamento ao combinar 5,38 mg L<sup>-1</sup> de Cinetina com 0,093 mg L<sup>-1</sup> de ANA utilizando plantas adultas.

Segundo Torres & Caldas (1990), calo é uma massa de células não organizadas, em crescimento desordenado e irregularmente diferenciadas. A maior possibilidade de variações somaclonais a partir de calo pode ser importante para os trabalhos de melhoramento de plantas, mas indesejável na clonagem de plantas através do cultivo *in vitro*. De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), o ANA é muito utilizado em meio de estabelecimento, mas, se adicionado em concentrações pouca acima das ótimas, pode estimular a formação de calo.



**Figura 3.** Massa de calos de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de estabelecimento contendo diferentes níveis de ANA e Cinetina. (As barras verticais indicam os erros padrões da média).

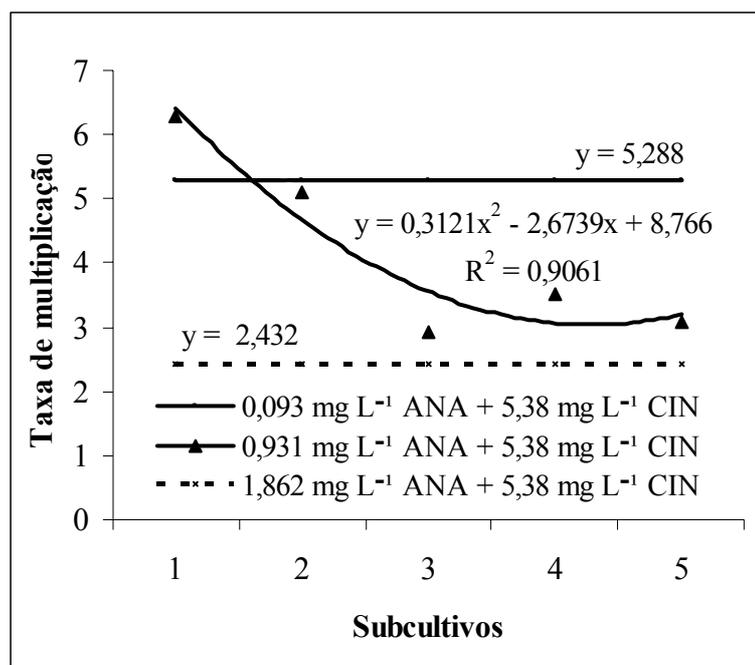
Os tratamentos da fase de estabelecimento que proporcionaram as maiores porcentagens de explantes reativos foram utilizados na fase de multiplicação. Esses tratamentos foram os que continham 5,38 mg L<sup>-1</sup> de Cinetina e as combinações de ANA de 0,093 mg L<sup>-1</sup>, 0,931 mg L<sup>-1</sup> e 1,862 mg L<sup>-1</sup> (Figura 2).

Os melhores tratamentos da fase de estabelecimento, usados na multiplicação foram significativos para os subcultivos (Tabela 2). Avaliando-se o desenvolvimento dos explantes durante 5 subcultivos *in vitro*, verificou-se que a combinação dos níveis considerada ideal na fase de estabelecimento da cultura foi de 0,093 e 5,38 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e Cinetina, respectivamente, mantendo-se a uma taxa de multiplicação constante de 5,288:1. Comportamento semelhante foi observado na combinação de 1,862 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 5,38 mg L<sup>-1</sup> de Cinetina, apresentando uma taxa de multiplicação constante, porém muito baixa (2,432:1). Enquanto que 0,931 mg L<sup>-1</sup> de ANA combinado com 5,38 mg L<sup>-1</sup> de Cinetina apresentou uma taxa de multiplicação boa no primeiro subcultivo, decaindo posteriormente, não sendo interessante para a multiplicação dos explantes *in vitro* (figura 4). Em trabalho reportado por Saha et al. (2004), utilizando diferentes variedades de mamão e em diferentes meios contendo BAP e ANA, obtiveram resultados superiores a uma taxa de multiplicação de 8,3:1, para a variedade ‘Washington’, e para as outras variedades esta taxa foi de 6,16:1, 5,9:1 e 4,14:1, para ‘Co-5’, ‘Madhur’ e ‘Pusa Dwarf’, respectivamente, o que assemelha aos encontrados neste trabalho. Porém, os autores não identificaram quantos subcultivos foram utilizados.

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância da taxa de multiplicação dos 3 melhores tratamentos da fase de estabelecimento de mamoeiro ‘Tainung 01’, ao longo de 5 subcultivos em meio de multiplicação

Fontes de variação	G. L.	Quadrados médios		
		(0,093 mg L <sup>-1</sup> ANA) + (5,38 mg L <sup>-1</sup> CIN)	(0,931 mg L <sup>-1</sup> ANA) + (5,38 mg L <sup>-1</sup> CIN)	(1,862 mg L <sup>-1</sup> ANA) + (5,38 mg L <sup>-1</sup> CIN)
Subcultivos	4	2,1474*	15,2410**	0,7489*
Resíduo	30	0,7978	1,2424	0,2221
CV (%)		16,88	26,62	19,36

\*, \*\* Significativo a 5% e 1%, respectivamente pelo teste F.



**Figura 4.** Taxa de multiplicação do mamoeiro ‘Tainung 01’, durante 5 subcultivos, em meio de multiplicação.

### Conclusões

O melhor resultado para a fase de estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais de mamoeiro ‘Tainung 01’ é obtido com ANA e Cinetina nos níveis de 0,093 e 5,38 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A taxa de multiplicação dos explantes nos subcultivos é influenciada pelos níveis de ANA e Cinetina utilizados na fase de estabelecimento da cultura.

## Referências

- AGRIANUAL 2004: **Anuário estatístico da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2004. 496 p.
- BONGA, J.M.; VONADERKAS, P. ***In vitro* culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236 p.
- COENEN, C.; LOMAX, T.L. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. **Trends in Plant Science**, v.2, n.9, p.351-356, 1997.
- COSTA, A. de F.S. da; COSTA, A.N. da; SANTOS, F.A.M. dos; BARRETO, F.C.; ZUFFO, V.J. Plantio, formação e manejo da cultura.. In: MARTINS, D. dos S.; COSTA, A. de F.S. da (Ed.). **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: INCAPER, 2003. p.127-159.
- COSTA, A. de F.S. da; PACOVA, B.E.V. Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. In: MARTINS, D. dos S.; COSTA, A. de F.S. da (Ed.). **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória: INCAPER, 2003. p.59-102.
- DREW, R.A. The effects of medium composition and conditions on *in vitro* initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of Horticultural Science**, v. 62, n.4, p.551-556, 1987.
- ESPÍRITO SANTO. Secretária de Estado de Ações Estratégicas e Planejamento. Departamento Estadual de Estatística. **Informações municipais do estado do Espírito Santo**: Vitória, 1994. v.1. 803p.
- GRANA JR., J.F. **Fitorreguladores na quebra da dominância apical e no enraizamento das brotações laterais em mamoeiros (*Carica papaya* L.)**. 2000. 68f. Dissertação (Mestrado em Horticultura) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Miropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPQ, 1998. v.1, p.183-260.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip, and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.177-227.
- HUSSEY, G. The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. **Science Progress**, v.65, p.185-208, 1978.
- KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición e preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991, p.41-77.
- LITZ, R.E.; CONOVER, R.A. Tissue culture propagation of papaya. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.90, p.245-246, 1977.

- MODESTO, Z.M.; SIQUEIRA, M.J.B. **Botânica**. São Paulo: EPU, 1981. 341 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- RAJEEVAN, M.S.; PANDEY, R.M. Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya* L.) for clonal propagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.6, n.2, p.181-188, 1986.
- RAJEEVAN, M.S.; PANDEY, R.M. Propagation of papaya through tissue culture. **Acta Horticulturae**, v.131, p.131-139, 1983.
- REUVENI, O.; SHLESINGER, D.R. Rapid vegetative propagation of papaya plants by cuttings. **Acta Horticulturae**, n.275, p.301-306, 1990.
- SAHA, M.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. *In vitro* culture studies in four dioecious varieties of *Carica papaya* L. using axillary buds from field-grown plants. **Journal of Tissue Research**, v.4, n.2, p.211-214, 2004.
- SÃO JOSÉ, A.R.; MARIN, S.L.D. Propagação do mamoeiro. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Mamão**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. p.177-196.
- SCHMILDT, E.R.; AMARAL, J.A.T. do. Contaminação e reação morfogênica *in vitro* de explantes de mamoeiro. **Revista Ceres**, v.49, n.281, p.63-70, 2002.
- SCHMILDT, E.R. **Enraizamento *In vitro* e *Ex vitro* de ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 1994. 76f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.
- SKOOG, F; MILLER, F.O. Chemical regulation of organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium Society Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.
- TEIXEIRA, M.T; TEIXEIRA, S.L. Estabelecimento de segmentos apicais de mamoeiro *in vitro*. **Revista Ceres**, v.51, n.296, p.477-483, 2004.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, EMBRAPA-CNPq, 1990, 433p.
- VIANNA, G.R. **Micropropagação do mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizando ápices caulinares de plantas adultas**. 1996. 66f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.
- WINNAAR, W. Clonal propagation of papaya *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.12, n.3, p.305-310, 1988.

## CAPÍTULO 2

### **Multiplicação *in vitro* de ramos de mamoeiro ‘Tainung 01’ em diferentes níveis de sulfato de adenina**

Omar Schmidt<sup>(1)</sup>, Edilson Romais Schmidt<sup>(1)</sup>, José Augusto Teixeira do Amaral<sup>(1)</sup>  
Sebastião Martins Filho<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Caixa Postal 16, CEP 29500-000, Alegre, ES, Brasil. E-mail: omar-schmidt@ig.com.br, edilson@cca.ufes.br, jata@cca.ufes.br, smartins@dpi.ufv.br

**Resumo** – Este trabalho teve o objetivo de avaliar diferentes níveis de sulfato de adenina (0; 30; 60; 90; 120 e 150 mg L<sup>-1</sup>) em meio de multiplicação MS, associado a retirada ou não das folhas formadas em meio de estabelecimento. Foram utilizados segmentos apicais de brotações laterais de plantas juvenis de mamoeiro ‘Tainung 01’ com 14 semanas de idade. Ao final do quarto subcultivo, avaliou-se a massa fresca da parte aérea, número de ramos aptos ( $\geq 5$  mm) e não aptos ( $< 5$  mm) ao enraizamento, e o aspecto visual dos tufos de ramos. As melhores respostas para o número de ramos aptos ao enraizamento foram encontradas na presença das folhas, para os tratamentos 0, 30; 60 e 90 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina. Recomenda-se utilizar 30 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina no meio de multiplicação pela qualidade e homogeneidade das partes aéreas obtidas, com ramos alongados e pecíolos longos, com bom padrão para o enraizamento.

**Termos para indexação:** *Carica papaya* L., folhas, micropropagação.

### ***In vitro* multiplication the shoot the papaya tree 'Tainung 01' in different levels of adenine sulfate**

**Abstract** - This work had the objective to evaluate different levels of adenine sulfate (0; 30; 60; 90; 120 and 150 mg L<sup>-1</sup>) in MS multiplication medium, associate to the retreat or not of the leaves formed in establishment medium. Apical sections of lateral buds of juvenile plants of papaya tree were used 'Tainung 01' with 14 weeks of age. At the end of the fourth subculture, they were evaluated the fresh mass of the aerial part, the number of capable shoots ( $\geq 5$  mm) and no capable ( $< 5$  mm) to the promoting root formation, and the visual aspect of the tufts of shoots. The best answers for the number of capable shoots to the promoting root formation were found in the presence of the leaves, for the treatments 0, 30; 60 and 90 mg L<sup>-1</sup> of adenine sulfate. It is recommended to use 30 mg L<sup>-1</sup> of adenine sulfate in multiplication middle for the quality and homogeneity of the obtained aerial parts, with prolonged shoots and long petiole, with good pattern for subsequent promoting root formation.

**Index terms:** *Carica papaya* L., leaves, micropropagation.

### **Introdução**

A propagação vegetativa *in vitro* é também denominada de micropropagação por causa do tamanho dos propágulos utilizados. Murashige (1974) dividiu os sistemas de propagação em três estádios, onde o estádio II ocorre a multiplicação dos propágulos mediante sucessivos subcultivos em meio próprio para a multiplicação. Nesta fase o principal objetivo é produzir o maior número de ramos possível no menor espaço de tempo, com uma taxa satisfatória, com o mínimo de variação de explante para explante. Além disso, a qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas vão determinar o sucesso na fase seguinte de enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1998), sendo que o tamanho dos ramos submetidos ao enraizamento também tem importância (Bhojwani & Razdan, 1983).

O cultivo *in vitro* de tecidos de mamoeiro apresenta diversos fatores afetando o sistema, tais como: sexo, clone, idade da planta, época de coleta dos explantes, tipo de explante, infecções sistêmicas, além de fatores relacionados à composição do meio de cultura e às condições da cultura (Oliveira et al., 1996). Vários trabalhos realizados com mamoeiro utilizaram segmentos apicais e gemas laterais para a obtenção de plantas clonais, porém nenhum deles especifica a retirada ou não das folhas da roseta foliar durante o recultivo dos

explantes do meio de estabelecimento para o meio de multiplicação. A presença ou não das folhas, pode alterar o balanço hormonal entre auxinas e citocininas, além da produção de fotoassimilados, e conseqüentemente afetar o crescimento e o desenvolvimento das plântulas. A formação da raiz, parte aérea e calo em culturas de tecidos vegetais é regulada pela disponibilidade e interação destas duas classes de reguladores de crescimento (Skoog & Miller, 1957; Hussey, 1978). Segundo Taiz & Zaiger (2004), a biossíntese de auxina AIA (Ácido 3-indolilacético) está associada aos tecidos com rápida divisão celular, especialmente nas partes aéreas com meristemas apicais, as folhas jovens, os frutos e as sementes em desenvolvimento.

As citocininas são derivadas da base nitrogenada adenina, sendo que seus efeitos fisiológicos na planta estão relacionados com a divisão, o alongamento, a diferenciação celular, o retardamento da senescência, a dominância apical, a germinação e a quebra de dormência de sementes (Crocomo & Cabral, 1988). A adição de adenina na forma de sulfato de adenina (SA) é muito utilizada em meios de cultura de tecidos, sendo que seu efeito pode ser comparado ao de uma citocinina fraca ou ainda haver uma interação com as próprias citocininas no meio (Caldas et al., 1998). O sulfato de adenina foi usado em meio de multiplicação de mamoeiro por Cohen & Cooper (1982), Rajeevan & Pandey (1986) e por Saha et al. (2004). Também foi utilizado para aumentar a taxa de multiplicação *in vitro* de bananeira (Menegucci et al., 1993). Segundo George & Sherrington (1984), o sulfato de adenina parece estimular a proliferação de ramos, principalmente em combinações com citocininas.

O presente trabalho teve o objetivo de estudar a multiplicação *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01', por meio da utilização de diferentes níveis de sulfato de adenina, associado à remoção ou não das folhas formadas no meio de estabelecimento.

### **Material e Métodos**

O trabalho foi conduzido no laboratório de Biotecnologia Vegetal e em casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado no município de Alegre, Estado do Espírito Santo.

Em casa de vegetação foram preparadas as plantas matrizes. A semeadura foi feita em sacolas de polietileno pretas (15 x 20 cm), contendo substrato constituído de terriço, areia e esterco bovino na proporção de 3:1:1, respectivamente, acrescido da mistura A, conforme

proposto por Marim et al. (1987), contendo uma semente em cada sacola. As mudas receberam uma pulverização com o fungicida metilthiofan a  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ , dois dias antes da retirada dos explantes. Segmentos apicais de brotações laterais de aproximadamente 5 mm de comprimento de mamoeiro 'Tainung 01' provenientes da geração  $F_1$ , com 14 semanas de idade foram utilizados como explantes iniciais.

No laboratório, os explantes foram desinfestados em câmara de fluxo laminar horizontal por 30 segundos em álcool a 70% e 15 minutos com hipoclorito de sódio a 1%, e em seguida foram enxaguados por três vezes em água deionizada e autoclavada.

O meio de cultura de estabelecimento constituiu-se de sais e vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $0,093 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenoacético) e  $5,380 \text{ mg L}^{-1}$  de Cinetina (6-furfurilaminopurina) e solidificado com  $7 \text{ g L}^{-1}$  de agar da marca Proquímios<sup>®</sup>. O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da adição do agar. O meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio de dimensões de 25 x 150 mm, contendo 20 ml por tubo, e autoclavado por 20 minutos a temperatura de  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  e à pressão de  $1,05 \text{ kg cm}^{-2}$ . O ambiente da cultura constituiu-se de bancadas em sala de cultivo com lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, fornecendo  $25,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de fluxo de fótons fotossintéticos, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , permanecendo nestas condições por 30 dias.

O meio de multiplicação foi constituído de sais e vitaminas MS, suplementado de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $0,093 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e  $0,45 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP (6-benzilaminopurina) e solidificado de  $7 \text{ g L}^{-1}$  de agar proquímios<sup>®</sup>. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado num esquema fatorial com dois fatores (sulfato de adenina e folhas). O sulfato de adenina foi usado em seis níveis (0, 30, 60, 90, 120,  $150 \text{ mg L}^{-1}$ ), e o fator folhas referiu-se a remoção ou não das folhas expandidas que constituem a chamada roseta foliar formada em meio de estabelecimento. Cada tratamento teve 4 repetições, e a parcela experimental foi constituída de 6 frascos. Utilizou-se 30 ml de meio de cultura em frascos de capacidade de 240 ml. As condições de cultivo da cultura foram as mesmas adotadas para o estabelecimento da cultura. Os tufo de ramos foram subcultivados em tufo menores a cada 30 dias, até o quarto subcultivo, conforme Schmildt (1994).

No final do quarto subcultivo avaliou-se a massa fresca da parte aérea, o número de ramos aptos ( $\geq 5 \text{ mm}$ ) e não aptos ( $< 5 \text{ mm}$ ) ao enraizamento, e também o aspecto visual dos tufo de ramos, através de uma classificação conforme utilizada por Cohen & Cooper (1982) e por Rajeevan & Pandey (1983).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. As médias do fator

qualitativo (folhas) foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, e as médias do fator quantitativo (níveis de sulfato de adenina) analisados por meio da análise de regressão ou estatística descritiva.

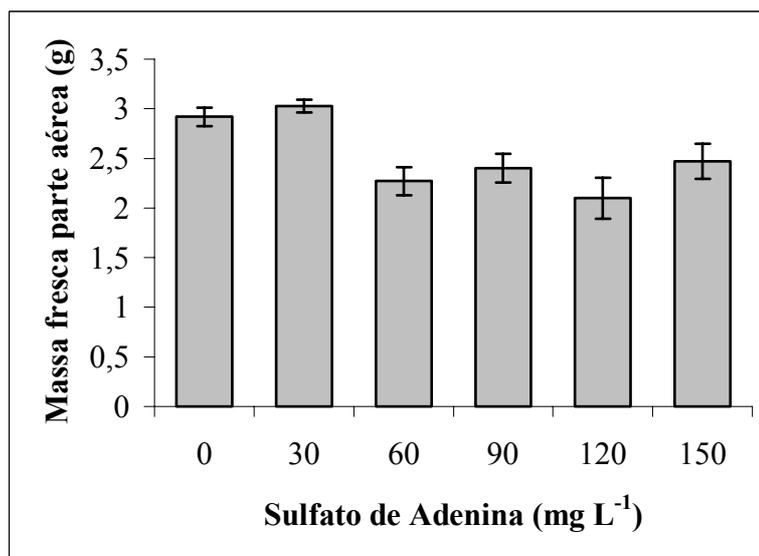
### Resultados e Discussão

Pelo resumo da análise de variância, pode-se observar que para a variável massa fresca de parte aérea não houve diferença significativa para a interação entre sulfato de adenina (SA) e folhas, havendo, no entanto diferença significativa para cada fator isolado (Tabela 1). As melhores médias referentes à massa fresca da parte aérea foram observados nos níveis de 0 e 30 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, havendo redução com níveis acima deste valor (Figura 1). Leshem et al. (1988) salientam que o uso de citocinina em meio de multiplicação estimula maior produção de parte aérea e que, no entanto, seu excesso pode ser tóxico prejudicando a formação de brotações.

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância para a massa fresca da parte aérea, número de ramos aptos e não aptos ao enraizamento de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de multiplicação, com diferentes níveis de sulfato de adenina (SA), com a remoção ou não de folhas no recultivo

Fontes de variação	G. L.	Quadrados médios		
		Massa fresca parte aérea (g)	Nº de ramos	Nº de ramos não
(SA)	5	1,0849 <sup>**</sup>	16,7612 <sup>**</sup>	63,9730 <sup>**</sup>
Folhas	1	5,9080 <sup>**</sup>	70,2284 <sup>**</sup>	17,7268 <sup>**</sup>
(SA) x Folhas	5	0,0998 <sup>ns</sup>	8,0688 <sup>**</sup>	9,8433 <sup>**</sup>
Resíduo	36	0,1015	1,4628	2,2299
CV (%)		12,57	21,95	23,40

ns, não significativo, \*\* , significativo a 1% pelo teste F.



**Figura 1.** Massa fresca da parte aérea de mamoeiro ‘Tainung 01’, em função dos níveis de sulfato de adenina, após 30 dias em meio de multiplicação. (As barras verticais indicam os erros padrões da média).

Na tabela 2, observa-se que a presença das folhas no recultivo dos explantes do meio de estabelecimento para o meio de multiplicação, proporcionou o melhor resultado para a massa fresca da parte aérea ao final do quarto subcultivo (2,88 g). Estes resultados estão de acordo com as informações de Torres et al. (1998) que explicam que os primórdios foliares são fontes de substâncias orgânicas essenciais que favorecem o crescimento de segmentos apicais em culturas. Dentre estas substâncias está a auxina AIA (Ácido 3-indolacético) cuja biossíntese está associada aos tecidos de rápida divisão celular, especialmente das partes aéreas (Taiz & Zaiger, 2004).

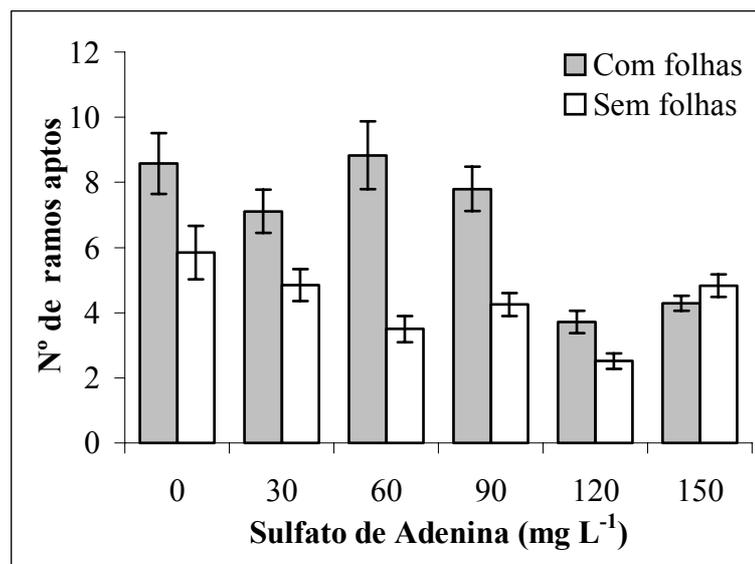
**Tabela 2.** Massa fresca da parte aérea de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de multiplicação, com a remoção ou não das folhas no recultivo

Folhas	Massa fresca parte aérea (g)
Com folhas	2,88 a
Sem folhas	2,18 b

Médias diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

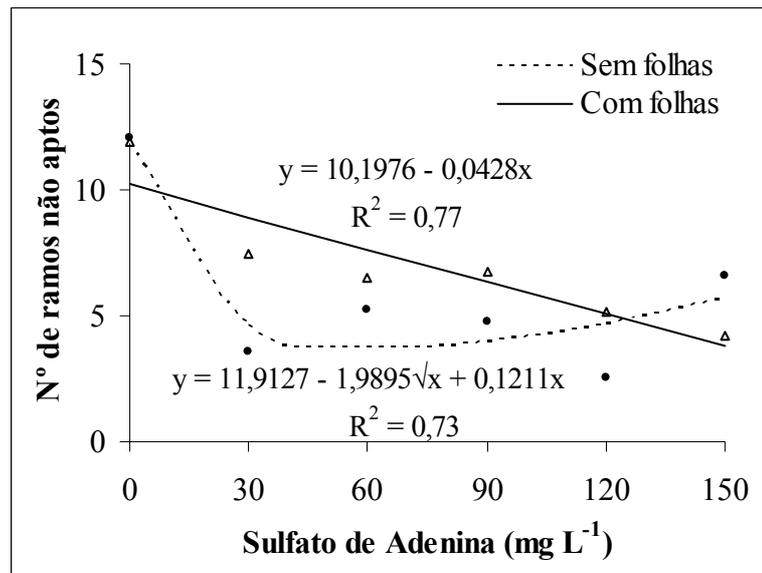
O resumo da análise de variância (Tabela 1) demonstra que há diferença significativa para a interação entre os fatores sulfato de adenina e folhas, para as características, número de ramos aptos e número de ramos não aptos ao enraizamento. Na cultura de tecidos o tamanho dos ramos obtidos durante a etapa de multiplicação é importante para o sucesso da fase seguinte de enraizamento. Miller & Drew (1990) verificaram que o tamanho ideal dos ramos de mamoeiro era o de 5 mm de comprimento, abaixo do qual os ramos não enraizavam.

Observa-se, na Figura 2, que os melhores resultados foram alcançados com os níveis de 0; 30; 60 e 90 mg L<sup>-1</sup>, sem a remoção das folhas no recultivo das plântulas proporcionando o maior número de ramos aptos ao enraizamento no final do quarto subcultivo. Esses resultados discordam dos obtidos por Cohen & Cooper (1982) que obtiveram aumento da taxa de multiplicação de ramos de mamoeiro com a adição de sulfato de adenina até 80 mg L<sup>-1</sup>. Resultados semelhantes a este trabalho foram alcançados por Vianna (1996) ao utilizar segmentos apicais de mamoeiro adulto, com os tratamentos E (0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA), F (0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 30 mg L<sup>-1</sup> SA) e G (0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 160 mg L<sup>-1</sup> SA), verificando que os explantes dos tratamentos E e F de um modo geral apresentavam bom aspecto, com folhas verdes escuras, sem hiperhidricidade e boa taxa de multiplicação, enquanto que a alta concentração de 160 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina proporcionaram efeito contrário. Os níveis de 120 e 150 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina combinado com a retirada ou não das folhas rudimentares no recultivo dos explantes, não são interessantes em função do número reduzido de ramos (Figura 2). Cohen & Cooper (1982) obtiveram resultados semelhantes, com redução da taxa de multiplicação quando o sulfato de adenina foi usado acima de 80 mg L<sup>-1</sup>. Saha et al. (2004) também utilizaram sulfato de adenina em meio de multiplicação, no entanto não discutiram o efeito do mesmo na proliferação dos ramos.



**Figura 2.** Número de ramos aptos ao enraizamento ( $\geq 5$  mm) de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de multiplicação, em função dos níveis de sulfato de adenina, com a remoção ou não das folhas no recultivo. (As barras verticais indicam os erros padrões da média).

Pela Figura 3, observa-se que o número de ramos não aptos ao enraizamento foi maior com a não utilização de sulfato de adenina, e foi decaindo linearmente com a utilização destes na presença das folhas. Como o número de ramos foi maior sem adicionar o sulfato de adenina ao meio de multiplicação, apresentando-se com tamanho inferior a 5 mm de comprimento, isto sugere que estes ramos sejam subcultivados para um meio próprio de alongamento, antes do meio de enraizamento, visto que as partes aéreas pequenas não enraízam bem (Miller & Drew, 1990; Vianna, 1996). Segundo Grattapaglia & Machado (1998) além do aspecto de eficiência, a fase de alongamento é antieconômica por demandar mão de obra adicional que não resulta em multiplicação, e sim, num simples ajuste da cultura. Os ramos não aptos ao enraizamento também foram em maior número com a não utilização do sulfato de adenina no meio de multiplicação, com a remoção das folhas (Figura 3).



**Figura 3.** Número de ramos não aptos ao enraizamento (< 5 mm) de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de multiplicação, em função dos níveis de sulfato de adenina, com a remoção ou não das folhas no recultivo.

Na avaliação das características de número de ramos aptos ao enraizamento, constatou-se que, na presença das folhas, o número de ramos foi superior nos níveis de 0; 30; 60 e 90 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 3). Para o número de ramos não aptos, a presença de folhas no recultivo associado à adição de sulfato de adenina foi superior em todos os níveis de sulfato de adenina utilizado, exceto para o nível zero (Tabela 3). Como já mencionado anteriormente, as folhas são importantes para o bom crescimento dos explantes, portanto ao avaliar os ramos aptos ao enraizamento aconselha-se não retirar estas folhas durante o recultivo dos explantes. Para o aproveitamento dos ramos não aptos ao enraizamento, a melhor opção é também a não retirada destas folhas, visto que não houve diferença estatística com a retirada das mesmas, com a não utilização de sulfato de adenina.

**Tabela 3.** Número de ramos aptos e não aptos ao enraizamento de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de multiplicação, em função dos níveis de sulfato de adenina, com a remoção ou não das folhas no recultivo

Sulfato de Adenina (mg L <sup>-1</sup> )	Nº de ramos aptos ( $\geq 5$ mm)		Nº de ramos não aptos ( $< 5$ mm)	
	Com folhas	Sem folhas	Com folhas	Sem folhas
0	8,58a	5,85b	11,87a	12,04a
30	7,11a	4,85b	7,43a	3,54b
60	8,83a	3,50b	6,52a	5,21b
90	7,80a	4,25b	6,73a	4,75b
120	3,71a	2,52a	5,16a	2,52b
150	4,29a	4,83a	4,21a	6,58b

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A tabela 4 mostra o padrão dos tufos de ramos, através da classificação, conforme utilizada por Cohen & Cooper (1982) e Rajeevan & Pandey (1983), com o objetivo de avaliar melhor a qualidade das partes aéreas produzidas, visto que, além do comprimento dos ramos e a taxa de multiplicação, o padrão dos ramos também são importantes para a obtenção do sucesso do enraizamento em meio próprio de cultura.

Observa-se na classificação que a não utilização de sulfato de adenina no meio de multiplicação, propiciou gemas e ramos reduzidos e compactos, não sendo interessante como já mencionado anteriormente, pois estes ramos não enraizam bem. O melhor padrão das partes aéreas foi obtido com a utilização de 30 e 60 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, sem a remoção das folhas da roseta foliar no recultivo dos explantes, proporcionando ramos alongados com pecíolos longos. No entanto, a melhor massa fresca da parte aérea foi obtida com a utilização de 30 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina (Figura 1), sendo, portanto este nível adequado para adicionar ao meio de multiplicação. A Figura 3A mostra a formação das brotações de mamoeiro ‘Tainung 01’, com detalhe dos novos ramos ao utilizar 30 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina. Os níveis de 120 e 150 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina utilizados no meio de multiplicação não proporcionou um bom padrão para os ramos, onde estes, apresentaram-se largos e com lâmina foliar expandida, caracterizando a presença de hiperhidricidade.

**Tabela 4.** Aspecto visual dos tufos de ramos de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de multiplicação, em função dos níveis de sulfato de adenina, com a remoção ou não das folhas no recultivo

Sulfato de Adenina (mg L <sup>-1</sup> )	Aspecto visual	
	Com folhas	Sem folhas
0	1,0	1,0
30	2,7	3,0
60	2,7	2,0
90	2,0	3,0
120	3,7	3,7
150	3,7	3,7

Aspecto visual: Obtido pela média de três frascos de cultura por tratamento conforme Cohen & Cooper (1982) e Rajeevan & Pandey (1983):

- 1 - Gema e ramos reduzidos e compactos
- 2 - Alguns ramos de pecíolos expandidos
- 3 - Ramos alongados com pecíolos longos
- 4 - Ramos largos com lâmina foliar expandida

### Conclusões

A presença das folhas da roseta foliar formada em meio de estabelecimento é benéfica à multiplicação dos ramos.

O melhor padrão para os ramos é obtido em meio de multiplicação contendo 30 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina.

O sulfato de adenina prejudica a taxa de multiplicação dos ramos.

### Referências

- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983. 502p.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPQ, 1998. p.87-132.
- COHEN, D.; COOPER, P.A. Micropropagation of babaco – A carica hybrid from Ecuador. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURES, 5, 1981, Tóquio. **Proceedings**. Tóquio: Japanese Association for Plant Tissue Culture, 1982. p.743-744.

- CROCOMO, O.J.; CABRAL, J.B. **A biotecnologia no melhoramento de plantas tropicais**. Brasília: Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior, 1988. 39p.
- DREW, R.A. Improved techniques for *in vitro* propagation and germoplasm storage of papaya. **HortScience**, v.27, n.10, p.1122-1124, 1992.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**: handbook and directory of commercial laboratories. Eversley: Exegetics, 1984. 709p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Miropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPQ, 1998. v.1, p.183-260.
- HUSSEY, G. The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. **Science Progress**, v.65, p.185-208, 1978.
- LECHEN, B; WERKER, E.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, v.62, p.271-276, 1988.
- MARIN, S.L.D.; GOMES, J.A.; SALGADO, J.S. **Recomendação para a cultura do mamoeiro cv. Solo no estado do Espírito Santo**. 3. ed. Vitória: EMCAPA, 1987. 64p.
- MENEGUCCI, J.L.P.; PINTO, J.E.B.P.; SILVA, C.R. de R. Avaliação de um novo regulador de crescimento na micropropagação de cultivares de bananeira (*Musa* sp. AAB). **Ciência e Prática**, v.7, n.4, p.318-321, 1993.
- MILLER, R.M.; DREW, R.A. Effect of explant type on proliferation of *Carica papaya* L. *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, n.1, p.39-44, 1990.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- OLIVEIRA, R.P.; DANTAS, J.L.L.; ALMEIDA, E.P.; NICKEL, O.; VILARINHOS, A.D.; MORALES, C.F.G. Uso da biotecnologia no melhoramento genético e propagação do mamoeiro. In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. (Ed.). **Mamão no Brasil**. Cruz das Almas: UFBA/EMBRAPA-CNPQ, 1996. 179p.
- RAJEEVAN, M.S.; PANDEY, R.M. Economics of mass propagation of papaya through tissue culture. In: WITHERS, L.A.; ANDERSON, P.G. (ed.). **Plant Tissue Culture and its agricultural Applications**. London: Butterworths, 1986. v.21, p.211-215.
- RAJEEVAN, M.S.; PANDEY, R.M. Propagation of papaya through tissue culture. **Acta Horticulturae**, v.131, p.131-139, 1983.
- SAHA, M.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. *In vitro* culture studies in four dioecious varieties of *Carica papaya* L. using axillary buds from field-grown plants. **Journal of Tissue Research**, v.4, n.2, p.211-214, 2004.

SCHMILDT, E.R. **Enraizamento *In vitro* e *Ex vitro* de ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 1994. 76f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.

SKOOG, F; MILLER, F.O. Chemical regulation of organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium Society Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.449-484.

TORRES, A.C.; TEIXEIRA.; S.L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.133-145.

VIANNA, G.R. **Micropropagação do mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizando ápices caulinares de plantas adultas**. 1996. 66f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

## CONCLUSÕES GERAIS

O melhor resultado para a fase de estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais de mamoeiro 'Tainung 01' é obtido com ANA e Cinetina nos níveis de 0,093 e 5,38 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A taxa de multiplicação dos explantes nos subcultivos é influenciada pelos níveis de ANA e Cinetina utilizados na fase de estabelecimento da cultura.

A presença das folhas da roseta foliar formada em meio de estabelecimento é benéfica à multiplicação dos ramos.

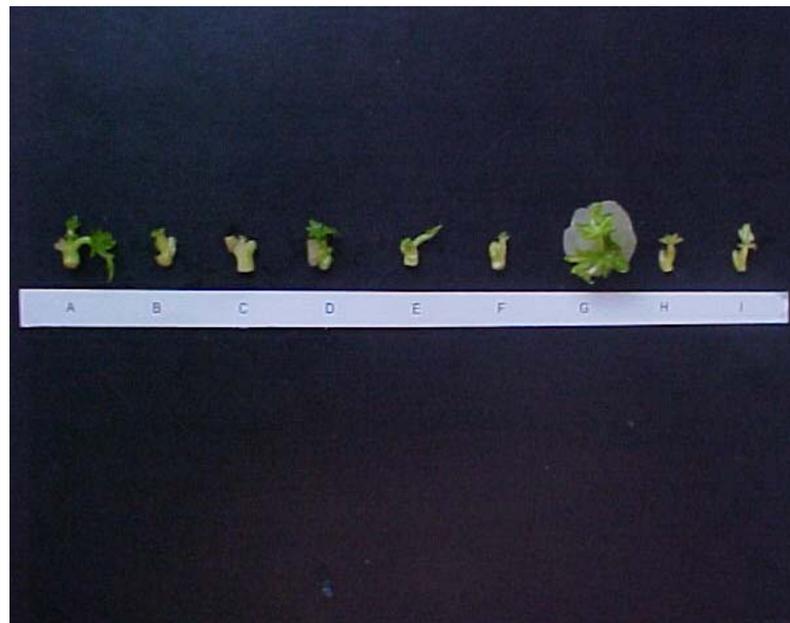
O melhor padrão para os ramos é obtido em meio de multiplicação contendo 30 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina.

O sulfato de adenina prejudica a taxa de multiplicação dos ramos.

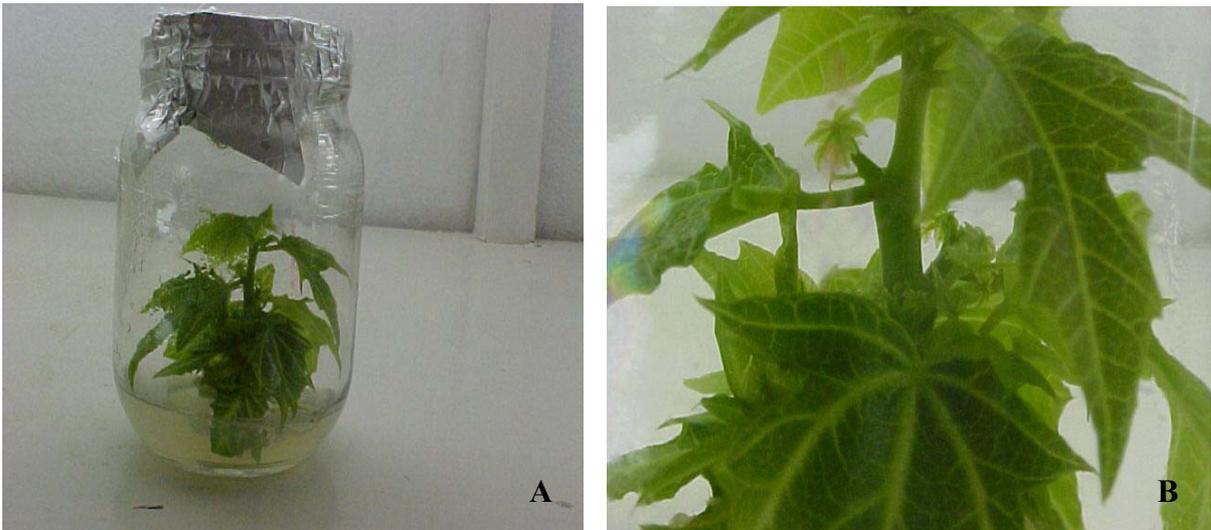
**ANEXO**



**Figura 1A** – Plantas doadoras de explantes de mamoeiro 'Tainung 01' produzidas em casa de vegetação. CCAUFES, Alegre, ES, 2005.



**Figura 2A** – Explantes de mamoeiro ‘Tainung 01’, após 30 dias em meio de estabelecimento, com diferentes níveis de ANA e Cinetina (CIN) em  $\text{mg L}^{-1}$  (A = 0,093 ANA + 5,38 CIN; B = 0,093 ANA + 10,76 CIN; C = 0,093 ANA + 21,52 CIN; D = 0,931 ANA + 5,38 CIN; E = 0,931 ANA + 10,76 CIN; F = 0,931 ANA + 21,52 CIN; G = 1,862 ANA + 5,38 CIN; H = 1,862 ANA + 10,760 CIN; I = 1,862 ANA + 21,52 CIN). CCAUFES, Alegre, ES, 2005.



**Figura 3A** – Brotações de mamoeiro 'Tainung 01' em meio de multiplicação com utilização de  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfato de adenina (A = no frasco de cultivo; B = ampliação mostrando detalhes dos novos ramos sendo formados). CCAUFES, Alegre, ES, 2005.