

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

**MÁRCIO JOSÉ VIEIRA DE OLIVEIRA**

**ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS E MINIESTACAS DE  
MAMOEIRO HÍBRIDO UENF/CALIMAN 02**

ALEGRE-ES  
2014

**MÁRCIO JOSÉ VIEIRA DE OLIVEIRA**

**ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS E MINIESTACAS DE MAMOEIRO  
HIBRIDO UENF/CALIMAN 02**

Tese apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.  
Orientador: Prof. Dr. Ruimário Inácio Coelho

**ALEGRE-ES  
2014**

O48e Oliveira, Márcio José Vieira de, 1970-  
Enraizamento de microestacas e miniestacas de mamoeiro híbrido  
UENF/CALIMAN 02 / Márcio José Vieira de Oliveira. – 2014.  
101 f. : il.

Orientador: Ruimário Inácio Coelho.

Coorientadores: Edilson Romais Schmildt; José Augusto Teixeira do Amaral.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Mamoeiro. 2. Mamão. 3. Micropropagação. 4. Propagação vegetativa. 5. Microestaquia. 6. Miniestaquia. I. Coelho, Ruimário Inácio. II. Schmildt, Edilson Romais. III. Amaral, José Augusto Teixeira do. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. V. Título.

**MÁRCIO JOSÉ VIEIRA DE OLIVEIRA**

**ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS E MINIESTACAS DE MAMOEIRO  
HÍBRIDO UENF/CALIMAN 02**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal na área de concentração fitotecnia.

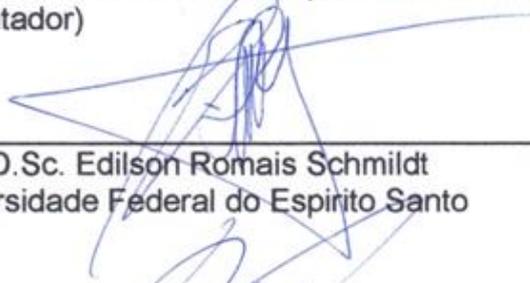
Aprovada em 28 de fevereiro de 2014.

**COMISSÃO EXAMINADORA**



---

Prof. D.Sc. Ruimário Inácio Coelho  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Orientador)



---

Prof. D.Sc. Edilson Romais Schimdt  
Universidade Federal do Espírito Santo



---

Prof. D.Sc. José Carlos Lopes  
Universidade Federal do Espírito Santo



---

Prof. D.Sc. Carolina Maria Palácios de Souza  
Instituto Federal do Espírito Santo



---

Prof. D.Sc. Omar Schimdt  
Universidade Federal do Espírito Santo

A Deus, pelo privilégio da vida.

À minha mãe e meus irmãos, por terem acreditado no meu potencial.

À minha esposa e filhos, pelo apoio e compreensão.

Ao Prof. D.Sc. Ruimário Inácio Coelho, pela orientação, pela confiança em mim depositada.

Aos professores Edilson Romais Schmidt, José Augusto Teixeira do Amaral e Rodrigo Sobreira Alexandre, pelas importantes sugestões no exame de qualificação, as quais contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores José Carlos Lopes, Omar Schmidt, Carolina Maria Palácios de Souza, pelas críticas e sugestões apresentadas na minha Defesa da Tese.

Aos professores do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, com quem tive aulas, tendo aprimorado meu aprendizado.

Aos meus amigos, professores, funcionários e colegas de trabalho, e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que seja com um sorriso amigo e uma simples palavra de incentivo.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 – MICROPROPAGAÇÃO DO MAMOEIRO.....	4
2.1.1 – Escolha da planta matriz.....	4
2.1.2 – Formação de brotos em plantas de mamoeiro.....	5
2.1.3 – Tipo de explante.....	6
2.1.4 – Desinfestação.....	8
2.1.5 – Meios de cultura.....	10
2.2 – FATORES QUE INTERFEREM NO ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO DAS VITROPLANTAS.....	17
2.2.1 – Fatores relacionados à planta matriz.....	19
2.2.2 – Fatores relacionados ao explante.....	19
2.2.3 – Fatores relacionados ao meio nutritivo.....	20
2.2.4 – Fatores ligados ao meio nutritivo de enraizamento.....	21
2.2.4.1 – Substâncias reguladoras de crescimento.....	21
2.2.4.2 – Sacarose.....	24
2.2.4.3 – Nutrientes minerais.....	25
2.2.4.4 – Luz.....	26
2.2.4.5 – Oxigênio.....	27
2.2.4.6 – Substratos.....	28
2.2.4.7 – Temperatura.....	29
2.3 – ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS.....	30
2.4 – MINIESTAQUIA.....	32
2.4.1 – Miniestaquia em sistema hidropônico.....	33
3 – REFERÊNCIAS.....	34
4 – TRABALHOS.....	44
4.1 – ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE MAMOEIRO HÍBRIDO UENF/CALIMAN 02 COM AIB EM SISTEMA SEMI- HIDROPÔNICO.....	45
4.1.1 – Introdução.....	47

4.1.2 – Material e Métodos .....	49
4.1.3 – Resultados e Discussão.....	55
4.1.4 – Conclusão.....	59
4.1.5 – Referências.....	59
<b>4.2 – ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE MAMOEIRO COM AIB EM HIDROPONIA.....</b>	<b>62</b>
4.2.1 – Introdução.....	64
4.2.2 – Material e Métodos.....	65
4.2.3 – Resultados e Discussão.....	67
4.2.4 – Conclusões.....	71
4.2.5 – Referências.....	71
<b>4.3 – NÍVEIS DE AIB E SUBSTRATOS NO ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE MAMOEIRO HIBRIDO UENF/CALIMAN 02 EM SISTEMA SEMI-HIDROPÔNICO.....</b>	<b>74</b>
4.3.1 – Introdução.....	77
4.3.2 – Material e Métodos.....	79
4.3.3 – Resultados e Discussão.....	81
4.3.4 – Conclusão.....	87
4.3.5 – Referências.....	87
<b>5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>90</b>

## LISTA DE TABELAS

### 4.1

**Tabela 1** – Médias de microestacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 enraizadas em sistema semi-hidropônico tratadas com diferentes níveis de AIB *in vitro* (IV) e *ex vitro* (EV).....56

### 4.2

**Tabela 1** – Médias de miniestacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em sistema hidropônico submetidas a diferentes níveis de ácido indolbutírico (AIB, em mg L<sup>-1</sup>).....71

### 4.3

**Tabela 1** – Enraizamento percentual de estacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em dois substratos na presença de diferentes níveis de ácido indolbutírico (AIB) em sistema semi-hidropônico.....82

**Tabela 2** – Porcentagem de enraizamento (PE, em %), porcentagem de plantas vivas (PV, em %), crescimento da parte aérea (CPA, em cm), crescimento do diâmetro do caule (CDC, em mm), matéria seca de parte aérea (MSPA, em g) e matéria seca de raízes (MSR, em g) de estacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em dois substratos na presença de diferentes níveis de AIB em sistema semi-hidropônico.....84

## LISTA DE FIGURAS

### 4.1

**Figura 1** – Enraizamento *ex vitro* de microestacas de mamoeiro em sistema semi-hidropônico com AIB em indução *in vitro* e *ex vitro*..... 52

**Figura 2** – Etapas da micropropagação do mamoeiro..... 54

### 4.2

**Figura 1 – a** – bandejas plásticas com contendo placas de isopor e cubos de espuma fenólica; **b** – detalhe da face inferior da folha de isopor com furos transpassado por algodão..... 67

**Figura 2 – a** – Planta matriz; **b** – brotos e materiais para instalação do experimento..... 67

**Figura 3** – Brotos de mamoeiro enraizados após 35 dias em hidroponia com  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB dissolvido na solução nutritiva na primeira semana da instalação do experimento..... 68

### 4.3

**Figura 1** – Etapas da miniestaquia do mamoeiro em sistema semi-hidropônico..... 81

**Figura 2** Enraizamento de estacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em dois substratos em função de diferentes níveis de ácido indolbutírico (AIB) em sistema semi-hidropônico, ao final de 90 dias de avaliação..... 83

**Figura 3** – Análises de regressão para o enraizamento de miniestacas de plantas hermafroditas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em sistema semi-hidropônico..... 85

OLIVEIRA, M. J. V. de. Universidade Federal do Espírito Santo, Fevereiro de 2014. **Enraizamento de Microestacas e miniestacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02** Orientador: Prof. D.Sc. Ruimário Inácio Coelho. Co-orientadores: Prof. D.Sc. Edilson Romais Schmildt; Prof. D.Sc. José Augusto Teixeira do Amaral.

## RESUMO

O desenvolvimento da técnica de micropropagação do mamoeiro por meio da cultura de tecidos se destaca como uma “ferramenta” de grande aplicação na produção em larga escala de clones com características superiores, de sexos definidos e livres de viroses. Na micropropagação, a possibilidade do enraizamento *ex vitro* proporciona redução de custos com mão de obra e infraestrutura, pois uma etapa do processo *in vitro* é eliminada e há economia de energia e espaço na sala de crescimento. Outra forma de se obter maior rendimento na produção de brotos das plantas matrizes é a miniestaquia. Foram realizados três experimentos com objetivos de avaliar o efeito da aplicação de ácido indolbutírico (AIB) para indução do enraizamento em microestacas e miniestacas de plantas hermafroditas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02. No experimento 1, as microestacas produzidas *in vitro* foram submetidas a duas formas de indução para o enraizamento em condições *ex vitro* em sistema semi-hidropônico: indução *in vitro* e *ex vitro*. O experimento foi instalado em num delineamento inteiramente ao acaso em um esquema fatorial 2 x 4, sendo dois sistema de indução (*in vitro* e *ex vitro*) e quatro níveis de AIB (00; 2,5; 5,0 e 7,5 mg L<sup>-1</sup>). No experimento 2, foram selecionadas miniestacas (de 4 a 6 cm) das plantas matrizes e submetidas ao enraizamento em hidroponia com diferentes níveis de AIB (0; 1,; 5; 10; 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> de AIB). O experimento foi instalado em delineamento inteiramente ao acaso com seis tratamentos, quatro repetições e cinco miniestacas por repetição. O experimento 3 foi instalado em esquema fatorial com cinco níveis de AIB: 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L<sup>-1</sup>, dois substratos: vermiculita e fibra de coco, num delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições e seis miniestacas por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey e, para a massa seca da parte aérea e do sistema radicular foram também submetidas à análise de regressão. No enraizamento de microestacas de mamoeiro em sistema semi-hidropônico, o tratamento que gerou melhor resultado (96,66% de enraizamento) foi aquele em que

se utilizou  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB com aplicação *in vitro*. Para o enraizamento de miniestacas em sistema semi-hidropônico, o nível adequado de AIB é de  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ , que propiciou 61,11% de enraizamento com os substratos vermiculita e com fibra de coco.

OLIVEIRA, M. J. V. de. Universidade Federal do Espírito Santo, Fevereiro de 2014.  
**ROOTING OF MICROCUTTINGS AND MINICUTTINGS OF THE PAPAYA HYBRID UENF/CALIMAN 02.**

### ABSTRACT

The development of techniques of micropropagation of papaya through tissue culture stands as a "tool" of wide application in large-scale production of clones with superior characteristics, the sexes defined and free of viruses. In micropropagation, the possibility of *ex vitro* rooting provides cost saving in manpower and infrastructure, as a step of the *in vitro* process is eliminated and there is power and space savings in the growth room. Another way to obtain higher yield of shoots of stock plants is microcutting. Three experiments aimed to evaluate the effect of Indolebutyric Acid (IBA) to induce rooting on micropiles and mini hermaphrodite papaya plants hybrid UENF/CALIMAN 02 were performed. In experiment 1 microcuttings produced *in vitro* were subjected to two forms of induction for rooting in *ex vitro* conditions in semi-hydroponic system: *in vitro* and *ex vitro* induction. The experiment was installed in a completely randomized design in a 2 x 4 factorial arrangement, two induction system (*in vitro* and *ex vitro*) and four levels of IBA (00, 2.5, 5.0 and 7.5 mg L<sup>-1</sup>). In experiment 2 minicuttings were selected (4-6 cm) from the mother plants and subjected to rooting hydroponics with different levels of IBA (0, 1, 5, 10, 50 and 100 mg L<sup>-1</sup> IBA). The experiment was installed in a completely randomized design with six treatments, four replications and five minicuttings per replicate. Experiment 3 was installed on factorial design with five levels of IBA: 0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10 mg L<sup>-1</sup>, two substrates: vermiculite and coconut fiber in a completely randomized design with three replications and six minicuttings per replication. Data were subjected to analysis of variance and means were compared by Tukey test, and for dry weight of shoot and root were also subjected to regression analysis. On rooting of papaya minicuttings in semi-hydroponic system, the treatment that produced the best result (96.66% rooting) was the one which used 2.5 mg L<sup>-1</sup> IBA with *in vitro* application. For rooting cuttings in semi-hydroponic system, the appropriate level of IBA is 5.0 mg L<sup>-1</sup>, which provided 61.11% rooting with vermiculite and coconut fiber.

## 1 – INTRODUÇÃO

O mamão é considerado uma das frutas de maior importância econômica e nutritivas. Fonte de nutrientes, destacando-se potássio e magnésio, antioxidantes como flavonoides, vitamina C e carotenoides, além de vitaminas do complexo B, ácido fólico pantotênico e fibras. O mamão é fonte, também, da enzima digestiva papaína, que é um ingrediente industrial (MANDAL et al., 2014).

O mamoeiro, *Carica papaya* L., é uma espécie tropical e tem como provável centro de origem o noroeste da América do Sul – vertente oriental dos Andes, ou mais precisamente, a parte alta da Bacia Amazônica, onde ocorre a máxima diversidade genética (DANTAS et al., 2008). Devido à sua adaptabilidade e aos trabalhos de melhoramento genético, seu cultivo tem-se estendido também para regiões subtropicais (BENASSI & CATTANEO, 2011).

A produção global de mamão vem ganhando acréscimos, principalmente devido ao aumento na produção da Índia, que em 2011 produziu 4.180.075 toneladas da fruta, liderando a produção mundial de mamão, seguida pelo Brasil que produziu 1.854.343 toneladas no mesmo período (FAO, 2014). Já em 2012, o Brasil produziu 1.517.696 toneladas, tendo como maiores produtores os estados da Bahia, com 683.474 toneladas e do Espírito Santo com 489.645 toneladas, em terceiro lugar, o estado do Ceará produziu 86.414 toneladas da fruta no mesmo período (IBGE, 2014).

O mamoeiro é uma espécie polígama, ou seja, apresenta diferentes formas sexuais, o tipo floral da planta influenciará na forma e característica dos frutos. Geralmente plantas masculinas não produzem frutos e quando o fazem, não são aproveitados comercialmente. As plantas femininas, apesar de produtivas, acabam produzindo frutos de formato arredondado ou ligeiramente ovalados, cuja cavidade interna é grande em relação à espessura da polpa, o que os desvaloriza comercialmente. Os frutos produzidos pelas plantas hermafroditas têm formato alongado apresentando uma cavidade interna pequena em relação à polpa, sendo o tipo de fruto ideal exigido tanto pelo mercado interno quanto para o externo (ANDREANI JUNIOR, 1998). Esses frutos alongados têm um custo menor de embalagem e transporte, pois apresentam, em relação ao peso, um menor volume (ARANGO et al., 2008).

A propagação do mamoeiro é realizada, principalmente por meio de sementes, entretanto essa propagação induz à ocorrência de variações genéticas indesejáveis devido à polinização aberta, resultando na mistura de genótipos. Além disso, podem apresentar problemas na germinação, pela ocorrência de substâncias inibidoras presentes no arilo, que podem fazer as sementes perderem o poder germinativo em períodos relativamente curtos (COUTO, 1983).

O mamoeiro inicia sua produção cerca de oito a dez meses após o plantio das mudas no campo, dependendo da região. Na sexagem das mudas, isto é, no processo de identificação do sexo da planta, eliminam-se duas das três plantas de cada cova (desbaste), por ocasião do florescimento, deixando apenas a muda que possuir a flor hermafrodita (ONO et al., 2004). Estas condições contribuem para a elevação dos custos das lavouras, aumentando assim o preço final dos frutos aos consumidores (Simão, 1998; Arango et al., 2008).

A micropropagação do mamoeiro é um método eficiente para a multiplicação de cruzamentos interespecíficos de mamoeiro, bem como mutantes geneticamente transformados (ANANDAN et al., 2011). As principais vantagens desse sistema de propagação são: altos coeficientes de multiplicação que permitem manipular volumes elevados de plantas em curtos espaços de tempo; introdução rápida de novas variedades ou clones; produção independente das condições ambientais, possibilidade do saneamento de doenças; uniformidade das plantas produzidas e maior facilidade de comercialização (PIZA & PINHO, 2002). Além disso, segundo Schildt (2010), as plantas de mamoeiro obtidas por meio de propagação vegetativa, quando cultivadas no campo apresentaram iniciação precoce de flores, menor altura de inserção dos primeiros frutos e baixa estatura, o que antecipa e facilita a colheita.

A viabilidade econômica da micropropagação do mamoeiro, segundo Ruggiero et al. (2003), é o plantio de mudas rigorosamente sadias, multiplicação dos melhores clones, além da identificação do sexo da planta antes do plantio definitivo no campo.

Segundo Pasqual (2001<sub>b</sub>), a multiplicação *in vitro* pode ser obtida em larga escala, resultando na instalação de verdadeiras biofábricas comerciais, baseadas no princípio da linha de produção e algumas vezes automatizada. O mesmo autor cita

três alternativas principais para a propagação *in vitro* em larga escala: automação/mecanização dos procedimentos de rotina da micropropagação, tais como preparo de meios de cultura, repicagem das culturas e aclimatização de plantas micropropagadas; desenvolvimentos de novas tecnologias baseadas na utilização de sistemas de micropropagação em meio líquido; desenvolvimentos de sistemas alternativos de cultivo "*in vitro*".

A partir da micropropagação, desenvolveu-se a microestaquia, que tem sido amplamente utilizada em cultivos de espécies florestais e constitui-se no enraizamento de microestacas originadas via micropropagação (DUTRA & WENDLING, 2010).

A miniestaquia é outra técnica de grande aplicabilidade na propagação vegetativa, teve início no setor florestal, e atualmente, constitui-se na principal técnica de propagação clonal de *Eucalyptus urophilla* e seus híbridos por possibilitar consideráveis ganhos, principalmente quanto ao aumento dos percentuais e qualidade de enraizamento adventício, bem como na redução do tempo para a formação da muda clonal (OLIVEIRA et al., 2012).

A utilização das técnicas de microestaquia e de miniestaquia tem levado ao uso de concentrações mais baixas de ácido indolbutírico (AIB), um dos reguladores de crescimento vegetal mais utilizado na indução de raízes adventícias em várias culturas, e, em alguns casos até sua supressão (TITON et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o enraizamento de microestacas e miniestacas de plantas hermafroditas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02, em sistema hidropônico e semi-hidropônico utilizando níveis de ácido indolbutírico (AIB), de modo a possibilitar o estabelecimento de lavouras de mamoeiro, com 100% de plantas de sexo hermafroditas, utilizando uma muda por cova.

## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – MICROPROPAGAÇÃO DO MAMOEIRO

#### 2.1.1 – Escolha da planta matriz

Segundo Agnihotri et al. (2004), a maior dificuldade da micropropagação de plantas adultas de mamoeiro oriundas do campo é a alta incidência de contaminação por bactérias endofíticas. Segundo Vianna et al. (1997) e Schmildt & Amaral (2002), em mamoeiro, plantas doadoras de explantes mantidas em casa de vegetação apresentam menor contaminação fúngica e bacteriana em relação àquelas cultivadas no campo.

De acordo com Pasqual et al. (2010), a manutenção da planta matriz em ambiente mais limpo, como uma casa de vegetação, permite o controle de insetos e microrganismos mediante a aplicação de fungicidas, inseticidas e bactericidas. Segundo Sousa et al. (2006<sub>b</sub>) as plantas jovens e comprovadamente sadias são mais indicadas, sendo que, em algumas espécies, a indexação para alguns vírus de importância econômica é recomendada,

A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* está associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica na planta-matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Explantes da mesma natureza retiradas de plantas em diferentes condições fisiológicas podem apresentar respostas morfogênicas bastante distintas (COSTA et al., 2006).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), pode ocorrer variabilidade na resposta morfogênica, não somente, entre espécies do mesmo gênero, mas também, entre genótipos da mesma espécie (diferentes cultivares ou clones).

Ferreira et al. (2011), ao investigarem a existência de variabilidade entre clones de mamoeiro cv. Tainung 01 geração F<sub>2</sub> quanto ao padrão de enraizamento *in vitro*, observaram diferenças nos diferentes clones, sugerindo que clones com maior percentual de enraizamento devem ser investigados.

### 2.1.2 – Formação de brotos em plantas de mamoeiro

Na maioria das plantas superiores, como o mamoeiro, o crescimento da gema apical inibe o crescimento das gemas laterais, um fenômeno denominado dominância apical. A remoção do ápice caulinar (decapitação) em geral resulta no crescimento de uma ou mais gemas laterais. Hormônios, como as citocininas e o ácido abscísico (ABA), podem estar envolvidos. A aplicação direta de citocininas nas gemas axilares estimula o crescimento dessas gemas em muitas espécies, suprimindo-se o efeito inibitório do ápice caulinar. A auxina faz do ápice caulinar um dreno para a citocinina produzida na raiz, e este, pode ser um dos fatores envolvidos na dominância apical (TAIZ & ZAIGER, 2013).

A pulverização de plantas de mamoeiro com benzilaminopurina (BA) e ácido giberélico ( $GA_3$ ) apresenta resultados benéficos tanto no incremento do número de brotos laterais quanto na conformação dos mesmos (GIAMPAN et al., 2005). A remoção da gema apical estimula a produção de brotações com maior diâmetro (ONO et al., 2004).

Segundo Costa & Pacova (2003), os primeiros trabalhos com a regeneração de plantas de mamoeiro a partir de ramos vegetativos destacados da planta matriz foram desenvolvidos na África do Sul em 1960 pelo Centro de Pesquisa da University of Natal e divulgados por Allan (1964).

Na utilização do cultivar feminino 'Honey Gold', a indução de brotações laterais, nos caules, é promovida pela aplicação direta, abaixo das folhas, de várias misturas sintéticas citocininas/ácido giberélico. Os pontos terminais e os frutos em crescimento são removidos para promover o desenvolvimento dos rebentos laterais. Os brotos, segundo o autor, são retirados quando atingem aproximadamente 9 mm de diâmetro. Quando se deixa os tocos após o corte novos brotos são formados, que podem ser colhidas mensalmente (ALLAN, 1995).

Ono et al. (2004) avaliaram a quebra da dominância apical no mamoeiro cv. Improved Sunrise Solo, em plantas com seis meses de idade, com diferentes combinações de BAP e  $GA_3$  em três aplicações a intervalos de sete dias. Esses tratamentos foram acompanhados da remoção ou não da gema apical. Na mistura

de 125 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> com 250 mg L<sup>-1</sup> de BAP, tanto com a remoção da gema apical quanto sem a remoção, as plantas tratadas apresentaram maior número de brotações que a testemunha (água, sem regulador de crescimento), as quais, não apresentaram nenhuma brotação das gemas laterais.

Segundo Lopes et al. (2008), a menor altura de poda do tronco do mamoeiro pode promover maior proximidade entre a parte aérea e o sistema radicular, o que favorece uma ação hormonal mais rápida e uma concentração mais elevada de citocinina quando comparada às maiores alturas de poda.

Barros et al. (2009) avaliaram a influência da poda em diferentes alturas em uma lavoura de mamoeiro cv. Golden com dois anos e meio de idade e constataram que a poda a dois metros do solo proporciona maior rendimento de brotações laterais sem o uso de reguladores de crescimento.

Sousa et al. (2011) utilizaram citocinina e giberelina nas concentrações de 250 mg L<sup>-1</sup>, em três aplicações com intervalos de 10 dias em mamoeiro 'Tainung 01' de um ano e meio de idade, com diferentes alturas de poda: 1/3, 1/2 e 2/3 e obtiveram maior número de brotações com a poda a 2/3 do tronco e com a aplicação de fitorreguladores.

Segundo Schmidt et al. (2011), o maior diâmetro do caule tende a propiciar maior produção de brotações com tamanho superior a cinco centímetros, devendo ser selecionado acessos com maiores altura de plantas.

A formação de jardins clonais em ambiente protegido, para a produção de ramos de mamoeiro, pode permitir a produção de brotos em boas condições fitossanitárias, visto que os controles fitossanitários são facilitados nessas condições.

### **2.1.3 – Tipo de explante**

O explante é a parte da planta que é cultivado em meio artificial com o objetivo de iniciar um sistema de regeneração *in vitro*. Dos aspectos a serem considerados na seleção do explante, o que tem maior influência na resposta morfogênica é seu nível de diferenciação e a fase de desenvolvimento em que se encontra o tecido (SOUSA

et al., 2006<sub>a</sub>). Na micropropagação, o processo de multiplicação é baseado na regeneração de partes da planta-matriz, que ocorre pelos mecanismos de divisão e diferenciação celular e baseia-se no princípio de que todas as células vegetais contêm informação genética necessária para a regeneração de plantas a partir de qualquer órgão vegetal, sendo esta capacidade denominada de totipotência. A utilização deste modo de propagação permite a formação de clones, ou seja, indivíduos que possuem a mesma carga genética da planta-matriz, garantindo a manutenção das características agronômicas de interesse (HARTMANN et al, 2011).

Para o mamoeiro, diversas partes das plantas podem ser utilizadas como fonte de explantes na micropropagação, dependendo do sistema empregado: via direta (sem a formação de calo) ou indireta (com formação de calo, como por exemplo, na embriogenia somática), tais como ápices meristemáticos, ápices caulinares, folhas, frutos imaturos, plântulas recém-germinadas, ápices radiculares, segmentos nodais, etc. Tal como acontece com a micropropagação por via direta à maioria dos sucessos publicados mediante a regeneração a partir de calos, foi alcançada utilizando explantes de tecido juvenis. As espécies frutíferas tropicais são em geral, de difícil de cultivo *in vitro*. A cultura de tecidos de espécies recalcitrantes foi conseguida em muitos casos, valendo-se de embriões imaturos ou explantes de plântulas muito jovens, pois estas representam muitas vezes o tecido mais regenerativo em uma planta (DREW, 1997).

Schildt & Amaral (2002), em estudos avaliando a contaminação e a reação morfogênica *In vitro* de explantes de mamoeiro 'Improved Sunrise Solo Line 72/12', obtiveram maior taxa de reação em explantes de plantas jovens de mamoeiro em relação a plantas adultas.

A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* está associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica na planta-matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Os teores endógenos de hormônios, promotores ou inibidores, variam conforme as idades fisiológica e cronológica dos tecidos (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Explantes da mesma natureza, retirados de plantas em diferentes condições fisiológicas, podem apresentar respostas morfogênicas bastante distintas (COSTA et

al., 2006). Desse modo, cada tecido de uma mesma planta pode apresentar diferentes condições fisiológicas e anatômicas e, portanto, diversas respostas morfogênicas, como também distintas exigências de substâncias reguladoras de crescimento. As diferenças resultantes da posição dos explantes nas plantas doadoras de propágulos são importantes não somente na capacidade de enraizamento, mas também na qualidade do sistema radicular formado, uma vez que variações nesse atributo podem causar indesejáveis problemas de variação intraclonal (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Quando a opção é utilizar um tecido já diferenciado, como folhas, por exemplo, deve-se dar preferência aos tecidos mais jovens. Segundo SOUSA et al. (2006<sub>a</sub>), a calogênese, que ocorre quando se utiliza tecidos mais velhos, pode provocar alterações irreversíveis nas células, comprometendo o processo de clonagem e provocando alterações somaclonais.

#### **2.1.4 – Desinfestação**

A contaminação fúngica e bacteriana limita o sucesso da micropropagação do mamoeiro. Isso porque a presença de altos níveis de nutrientes minerais, açúcares e outros nutrientes orgânicos, além da alta umidade relativa do ambiente de cultura, favorecem a ação de microrganismos (VIANNA et al., 1997; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; ZAIDAN, 2002). Além da contaminação superficial, que é constituída pelos mais diferentes tipos de bactérias e fungos, existem vários grupos de microrganismos endofíticos que estão presentes nos feixes vasculares, floema, xilema e espaços intercelulares das plantas (TEIXEIRA, 2010).

THOMAS et al. (2007), trabalhando com ramos apicais de mamoeiro ‘Surya’ em meio MS, detectaram contaminações endofíticas causadas bactérias gram positivas (dois gêneros) e gram negativas (seis gêneros).

Segundo Romeiro (2005), toda planta, potencialmente, abriga bactérias endofíticas mesmo em tecidos sadios. Provavelmente algumas bactérias endofitas são agentes de biocontrole de enfermidades ou promotores de crescimento, ainda que a maioria deles não exiba qualquer efeito detectável e alguns sejam nocivos. Entretanto, para

Sousa et al. (2006<sub>a</sub>), na micropropagação de plantas, as contaminações bacterianas são realmente mais drásticas e trazem consequências como perda de tempo e de recursos financeiros ou genéticos, pela eliminação de frascos contaminados, bem como riscos de distribuição de plantas contaminadas.

Os tratamentos de desinfestação devem ser feitos para eliminar os microrganismos contaminantes, notadamente bactérias e fungos e, também, ácaros e tripses. Grattapaglia & Machado (1998) e Viana et al. (1997) aconselham a adição de componentes como o detergente Tween e o pré-tratamento com álcool para facilitar a penetração de hipoclorito de sódio em pequenas cavidades da superfície das plantas. Imediatamente após o processo de desinfestação, os explantes devem ser enxaguados para que não haja comprometimento dos tecidos.

Alguns estudos preliminares revelam que os descontaminantes como o álcool e o hipoclorito de sódio agem superficialmente, não controlando satisfatoriamente a contaminação endofítica. Segundo Thomas et al. (2007), o antibiótico rifampicina é indicado no controle de bactérias gram-positivas e gram negativas, sendo considerado eficiente no controle e eliminação da contaminação endofítica em cultura de tecidos de várias plantas.

Vianna et al. (1997) utilizaram o antibiótico rifampicina, em meio de cultura ou em imersão por 24 horas sob agitação, e obtiveram 70% de descontaminação para ambos os tratamentos em explantes de plantas adultas de mamoeiro, e concluiu que a rifampicina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) é eficiente no controle da contaminação bacteriana de explantes de mamoeiro cv. Tainung 01.

Lima & Moraes (2006) constataram sintomas de toxidez em explantes de bananeiras Musa AAA cv Caipira, devido à utilização do antibiótico rifampicina no meio de cultura. Porém, não foram constatados os mesmos efeitos quando os explantes permaneceram em agitação na solução por 24 horas e inoculados em meio isento do antibiótico.

### 2.1.5 – Meios de cultura

Os meios nutritivos, utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas, fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

Diferentes formulações de meios são empregadas no cultivo *in vitro* de explantes de mamoeiro, sendo as formulações como MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e MT (MURASHIGE & TUCKER, 1969) as mais comumente utilizadas por pesquisadores. No entanto, como as exigências de plantas são comuns, essas formulações contêm os mesmos macro e micro nutrientes da solução 2 de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) ou solução de Hoagland modificada, que contém nitrogênio na forma de amônia e nitrato para melhor controle do pH. Os meios de cultura podem conter:

**a) – Água:** É o componente de maior quantidade utilizado nos meios de cultura. A água deve ser destilada e deionizada ou bi-destilada para uso nos meios, pois as impurezas nela contidas podem afetar o crescimento de tecidos *in vitro*.

**b) – Nutrientes:**

– **Macronutrientes** – N, P, K, Ca, Mg, S: são os elementos minerais exigidos em maiores quantidades para o crescimento de plantas inteiras. São incluídos nos meios nutritivos na forma de sais inorgânicos, podendo o nitrogênio e o enxofre serem adicionados também como componentes de suplementos orgânicos (aminoácidos por exemplo).

– **Micronutrientes** – Fe, Mn, Zn, B, Cu, Cl, Mo, Co, I: incluem todos aqueles elementos minerais aceitos atualmente como essenciais para plantas clorofiladas, além do cobalto e do iodo que em alguns casos estimulam o crescimento de explantes *in vitro*.

**c) – Substâncias reguladoras do pH** – São utilizadas em concentrações variáveis durante o ajuste do pH do meio de cultura. O pH do meio deve ser adequado para a manutenção da integridade celular. Afeta a disponibilidade dos nutrientes e substâncias reguladoras de crescimento, bem como as propriedades do ágar como gelificante, restringindo sua faixa de uso em 5,0 a 6,5. Em meios gelificados, o pH

deve ser ajustado para 5,7, com KOH ou NaOH e HCl (0,5N-1N), pois em pH 5,0 ocorre hidrólise de polissacarídeos, enquanto em pH 6,0 a 6,2 verifica-se a precipitação de sais (PASQUAL, 2001<sub>a</sub>).

**d) – Carboidratos** – As células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro* não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO<sub>2</sub> e, às vezes, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese que sustente o crescimento. A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, sendo que esse açúcar suporta as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies.

Bhojwani & Razdan (1983) verificaram que a diferenciação em tecidos vasculares em vitroplantas é afetada pela presença de auxinas e sacarose. De acordo com os mesmos autores, o efeito da auxina na diferenciação de tecidos vasculares está relacionado com a presença de sacarose. A concentração de sacarose mais utilizada na micropropagação é a de 3%.

Para o mamoeiro, Saker et al. (1999) obtiveram também melhor resultado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de multiplicação. Já para a indução e maturação de embriões somáticos, Suksa-Ard et al. (1998), em estudos com diferentes concentrações de sacarose (30, 60 e 90 g L<sup>-1</sup>) na indução de calos e embriões somáticos, em explantes de hipocótilos de plântulas de mamoeiro ‘Sunrise Solo’, constataram que a concentração de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose foi a mais efetiva. Segundo os mesmos autores, o estresse osmótico provocado por essa concentração de sacarose promove a síntese de ácido abscísico endógeno, que é considerado efetivo para a embriogênese somática.

**e) – Vitaminas e aminoácidos** – Para algumas espécies cultivadas *in vitro*, há necessidade de aumentar a concentração de vitaminas, sendo às vezes, preciso acrescentar outros tipos à mistura padrão [Tiamina (vitamina B1), ácido nicotínico (niacina), piridoxina (vitamina B6), glicina (aminoácido)]. É o caso de cultura de tecidos somáticos de *Citrus*, neste caso, são utilizadas as vitaminas: ácido fólico, riboflavina, biotina e ácido ascórbico (CALDAS et al., 1998).

Os primeiros estudos com cultura de raízes definiram a mistura básica de vitaminas utilizadas até hoje. Essa mistura consiste de tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), ácido nicotínico (niacina), piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>) e glicina (VASCONCELOS et al., 2010).

Além das vitaminas, vários outros compostos orgânicos podem ser adicionados ao meio de inoculação, a exemplo da água de coco e dos estratos de malte e levedura, misturas de composição indefinida que podem suprir necessidades nutricionais específicas de determinados aminoácidos e vitaminas no desenvolvimento inicial do explante. No preparo da solução estoque de mistura orgânica MS, a tiamina e a piridoxina são diluídas em algumas gotas de HCl antes de serem adicionadas à solução. As quantidades de vitaminas usada na solução MS cinquenta vezes concentrada são: tiamina – HCl - 0,005 g L<sup>-1</sup>; piridoxina – HCl - 0,025 g L<sup>-1</sup>; ácido nicotínico - 0,025 g L<sup>-1</sup>; glicina - 0,100 g L<sup>-1</sup>; mio-inositol - 5,0 g L<sup>-1</sup> (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

Outra substância utilizada nos meios de cultura para a micropropagação é o sulfato de adenina, considerada uma citocinina fraca, apresenta resultados favoráveis na formação de partes aéreas mais vigorosas. Schmildt (2006) e Schmildt et al. (2007<sub>b</sub>) obtiveram melhor padrão de desenvolvimento dos ramos micropropagados do mamoeiro em meio de multiplicação, contendo 30 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina durante quatro subcultivos. Segundo Manica (2006), no mamoeiro, para a obtenção de ramos com melhor desenvolvimento *in vitro*, pode-se utilizar também a concentração de 160 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina no último subcultivo.

**f) – Mio-inositol** – Está envolvido na síntese de paredes celulares em células cultivadas e em protoplastos. A concentração mais utilizada de mio-inositol nos meios é de 100 mg L<sup>-1</sup>.

### **g) – Reguladores de crescimento vegetais**

#### **Auxinas x citocininas**

A composição e concentração de reguladores de crescimento no meio são os fatores mais críticos e determinantes do crescimento e padrão de desenvolvimento

na maioria dos sistemas de cultura de tecidos. As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais empregados na cultura de tecidos (CALDAS et al., 1998; COSTA et al., 2006).

O balanço nutricional e hormonal do meio depende de vários fatores, da fase do cultivo e da demanda de cada espécie, não existindo um receituário que possa ser utilizado em larga escala para diferentes espécies e tecidos. O balanço entre auxinas e citocininas determina o desenvolvimento da planta nas diversas fases. Normalmente, para a produção de gemas e múltiplos brotos utiliza-se um balanço rico em citocinina, enquanto para o enraizamento, doses maiores de auxinas são mais indicadas. Já para o alongamento, faz-se a adição de giberelinas (SOUSA et al., 2006<sub>a</sub>).

As citocininas são substâncias reguladoras de crescimento envolvidas, principalmente na divisão, crescimento e diferenciação de células. Entretanto, concentrações elevadas de citocinina podem incrementar a atuação da citocinina-oxidase, impedindo a atuação da citocinina sobre a divisão celular e, conseqüentemente, a indução de brotações. Dessa forma, o efeito tóxico caracteriza-se, principalmente pelo baixo número de brotações, entufamento demasiado e falta de alongamento das culturas, redução do tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, o que leva a sérios problemas na fase de enraizamento (SANTOS-SEREJO et al., 2006). Além do aspecto da toxidez, o excesso de citocinina pode resultar no surgimento de um número muito elevado de gemas adventícias, o que pode ser indesejável do ponto de vista da integridade clonal, pois podem ocorrer variações somaclonais (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; SANTOS-SEREJO et al., 2006).

As auxinas, na maioria dos casos, são dispensadas ou utilizadas em concentrações muito baixas na fase de multiplicação, pois tendem a estimular a produção de calos (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

Para o mamoeiro, na literatura, são encontradas diversas combinações de citocininas e auxinas no meio de estabelecimento e multiplicação das culturas. Alguns autores utilizam o mesmo meio de cultura para o estabelecimento e a

multiplicação, como MS com 0,50 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,10 mg L<sup>-1</sup> de ANA para ambas as fases, prática apropriada para empresas comerciais de micropropagação (MANICA, 2006).

Sousa et al. (2006<sub>a</sub>) ressaltam que a existência de um protocolo básico para determinada espécie não significa que possa ser aplicado para todas as cultivares, necessitando, na maioria das vezes, pesquisas para definição de processos de otimização, à medida que novos materiais de interesse surgem.

### **Ácido giberélico**

Quando as brotações apresentam um desenvolvimento insatisfatório, torna-se necessário promover um alongamento antes do enraizamento. O ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) é utilizado nos meios de cultura, para promover o alongamento dos brotos (MANICA, 2006). O GA<sub>3</sub> tem seu efeito mais pronunciado em espécies anãs ou que exibem a forma de crescimento em roseta, bem como membros da família das gramíneas (TAIZ & ZAIGER, 2013).

O GA<sub>3</sub> deve ser dissolvido em água, pH ajustado para 5,7 com uma base (NaOH ou KOH 1N) e esterilizado por microfiltração dispondo-se filtros especiais de acetato de celulose tipo Millipore<sup>®</sup>, com poros de 0,2 µ, e adicionados ao meio já autoclavado quando este apresentar uma temperatura entre 40 e 45°C (SANTOS-SEREJO et al., 2006). Segundo CARVALHO & VIDAL (2003), o GA<sub>3</sub> perde 90% de sua atividade ao ser esterilizado junto ao meio de cultura na autoclave. Entretanto, alguns pesquisadores não descreveram perdas significativas de atividade, necessitando-se assim, de pesquisas mais aprofundadas (PASQUAL, 2001<sub>a</sub>).

### **Ácido abscísico**

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio que tem sido utilizado, nos meios de cultura, para aumentar o desenvolvimento de embriões somáticos de várias espécies, e aumentar a frequência de embriões somáticos formados e evitando a germinação precoce destes (GUERRA et al., 1998).

Suksa-Ard et al. (1998), em estudos com diferentes concentrações de sacarose (30, 60 e 90 g L<sup>-1</sup>) na indução de calos e embriões somáticos, em explantes de hipocótilos de plântulas de mamoeiro 'Sunrise Solo', constataram que a

concentração de  $60 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose foi a mais efetiva na indução e maturação de embriões somáticos. Segundo os mesmos autores, o estresse osmótico provocado por essa concentração de sacarose promove a síntese de ácido absísico endógeno que é considerado efetivo para a embriogênese somática.

### **Etileno**

O etileno é um regulador de crescimento em forma gasosa, produzido por células vegetais, até mesmo, por células *in vitro*. Esse composto pode influir no padrão de desenvolvimento das culturas, mas sua síntese, ou melhor, a sua presença nas culturas é, normalmente, regulada mais pelo tipo de fechamento ou vedação feito nos frascos de cultura do que pela composição do meio (CALDAS et al., 1998).

A síntese do etileno é estimulada por vários fatores, incluindo o estágio de desenvolvimento, condições (ambientais) de cultura, outros hormônios vegetais e lesões físicas e químicas. O etileno causa nas plantas uma resposta tríplice caracterizada pela senescência precoce, engrossamento do caule, alteração na curvatura das plantas (epinastia), abscisão foliar e inibição do crescimento (TAIZ & ZAIGER 2013).

Segundo Silva et al. (2007), para reduzir o acúmulo de etileno em frascos de culturas micropropagadas de mamoeiro, que provoca senescência das vitroplantas, diversas estratégias têm sido testadas por diversos pesquisadores, como provocar o arejamento nos frascos e a inclusão do etileno supressor aminoetoxivinilglicina (AVG)  $1,2 \text{ m}\mu$  ou do etileno antagonista tiosulfato de prata (STS)  $0,3 \text{ m}\mu$ .

**h) – Carvão ativado** – É utilizado na concentração de  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  para estimular o enraizamento, restaurar a capacidade embriogênica em culturas velhas de cenoura e diminuir a intoxicação de culturas por substâncias fenólicas exsudadas de tecidos de culturas (CALDAS et al., 1998).

**i) – Antibióticos** – Os tratamentos de desinfestação devem ser feitos para eliminar os microrganismos contaminantes, notadamente bactérias e fungos, e também aqueles ocasionados por ácaros e trípes, sendo estes últimos mais fáceis de serem controlados (SOUSA et al., 2006<sub>a</sub>).

A ocorrência de contaminação microbiana, proveniente, muitas vezes, de infecções sistêmicas em plantas matrizes, é comum em algumas espécies, sendo muitas vezes necessário, o uso de antibióticos e fungicidas no meio de cultura (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

Entre as principais fontes de contaminação dos tecidos cultivados *in vitro* estão os microrganismos endofíticos e os fastidiosos, patogênicos ou não, que estão protegidos dos agentes assépticos superficiais. Devido a eles, a desinfestação superficial dos explantes no início do estabelecimento, muitas vezes, é ineficiente, principalmente pela não eliminação dos microrganismos endofíticos por essa via (CAMARA et al., 2010).

Para o mamoeiro, Viana (1997), utilizando o antibiótico rifampicina, em meio de cultura ou em imersão por 24 horas sob agitação, obteve 70% de descontaminação para ambos os tratamentos em explantes de plantas adultas de mamoeiro, concluindo que a rifampicina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) é indicada no controle de bactérias gram-positivas e gram-negativas, e eficiente no controle e eliminação de contaminações endofíticas em culturas de mamoeiro cv Tainung 01.

Para Silva et al. (2007) é eficiente o controle de contaminações endofíticas do mamoeiro com a imersão em uma solução de antibiótico contendo  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de cloranfenicol e estreptomicina  $100 \text{ mg L}^{-1}$  com agitação contínua num agitador orbital durante 24 horas, três lavagens com água destilada estéril e incubação em meio de cultura sem a presença de antibiótico.

**j) – Ágar e semelhantes** – Os meios sólidos ou semi-sólidos, tradicionalmente, são solidificados com ágar (polissacarídeo extraído de algas marinhas). A concentração de ágar usada varia de 0,6 a 1% o qual é dissolvido em água fervente sendo responsável pela consistência do meio que depende a sua concentração (VASCONCELOS et al., 2010).

A preferência por um ou outro agente de solidificação depende da espécie de planta e das condições de cultivo. Uma das diferenças entre agentes de solidificação está no grau de impurezas de cada um, dependendo da marca e do grau de pureza (CALDAS et al., 1998).

## 2.2 – FATORES QUE INTERFEREM NO ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO DAS VITROPLANTAS

O enraizamento adventício de estacas é um processo peculiar e complexo. Está associado a estresse por dano mecânico, mudanças nas relações de água na planta e perda de influências correlativas devido à separação da parte aérea do sistema radicular original. Este processo é regulado pela interação de múltiplos fatores como fitormônios, carboidratos, compostos fenólicos, estado fisiológico da planta-matriz e características genéticas (HAISSIG, 1982; SMART et al., 2003).

A rizogênese ocorre de uma a três semanas e pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento de raízes (TAIZ & ZAIGER, 2013). Enquanto as duas primeiras fases (às vezes considerada uma só) respondem ou dependem da auxina, o crescimento das raízes é inibido pela presença de auxina. A dificuldade do sistema de micropropagação está em determinar uma condição *in vitro* na qual todas essas fases possam ocorrer normalmente e, de preferência, sem demandar manipulação adicional de uma fase para outra (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Para a obtenção de mudas micropropagadas de mamoeiro, a rizogênese é um dos maiores entraves (YU et al., 2001; AGNIHOTRI et al., 2004; SCHMILDT et al., 2010). Os maiores obstáculos ao conhecimento adequado dos fenômenos envolvidos no processo de formação de raízes adventícias e estabelecimento da planta residem na dificuldade de isolar e caracterizar os fatores que controlam estes fenômenos em virtude da sua complexidade e da grande interação existente entre eles (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Para induzir à formação de raízes adventícias, a parte aérea, quase sempre, necessita de auxina exógena (SANTOS-SEREJO et al., 2006). Existem várias substâncias sintéticas que têm atividade semelhante ao ácido indolilacético (AIA) que é a auxina endógena, como por exemplo, o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) e o ácido indolbutírico (AIB) (CASTRO & VIEIRA, 2001).

Para o enraizamento de ramos de mamoeiro, o regulador de crescimento vegetal mais utilizado é o AIB devido às suas características de boa estabilidade, maior espectro de ação e menor foto-oxidação (CRUZ et al., 2008).

A influência de outros fatores, localizados e translocáveis na estaca, tanto promotores quanto inibidores do enraizamento, tem sido comprovada, bem como a existência de compostos sinérgicos da auxina, que se supõe formarem com esta um complexo cofator/auxina mais ativo. Fatores externos, de natureza física e química também apresentam pronunciada influência, estimulando ou inibindo o enraizamento (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

O enraizamento é uma etapa que pode ser realizada em dois sistemas: *in vitro* ou *ex vitro*, correspondentes ao estágio III de micropropagação de Murashige (1974). No primeiro sistema, as raízes são regeneradas em condições assépticas e transplantadas para o substrato. A opção por um dos sistemas depende da qualidade da parte aérea obtida na multiplicação, da espécie, do genótipo e disponibilidade de infraestrutura (casa de vegetação) (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Segundo Schmildt et al. (1997), o enraizamento *in vitro* de ramos de mamoeiro é difícil, porque, na maioria das vezes, há dificuldade para se alcançar índices de enraizamento satisfatório e as raízes formadas podem ser grandes e desproporcionais ao tamanho dos ramos. Além disso, elas podem apresentar geotropismo negativo e desconexão com o sistema vascular dos ramos, resultando, com isso, alta mortalidade de plantas durante o processo de aclimatização. Por conseguinte, o enraizamento *ex vitro* é mais recomendado, sobretudo em substratos porosos, onde as plantas produzem maior número de raízes secundárias, possibilitando maior suprimento de água e nutrientes. Uma alternativa para o enraizamento é a indução *in vitro* e o enraizamento *ex vitro*, que consiste no subcultivo em meio de cultura suplementado com auxina e transplante das partes aéreas para o substrato antes do aparecimento das raízes (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Para a utilização comercial, o sistema de micropropagação deve possibilitar altas taxas de proliferação, enraizamento, aclimatização, sobrevivência e crescimento inicial das mudas em casa de vegetação (MACIEL et al., 2002).

### 2.2.1 – Fatores relacionados à planta matriz

Na escolha da planta matriz, de onde serão retirados os brotos para servirem com fonte de explantes ou serem submetidos ao enraizamento por estaquia ou enxertia, deve ser considerado a sanidade e a idade fisiológica da planta (SOUSA et al., 2006<sub>a</sub>).

Schmidt & Amaral (2002), em estudos avaliando a contaminação e a reação morfogênica *in vitro* de explantes de mamoeiro ‘Tainung 01’ obtiveram maior taxa de reação morfogênica em explantes de plantas jovens de mamoeiro em relação a plantas adultas.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), pode ocorrer variabilidade na resposta, não somente entre espécies do mesmo gênero, mas também entre genótipos da mesma espécie (diferentes cultivares ou clones).

Ferreira et al. (2011) investigaram a existência de variabilidade entre clones de mamoeiro ‘Tainung 01’ quanto ao padrão de enraizamento *in vitro*. Para o experimento, foram obtidas em casa de vegetação 50 plantas da geração F<sub>2</sub> de mamoeiros ‘Tainung 01’, que após oito semanas tiveram seus ápices removidos e estabelecidos *in vitro* em meio de cultura. Para o enraizamento, foram utilizadas estacas de 10 clones que apresentaram a melhor taxa de multiplicação, padronizadas em tamanhos de  $1,5 \pm 0,2$  cm e inoculados em meio MS acrescido de  $1,86 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, mantidos em sala de cultivo por 30 dias sob 16 horas de fotoperíodo e temperatura de  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ . Os autores observaram diferenças no padrão de enraizamento dos diferentes clones e sugerem que clones com maior percentual de enraizamento devem ser investigados.

### 2.2.2 – Fatores relacionados ao explante

A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* está associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica na planta-matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Os teores

endógenos de hormônios, promotores ou inibidores, variam conforme as idades fisiológica e cronológica dos tecidos (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Explantos da mesma natureza retiradas de plantas em diferentes condições fisiológicas podem apresentar respostas morfogênicas bastante distintas (COSTA et al., 2006). Desse modo, cada tecido de uma mesma planta pode apresentar diferentes condições fisiológicas e anatômicas e, portanto, diversas respostas morfogênicas, como também distintas exigências de substâncias reguladoras de crescimento (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

As diferenças resultantes da posição dos explantes nas plantas doadoras de propágulos são importantes não somente na capacidade de enraizamento, mas também na qualidade do sistema radicular formado, uma vez que variações neste atributo podem causar indesejáveis problemas de variação intraclonal (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Em mamoeiro 'Tainung 02', Katho & Ooishi (2003) observaram que estacas retiradas até o quinto nó apresentaram acima de 85% de enraizamento, mas as brotações retiradas acima do 17º nó não enraizaram.

### **2.2.3 – Fatores relacionados ao meio nutritivo**

O meio nutritivo na fase de multiplicação possui uma grande influência na fase seguinte, do enraizamento. Concentrações elevadas de BAP no meio de cultura podem levar a um acúmulo desse regulador vegetal e, assim prejudicar o enraizamento posterior das brotações (DUTRA & WENDLING, 2010).

Com relação à presença de inibidores endógenos, o etileno é um regulador de crescimento em forma gasosa, produzido por células vegetais, até mesmo, por células *in vitro*. Esse composto pode influir no padrão de desenvolvimento das culturas, mas sua síntese, ou melhor, a sua presença nas culturas é, normalmente, regulada mais pelo tipo de fechamento ou vedação feito nos frascos de cultura do que pela composição do meio (CALDAS et al., 1998).

Qualquer tipo de lesão pode induzir a biossíntese de etileno, assim como estresse fisiológico provocado por inundação, resfriamento, moléstias, temperatura ou estresse hídrico (TAIZ & ZAIGER, 2013).

A acumulação de etileno nos frascos de culturas de mamão tende para causar um aumento na senescência. A utilização de frascos maiores e a inclusão de etileno supressor aminoetoxivilglicina (AVG) 1,2  $\mu\text{M}$  ou etileno antagonista tiosulfato de prata (STS) 0,3  $\mu\text{M}$  têm sido pesquisadas para contornar o problema, assim como o enraizamento foto-autotrófico com arejamento (SILVA et al., 2007).

Em busca de alternativas para reduzir os custos da micropropagação e melhorar a qualidade fisiológica das plantas produzidas, aumentando a sobrevivência durante o período de aclimação, destaca-se o desenvolvimento da micropropagação fotoautotrófica. Esse processo consiste na produção de micropropágulos em meio de cultivo sem a adição de sacarose no meio de cultura e sob condições ambientais que promovam a fotossíntese na planta com o uso da luz natural (BRONDANI et al., 2007).

## **2.2.4 – Fatores ligados ao meio nutritivo de enraizamento**

### **2.2.4.1 – Substâncias reguladoras de crescimento**

O controle do desenvolvimento de raízes adventícias é influenciado por substâncias reguladoras de crescimento. Dentre estas, algumas promovem o enraizamento, e outras o inibem. Para todas há uma concentração ótima que pode variar tanto entre espécies, quanto entre populações ou clones (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Para induzir a formação de raízes adventícias, a citocinina é geralmente omitida e a auxina adicionada ao meio de cultura é, geralmente, indispensável para o enraizamento. As partes aéreas provenientes da multiplicação necessitam de auxina exógena para estimular a formação e desenvolvimento de raízes. O tipo de auxina e a concentração utilizada influenciam a resposta à rizogênese (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

A aplicação de fitorreguladores é importante para o aumento da velocidade de formação de raízes, aumento no número e qualidade das raízes formadas, bem como maior uniformidade de enraizamento, sendo que estes podem ser aplicados via líquida ou via pó (WENDLING & DUTRA, 2010).

Segundo Castro & Vieira (2001), o ácido indolbutírico (AIB), tem sido usado para provocar e acelerar o enraizamento de estacas na propagação vegetativa de numerosas espécies vegetais devido à sua capacidade de promover a formação de primórdios radiculares. A auxina pode ser misturada com um material inerte, como o caulim em pó, submergir a base das estacas por poucos segundos em solução alcoólica concentrada ou solução aquosa diluída do regulador de crescimento.

Quando a concentração de auxina no meio de enraizamento está acima do ótimo, ocorre a formação de calo na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

Segundo George et al. (2008), considera-se como enraizamento ótimo, a presença de pelo menos quatro raízes por planta, com 1 cm de comprimento. Brotos com raízes muito curtas ou com menor número de raízes não se desenvolvem bem e por fim deterioram.

Schildt (1994), trabalhando com o cultivar 'Tainung 01', não observou a necessidade do emprego de dois meios sequenciais para o enraizamento, todavia, ficou evidente que com a exposição dos ramos à auxina, por um período mínimo de cinco dias, e posterior cultivo de ramos *ex vitro* após indução *in vitro*, permitiu obter 50% de mudas enraizadas e aclimatadas.

Em estacas lenhosas onde estão presentes xilema e floema secundário, as raízes originam-se, geralmente, do tecido jovem do floema secundário, mas também podem originar-se dos raios vasculares, câmbio, ou dos calos produzidos na base das estacas (HARTMANN et al., 2011).

Para mamoeiro, existem na literatura muitos trabalhos utilizando diversas formas de aplicação, tipos de reguladores, concentrações e tempos de permanência, como exemplo, pode-se citar:

Litz & Conover (1981), que obtiveram enraizamento *in vitro* de brotos de mamoeiro com a concentração de 0.93 mg L<sup>-1</sup> de ANA no meio de cultura.

Schmidt et al. (1997), que trabalhando com 'Formosa', obtiveram 50% de enraizamento e 100% de aclimatização, quando os ramos foram induzidos *in vitro* em meio MS com 0,2 mg L<sup>-1</sup> de AIB e enraizamento *ex vitro* em tubetes com vermiculita.

Saker et al. (1999), que obtiveram 75% de enraizamento *in vitro* em brotos de mamoeiro micropropagados, utilizando 2 mg L<sup>-1</sup> de AIB adicionado ao meio de cultura, os mesmos autores evidenciaram que com 3 mg L<sup>-1</sup> de AIB diminuiu o enraizamento e ocorreu formação de calo.

Yu et al. (2001), que estabeleceram um protocolo em que brotos micropropagados de mamoeiro foram cultivados por uma semana no escuro, utilizando o meio MS suplementado com 5,081 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

Saha et al. (2003), avaliaram o enraizamento de plântulas micropropagadas de mamoeiro do cultivar 'Coorg Honeydew', que após seis semanas de subcultivo, tiveram os brotos excisados e a base imersa em solução alcoólica a 50% com AIB, variando de 500 a 3000 mg L<sup>-1</sup>. Obtiveram o máximo de sobrevivência (64,3%), quando utilizaram a concentração de 2500 mg L<sup>-1</sup> de AIB e em seguida introduzidos em vasos contendo terra, vermiculita e musgo na proporção 1:1:1 de volume da mistura.

Em trabalhos com tempo de indução no enraizamento de brotos micropropagados de plantas adultas de mamoeiro, Agnihotri et al. (2004) obtiveram 95% de enraizamento, quando as microestacas (com 4 cm) foram inoculadas em meio de cultura com 10 mg L<sup>-1</sup> de AIB por um período de 24 horas, sendo que com 12 horas a indução foi menos eficaz e com 36 horas ocorreu a formação de calo.

Tetsushi et al. (2008) avaliaram dois tempos de indução de brotos micropropagados de mamoeiro, imergiram a base das miniestacas em solução alcoólica a 50% contendo 20,32 mg L<sup>-1</sup> de AIB durante 5 segundos e com o regulador adicionado ao meio de cultura a 20,32 mg L<sup>-1</sup> de AIB por 10 dias, obtiveram maior sobrevivência das plântulas com 20,32 mg L<sup>-1</sup> de AIB adicionado ao meio de cultura a por 10 dias.

Cruz et al. (2008), trabalhando com enraizamento de microestacas de plantas transgênicas de mamoeiro da cultivar 'Maradol rojo', obtiveram o enraizamento *in vitro* utilizando 2 mg L<sup>-1</sup> de AIB no meio de cultura por 20 dias e melhor enraizamento *ex vitro* com a imersão da base das microestacas em uma solução contendo 5 mg L<sup>-1</sup> de AIB por 24 horas.

Schmidt et al. (2009) avaliaram diferentes tempos de permanência de ápices caulinares de mamoeiro 'Tainung 01' em meios de indução e regeneração, obtiveram melhor padrão de ramos enraizados em meio de indução contendo 2 mg L<sup>-1</sup> de AIB por um período de 15 a 16 dias, seguido de cultivo em meio desprovido de AIB.

Schmidt et al. (2010) evidenciaram que níveis de AIB acima de 3 mg L<sup>-1</sup> favorecem a formação de raízes provenientes de calo, o que evidentemente não é interessante no processo de clonagem, pois estas raízes não possuem conexão com o sistema vascular dos ramos.

Ferreira et al. (2011), trabalhando com clones de 'Tainung 01' na geração F<sub>2</sub>, verificaram resposta diferenciada entre clones.

#### **2.2.4.2 – Sacarose**

Durante o enraizamento, a fotossíntese realizada pelos explantes é relativamente baixa e, como a rizogênese é um processo que implica em gasto energético, a disponibilidade de uma fonte de energia é indispensável (SANTOS-SEREJO et al., 2006). Essa necessidade tende a ser maior quando se utiliza partes aéreas estioladas, uma vez que o estiolamento não permite um adequado acúmulo de carboidratos (ASSIS & TEIXEIRA, 1998). A concentração de sacarose é geralmente mantida nos mesmos níveis do meio de multiplicação (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

Bhojwani & Razdan (1983) verificaram que a diferenciação em tecidos vasculares em vitroplantas é afetada pela presença de auxinas e sacarose. De acordo com os

mesmos autores, o efeito da auxina na diferenciação de tecidos vasculares está relacionado com a presença de sacarose.

Agnihotri et al. (2004) reduziram a concentração de sacarose na fase de enraizamento para 2% com a finalidade de favorecer a conversão dos brotos, obtidos através da micropropagação, de plantas adultas de mamoeiro ao desenvolvimento fotoautotrófico.

Segundo Schmidt et al. (2007a), concentrações de sacarose no meio de cultivo entre 15 e 30 g L<sup>-1</sup> promovem um melhor enraizamento *in vitro* de explantes de mamoeiro 'Tainung 01'.

#### **2.2.4.3 – Nutrientes minerais**

O fornecimento de nutrientes no enraizamento é quase sempre necessário. Embora haja uma redistribuição de nutrientes endógenos, transportados dos ramos para a base das estacas, o transporte de N, P, K, Mg, Ca e B no floema não é muito eficiente, sobretudo tratando-se de Ca e B (ASSIS & TEIXEIRA, 1998). Alguns desses nutrientes com resposta favorável ao enraizamento são citados a seguir.

Dentre os nutrientes minerais, o Boro exerce funções importantes relacionadas à estrutura da parede celular e com as substâncias pécticas associadas a ela, especialmente a lamela média (EPSTEIN & BLOOM, 2006). Segundo Assis & Teixeira (1998), o boro tem sido muitas vezes considerado mais importante no crescimento de raízes do que no enraizamento, mas em algumas espécies, reage sinergicamente com as auxinas, aumentando a porcentagem de enraizamento, o número de raízes por estaca e comprimento de raízes.

O cálcio é essencial para a integridade da membrana plasmática das células vegetais, especificamente para a seletividade do transporte de íons que elas realizam, além de interligar as cadeias pécticas, como o boro, contribuindo conseqüentemente para a sua estabilidade afetando as propriedades mecânicas do gel péctico (EPSTEIN & BLOOM, 2006).

O aumento de níveis endógenos de AIA (ácido indolilacético) pode ser favorecido pelo zinco, por meio de seu efeito no aumento da produção de triptofano (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Em termos práticos o fornecimento de todos os nutrientes, em substrato desprovido de nutrientes (espuma fenólica, vermiculita) em forma de solução nutritiva, como a solução MS, por exemplo, é mais vantajoso, pois os brotos obtidos por micropropagação não possuem raízes, e quando as possuem não são completamente funcionais, requerendo assim, as plântulas, níveis adequados de nutrientes para o enraizamento e crescimento das partes aéreas.

#### **2.2.4.4 – Luz**

Embora a fotossíntese forneça os carboidratos necessários para a indução e o crescimento de raízes, a manutenção das brotações no escuro durante a fase indutiva é geralmente favorável para o enraizamento (PASQUAL, 2001<sub>b</sub>). Segundo Assis & Teixeira (1998), a alta luminosidade propicia maior produção, transporte e acúmulo de auxinas e carboidratos. Entretanto, estas permanecem nos pontos de crescimento, estando pouco disponíveis na região de formação de raízes. Há também, nesse caso, maior produção de ácido abscísico (ABA) e substâncias fenólicas inibidoras do enraizamento.

No crescimento e desenvolvimento de plantas, a luz influi na regulação da morfogênese e atua como fonte de energia para a realização de fotossíntese. De maneira geral, pouca luz é necessária na fase indutiva do processo de rizogênese, no entanto, após esse período, a luz é importante para o crescimento das partes aéreas e alongamento das raízes, além de dotar a planta de maior resistência ao transplântio (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Yu et al. (2001) induziram a formação *in vitro* de raízes adventícias em brotos micropropagados de mamoeiro com a permanência dos brotos por uma semana no escuro em meio suplementado com 2,5 µM de AIB.

Segundo Zaidan (2002), ensaios com mamoeiro têm demonstrado que o enraizamento das plantas é favorecido pela adição de carvão ativado ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) e exclusão da luz na parte inferior do tubo de ensaio, pela aplicação de tinta preta na superfície externa inferior, melhorou a iniciação do enraizamento dos brotos.

Schmidt et al. (2012) concluíram que o enraizamento dos ramos de mamoeiro 'Tainung 01' não é influenciado pela exposição ou não ao escuro, aconselhando, por termos práticos cultivar os ramos sob a escuro/luz.

#### **2.2.4.5 – Oxigênio**

Segundo Pasqual (2001<sub>b</sub>), o oxigênio é requerido para o enraizamento. Especialmente no caso do enraizamento *in vitro* em meio solidificado com ágar, no qual a restrição da difusão irá causar uma pressão parcial do oxigênio. Pode haver limitação da disponibilidade desse elemento, a menos que se trabalhe com um meio líquido agitado ou material poroso molhado com líquido (vermiculita, areia, etc.). Em geral, o enraizamento em ágar não proporciona a formação de pelos radiculares, o que pode desfavorecer a sobrevivência dos explantes durante a aclimatização. Segundo Maciel et al. (2002), em substratos porosos, a planta produz maior número de raízes secundárias, possibilitando maior suprimento de água e nutrientes para as plantas.

Alterações na composição do meio de cultura e no intercâmbio dos gases entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro* fazem parte do conceito de micropropagação fotoautotrófica. Inúmeras vantagens são atribuídas a esse sistema são citadas por (DULTRA & WENDLING, 2010), entre elas: Promoção do crescimento e fotossíntese; Altas porcentagens de sobrevivência; Eliminação de desordens morfológicas e fisiológicas; Menor perda devido à contaminação; Automação do processo e; Simplificação do processo de micropropagação.

#### 2.2.4.6 – Substratos

A composição do substrato pode ser muito variável, mas deve apresentar como principais características: baixa densidade, boa retenção de umidade e boa aeração. Para tanto, podem ser feitas misturas de diferentes ingredientes, tais como: vermiculita, turfa, esterco, casca de arroz carbonizada, pó de fibra de coco e compostos orgânicos diversos. Há também disponibilidade de substratos comerciais, produzidos por empresas do ramo que podem ser usados com resultados satisfatórios (SOUSA et al., 2006<sub>b</sub>).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), existe grande interesse em aliar a vantagem operacional dos sistemas de produção de mudas em “plugs”, ou seja, substrato na forma de pequenos sólidos cilíndricos ou cúbicos, onde as microestacas são introduzidas. Estes sólidos, constituídos de materiais biodegradáveis, são embebidos em soluções nutritivas. Dessa maneira, a planta é aclimatada e transplantada no lugar definitivo sem qualquer injúria no sistema radicular, porém, o enraizamento nesse sistema varia muito com a espécie, desde o fácil enraizamento e crescimento radicular até a inibição completa.

Para substratos preparados pelo próprio agricultor, Sousa et al. (2006<sub>b</sub>) recomendam o uso de temperaturas elevadas para o seu tratamento. Atualmente, já existe tecnologia disponível para tratamento do substrato via aquecimento solar, conhecida como solarização, de fácil acesso e custo viável.

Por suas características físico-químicas diferenciadas, o substrato pode afetar a formação e a produção de mudas, com vantagens ou desvantagens em função da espécie frutífera com a qual se está trabalhando, tornando necessário definir para cada espécie o melhor substrato, ou mescla a ser usada (RISTOW et al., 2012).

Outra possibilidade na aclimação de plantas oriundas de cultura de tecidos é a inoculação de micorrizas em substratos. A micorriza constitui-se numa simbiose praticamente universal, entre fungos micorrizicos arbusculares (FMAs) e espécies vegetais, tanto pelo grande número de plantas susceptíveis à associação simbiótica micorrízica como pela ocorrência generalizada na maioria dos habitats. Entretanto, vários fatores afetam o resultado da associação entre FMAs e plantas, dentre os

mais significativos estão o tipo de fertilidade do substrato, a intensidade luminosa, a umidade e a aeração (SOUSA et al., 2006<sub>b</sub>).

A natureza física e química do substrato afeta a capacidade de enraizamento do mamoeiro consideravelmente. Suksa-Ard et al. (1998) avaliaram a porcentagem de enraizamento *in vitro* de ramos micropropagados de mamoeiro e obtiveram altas taxas de enraizamento em amido (96%), seguida de ágar (76%), e lã-de-rocha (76%). Taxas menores foram observadas com vermiculita (56%) e goma gelan (8%).

Yu et al. (2001) estabeleceram um protocolo em que brotos micropropagados de mamoeiro foram cultivados por uma semana na escuridão, utilizando o meio MS suplementado com 2,5  $\mu\text{M}$  de AIB seguido por duas semanas em frascos gaseificadas em meio MS $\frac{1}{2}$ . As plântulas foram aclimatizadas em vermiculita e ágar com e sem aeração. As taxas de sobrevivência foram de 94,5% para vermiculita com aeração, 87,8% para vermiculita sem aeração, 42,2% em ágar com aeração, e 35,6% em ágar sem aeração.

Tetssush et al. (2008) promoveram o enraizamento de brotos micropropagados de mamoeiro em meio líquido utilizando espuma fenólica para a fixação do brotos, após a indução por 24 horas em meio de cultura contendo 20,32 mg L<sup>-1</sup> de AIB, conseguiram 85% de enraizamento e 80% de plantas aclimatadas.

#### **2.2.4.7 – Temperatura**

A temperatura tem importante função regulatória no metabolismo das estacas, sendo que as flutuações de temperatura são altamente desfavoráveis para o processo de formação de raízes adventícias (Bertoloti e Gonçalves, 1980). Segundo Hartmann et al. (2011), o ideal seria induzir o enraizamento em um meio artificial, em que a temperatura do substrato seja um pouco superior à do ar. Analisando por outro lado, os autores citam que em baixas temperaturas, a respiração é reduzida, o que permite um melhor acúmulo dos produtos obtidos por meio da fotossíntese. Este acúmulo pode otimizar o desenvolvimento das raízes.

Segundo Manica (2006), a temperatura de 30°C na base do substrato favoreceu o enraizamento de ramos de mamoeiro, em condições de nebulização intermitente, na África do Sul.

### 2.3 – ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS

A aclimatização pode ser considerada a fase final da micropropagação e sua importância pode significar a limitação de todo o processo de multiplicação *in vitro* de plantas. Numa escala comercial, o alto custo e o tempo, que a planta leva para se adaptar à nova condição, podem tornar a técnica da micropropagação inviável. A adaptação das plantas, produzidas *in vitro*, às novas condições *ex vitro* deve ser gradual e cercada de cuidados especiais, de maneira a reduzir os estresses que podem culminar com a sua morte dessas plantas (SOUSA, et al., 2006<sub>b</sub>).

Segundo Costa (1998), no estágio de aclimatização, os ramos sofrem uma mudança drástica quando são removidas dos frascos onde a luz e as trocas gasosas são limitadas e existe grande disponibilidade de açúcar. Essa passagem faz com que passem de heterotróficas para autotróficas, com grande gasto de energia.

Uma série de deficiências anatômicas, induzidas pela condição *in vitro*, dificulta o controle da transpiração e ocasionam rápida perda de água que ocorre após a transferência do meio *in vitro* para o *ex vitro*, que pode provocar estresse hídrico e desidratação das plântulas (SOUSA et al., 2006<sub>b</sub>). Dentre essas, podemos citar: formação deficiente de cera epicuticular e problemas na funcionalidade do mecanismo de fechamento estomático, maior densidade estomática, estômatos mais superficiais na epiderme da folha, presença de hidatódios, reduzida diferenciação do mesófilo das folhas e alta proporção de espaços intercelulares (DUTRA & WENDLING, 2010).

De acordo com Costa (1998), fase de aclimatização é muito delicada, não só porque representa um estresse para a plântula, mas, também, pelo risco de infecções por fungos e bactérias que podem se desenvolver neste estágio.

Segundo Pasqual (2001<sub>a</sub>), algumas técnicas podem ser utilizadas com a finalidade de tornar as brotações mais resistentes ao estresse ambiental, de modo que possam enraizar sem problemas. Dentre estas técnicas, podemos citar:

a) endurecimento *in vitro*, que é conseguido com a redução do potencial hídrico do meio e redução da umidade no frasco de cultura.

b) aumento da intensidade luminosa durante o crescimento e o endurecimento na sala de crescimento ou, segundo Sousa et al. (2006<sub>b</sub>), a utilização de sistemas de iluminação natural;

c) Uso de reguladores de crescimento;

d) redução ou eliminação da sacarose para estimular o desenvolvimento autotrófico.

Segundo Sousa et al. (2006<sub>b</sub>), a utilização de micorrizas em substratos para aclimatização de plantas oriundas de culturas de tecidos tem sido relatada por vários autores. Entretanto, vários fatores afetam o resultado da associação entre os fungos micorrizicos arbusculares e as plantas, e dentre os mais significativos estão o tipo e fertilidade do substrato, a intensidade luminosa, umidade e aeração.

Agnihotri et al. (2004) obtiveram 80% de sucesso no transplante de plântulas micropropagadas de mamoeiro para substrato composto por terra e vermiculita 1:1 de volume. Os vasos foram colocados na sala de cultivo por dez dias, sem a adição de vitaminas e nem sacarose para permitir o desenvolvimento autotrófico, mas sem a interferência de fatores sazonais, após esse período foram retirados os tampões de algodão. Os mesmos autores afirmam que a prevenção da dessecação durante os sete primeiros dias de crescimento *ex vitro* foi crucial para a sobrevivência das plantas.

Segundo Pasqual (2001<sub>a</sub>), o enraizamento *ex vitro* ou *in vivo* de brotações micropropagadas é uma técnica que vem ganhando espaço pelas vantagens que proporciona. Estima-se que a mão de obra envolvida em enraizar brotações individuais *in vitro* faz com que esses estágios de micropropagação respondam por 35 a 75% do custo total de plantas propagadas por cultura de tecidos, dependendo da espécie.

O enraizamento e aclimatização *in vitro* e *ex vitro* de mamoeiro foi testada por diversos autores (REUVENI & SCHLESINGER, 1990; TEO & CHAN, 1994; SCMILDT et al, 1997), mas estritas condições de enraizamento, como, fatores sazonais, e tipo de explante afetam o sucesso do enraizamento (SILVA et al., 2007).

Agentes biológicos também podem ser adicionados ao substrato de transplântio do mamoeiro. Cruz et al. (2008) obtiveram incrementos na sobrevivência de plântulas, micropropagadas de mamoeiro transgênico do cultivar 'Maradol rojo' com a prévia inoculação no substrato do fungo *Trichoderma harzianum*.

Finalmente, vale destacar que as pesquisas referentes ao comportamento das plantas *in vitro*, assim como um melhor conhecimento da fotossíntese, relações hídricas, atividades enzimáticas e nutrição mineral, têm auxiliado bastante nos procedimentos de aclimatização. É importante desenvolver mecanismos de pré-aclimatização da planta ainda sob condições *in vitro*, por meio de controle dos principais fatores que interferem na sobrevivência das plantas (SOUSA et al., 2006<sub>b</sub>).

#### **2.4 – MINIESTAQUIA**

A miniestaquia é uma técnica recente que vem sendo utilizada com sucesso no processo de propagação clonal em *Eucalyptus*, que surgiu do aprimoramento da estaquia para contornar as dificuldades de enraizamento de alguns clones (LIMA et al., 2009). Atualmente, constitui-se na principal técnica de propagação clonal de *Eucalyptus* utilizadas pelas empresas do setor florestal (OLIVEIRA et al., 2012).

Consiste na formação de um minijardim clonal que pode ser localizado em tubetes, vasos, sistema semi-hidropônico (canaletão) ou em bandejas no viveiro, o que possibilita o melhor controle hídrico, nutricional e fitossanitário, entre outros. A coleta de miniestacas no minijardim clonal é realizada de forma seletiva, em períodos a serem definidos conforme o vigor das brotações, colhendo-se todas aquelas que tenham no mínimo 3 cm de comprimento (WENDLING & DUTRA, 2010).

Os resultados obtidos com a miniestaquia têm apontado diversas vantagens em relação à estaquia convencional na produção de mudas de *Eucalyptus*, como a

redução da área necessária para a formação do minijardim clonal, redução dos custos com transporte e coleta das brotações, maior eficiência das atividades de manejo, além de proporcionar maior porcentual de enraizamento, qualidade do sistema radicular e velocidade de emissão das raízes (LIMA et al., 2009).

O rápido desenvolvimento e a necessidade de sua reprodução imediata fizeram com que diversos trabalhos fossem realizados, com as mais diversas espécies vegetais, no sentido de se estudar as técnicas de propagação vegetativa. Nesse contexto, pesquisas vêm sendo desenvolvidas, com a utilização da técnica da miniestaquia, entre elas, podemos citar: Corticeira-do-mato (CUNHA et al., 2008), Erva-mate (BRONDANI et al., 2007; WENDLING et al., 2008), espinheira-santa (LIMA et al., 2009), maracujá (MELETTI et al., 2002).

Em relação à estaquia convencional, a miniestaquia apresenta várias vantagens como: dispensa o jardim clonal no campo, maior facilidade de controle de patógenos, maior produtividade, maior produção de propágulos por unidade de área e em menor tempo, necessidade de menores concentrações de reguladores de crescimento vegetal e, em alguns casos até a sua supressão, melhor qualidade do sistema radicular e redução do tempo de formação da muda (WENDLING & DUTRA, 2008).

#### **2.4.1 – Miniestaquia em sistema hidropônico**

A hidroponia é a ciência de cultivar plantas sem solo, onde as raízes recebem uma solução balanceada que contém água e todos os nutrientes essenciais ao desenvolvimento da planta (LUZ et al., 2011).

Bons resultados para várias culturas estão sendo obtidos com o cultivo hidropônico, dentre estes, destacam-se espécies florestais, ornamentais, frutíferas, fumo e também com grande viabilidade na produção de batata-semente pré-básica, além da produção de hortaliças de folhas e frutos (SOUSA et al., 2013).

Devido a maior sensibilidade das miniestacas às condições ambientais, a miniestaquia em sistemas hidropônicos e semi-hidropônicos vem sendo testada,

com bons resultados, em várias culturas, como por exemplo: corticeira-do-mato (*Erythrina falcate* Benth.) (CUNHA et al., 2008); maracujá (MELETTI et al., 2002).

Segundo Meletti et. al. (2002), com o método convencional de estaquia em areia não foi possível obter o enraizamento de estacas de maracujazeiro com uma ou duas gemas, porque elas secavam muito rapidamente, antes mesmo de enraizar. Isso só foi conseguido com a técnica de hidroponia em espuma fenólica.

Como vantagem, as soluções nutritivas oferecem grande flexibilidade. As concentrações de nutrientes e gás ao redor das raízes podem ser monitoradas e manipuladas quase em tempo real. Contaminantes potenciais podem usualmente ser reduzidos a níveis não detectáveis. Antibióticos podem ser adicionados para controlar atividades microbianas. Pequenas quantidades de compostos específicos, como herbicidas ou hormônios vegetais, podem ser distribuídas efetivamente na superfície da raiz. Pode se transferir plantas em um tempo preciso e dano mínimo, de uma solução para outra com diferentes composições químicas ou isotópicas (EPISTEIN & BLOOM, 2006).

### 3 – REFERÊNCIAS

AGNIHOTRI, S. SINGH, S. K.; JAIN, M. SHARMA, M.; SHARMA, A. K.; CHATURVEDI, H. C. *In vitro* cloning of male *Carica papaya* through tips of shoots and inflorescences, **Indian Journal of Biotechnology**, v.3, n.2, p.235-240, 2004.

ALLAN, P. Papaws grow from cuttings, **Farming South African**, v.35, n.2, p.35-40, 1964.

ALLAN, P. Propagation of “Honey gold” papayas by cutting. In GOMES, J. A. (ED). **International Symposium on Tropical Fruits**. Acta Horticulturae, 370, 1995. <CD ROOM>

ANANDAN, R.; THIRUGNANAKUMAR, S.; SUDHAKAR, D.; BALASUBRAMANIAN, P. *In vitro* organogenesis and plantlet regeneration of (*Carica papaya* L.). **Journal of Agricultural Technology**, v.7, n.5, p.1339-1348, 2011. Disponível em: <<http://www.ijat-aatsea.com>>. Acesso em 12 de jan. 2013.

ANDREANI JUNIOR, R. **Caracterização do sexo do mamoeiro (*Carica papaya* L.) através de marcadores moleculares e de microscopia eletrônica de varredura.** 1998, 65 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós Graduação em Agronomia, UNESP, Jaboticabal. 1998.

ARANGO, L. V., REZENDE, C. R., CARVALHO, S. P. Identificação antecipada do sexo do mamoeiro pelos caracteres físicos das sementes e padrões isoenzimáticos das mudas. **Revista Corpoica** – Ciencia y Tecnología Agropecuária, v.9 n.1, p.22-29, 2008.

ASSIS, T. F. de; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformações genéticas das plantas.** Brasília: Embrapa, 1998. p.261-296.

BARROS, E. L. de S.; SCHMILDT, E. P.; AMARAL, J. A. T. do; COELHO, R. I. Influência da poda em diferentes alturas no mamoeiro 'Golden'. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.40, n.4, p.596-601, 2009.

BENASSI, A. C.; CATTANEO, L. F. **Informes sobre a produção de mamão: agrodúvidas.** <agroduvidasufersa.webnode.com.br/.../...8 jul. 2011 – Antônio Carlos Benassi<sup>1</sup> e Laercio Francisco Cattaneo<sup>2</sup> ... Democrática do Congo, Tailândia, Guatemala, e Colômbia. >. Acesso 02 de fevereiro de 2012.

BERTOLOTI, G.; GONÇALVES, A. N. **Enraizamento de estacas:** especificações técnicas para construção do modelo de propagação. Circular técnica, Piracicaba: IPEF, 1980, 8p.

BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture: theory and practice.** New York: Elsevier Publishing, 1983. 501p.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; SANTIN, D.; BENEDETTI, E. L.; ROVEDA, L. F.; ORRUTEA, A. G. Ambiente de enraizamento e substratos na miniestaquia de erva-mate, **Scientia Agrária.** Curitiba, v.8, n.3, p.257-267, 2007.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** v.1, Brasília: EMBRAPA, 1998. p.87-131.

CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C. de. Microrganismos assintomáticos do cultivo *in vitro*: natureza e riscos para o cultivo de plantas. In SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (ED) **Contaminações microbianas na cultura de**

**células tecidos e órgãos das plantas.** Cap. 5, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p.221-260.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais.** 1 ed., n.116, Campina Grande: EMBRAPA, 2003. 40p.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores de crescimento vegetais na agricultura tropical.** Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. 132p.

COSTA, M. A. P. de C.; SOUSA, A. da S.; ALMEIDA, W. A. B. de. Morfogênese *in vitro*. In SOUSA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (ED) **Introdução a micropropagação.** Cap. 6, Cruz das Almas: EMBRAPA, 2006. p.115-130.

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. **A cultura do mamoeiro: Tecnologias de produção.** Vitória: Incaper, 2003. p.59-102.

COSTA, A. M. M. Fisiologia da aclimação. In TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais.** n.174, Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p.63-67.

COUTO, F.A.D.A. Produção de mudas de mamoeiro e maracujazeiro. v.9, n.102, **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte: EPAMIG, p.15-18, 1983.

CRUZ, M.; DARIAS, A. L.; CARRERA, D.; PERES, A.; CRUZ-MARTINS; M.; PICHARDO, T.; KOSKY, R. G.; PORTAL, O. Enraizamiento y aclimatización de plantas transgênicas de papaya var. 'Maradol roja'. **Biotecnologia Vegetal**, Cuba, v.8, n.1, p.35-41, 2008.

CUNHA, A. C. M. C. M. da; WENDLING, I.; SOUSA JUNIOR, L. Miniestaquia em sistema de hidroponia e em tubetes de corticeira do mato. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.18, n.1, p.85-92, 2008.

DANTAS, J. L. L.; DANTAS, A. C. V. L.; LIMA, J. F. de. Mamoeiro. In BRUCKNER, C. H. (ED). **Melhoramento de fruteiras tropicais.** 1 ed., Cap. 11, Viçosa: Editora UFV., p.309-349.

DREW, R. A. The application of biotechnology to the conservation and improvement of tropical and subtropical fruits species. **Seed and plant genetic resources service.** Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, November, 1997.

[http://www.fao.org/fileadmin /templates/agphome/ documents/ PGR/PubPGR/drew1.htm](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/PGR/PubPGR/drew1.htm) < acesso em 12 de novembro de 2012 >.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I. Micropropagação e microestaquia de eucalipto. In WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de eucalipto**. Cap. 3, Colombo – PR: EMBRAPA, 2010. p.83-120.

EPSTAIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2 ed., Londrina: Editora Planta. 2006. 86p.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations: essential documents, statistics, maps and multimedia resources**. [www.fao.org/](http://www.fao.org/) - 18k - <acesso 21 janeiro 2014>.

FERREIRA, J. P.; SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O.; NASCIMENTO, A. L. Enraizamento *in vitro* de clones de mamoeiro 'Tainung 01' **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.42, n.2, p.563-566, 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture: volume 1, the background**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. 501p.

GIAMPAN, J. S.; CERQUEIRA, T. S.; JACOMINO, A. P.; RESENDE, J. A. M.; SASAKI, F. F. Indução de brotos laterais de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27 n.1, p.185-187, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformações genéticas das plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. p.183-260.

HAISSIG, B. E. Carbohydrate and amino acid concentrations during adventitious root primordium development in *Pinus banksiana* (Lam.) cuttings. **Forest Science**, v.28, n.4, p.813-821. 1982.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1998. 928p., 2011.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soils. **Circular**, 347, Berkeley, California Agricultural Experimental Station, 32p., 1950.

IBGE. A:\Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, 16.htm. www.ibge.com.br <acesso 21 de janeiro de 2014>

KATOH, F., OOISHI, A., A Study on Juvenility and Nodal Aging of Papaya by Vegetative Propagation, **Journal Japanese Society Horticulture Science**, Japan, v.72, n.2, p.93-98, 2003.

LIMA, D. M. De; TANNO, G. N.; PURCINO, M.; ZANETTE, F. Enraizamento de miniestacas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek) em diferentes substratos. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.2, p.617-623, 2009.

LIMA, D. J.; MORAES, W. da S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Unesp, São Paulo, v.36, n.3, p.181-186, 2006.

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

LOPES, J. C.; COELHO, R. I.; BREGONCI, I. dos s.; MACEDO, C. M. P. MAIA, L. R. Brotas de mamoeiro 'Tainung 01' submetido a diferentes alturas de corte do caule, **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.2, p.360-365, 2008.

LUZ, J. M. Q.; COSTA, C. C., GUERRA, G. M. P.; SILVA, M. A. D. da; HABER, L. L. Efeito da variação da solução nutritiva no cultivo hidropônico de rúcula, **Revista Verde**, Mossoró – RN, Brasil, v.6, n.3, p.76-82, 2011.

MACIEL, S. da C.; VOLTOLINI, J. A.; PEDROTTI, E. L. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização da porta-enxerto de macieira marubakaido micropropagada. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.24, n.2, p.289-292, 2002.

MANDAL, L.; SAHU, P.; MANNADE, A. K.; KATARA, J. L. Improvement of papaya production using genetic engineering: a revolution. **Global Journal of Bio-science and Biotechnology**. Society for science and nature (SFSN), v.3, n.1, p.122-123. 2014

MANICA, I. Cultivares e melhoramento. In MANICA, I.; MARTINS, D. dos S.; VENTURA, J. A. **Mamão: Tecnologia de produção pós-colheita, exportação, mercados**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2006. p.49-82.

MELETTI, L. M. M.; FURLANI, P. R.; ÁLVARES, V.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L. C.; AZEVEDO FILHO, J. A. Novas Tecnologias Melhoram a Produção de Mudanças de Maracujá. **O Agrônomo**, Campinas, v.54, n.1, p.31-33.. 2002.

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 bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture, **International Citrus Symposium**, Proceedings, Riverside: University of California, v.3, n.1, p.1155-1169, 1969.

OLIVEIRA, L. S. de; XAVIER, A.; DIAS, P. C.; CORREA, A. C. G.; BORGES, S. R.; TAKAHASHI, E. K.; PAIVA, H. N. de. Enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* X *E. globulus*. **Scientia Florestalia**, Piracicaba, v.40, n.96, p.507-516, 2012.

ONO, E. O.; GRANA Jr, J. F.; RODRIGUES, J. V. Reguladores vegetais na quebra da dominância apical de mamoeiro (*Carica papaya* L.), **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.348-350, 2004.

PASQUAL, M. Meios de cultura. **Curso de Pós-Graduação “lato sensu” (especialização) a distância cultura de tecidos vegetais: Tecnologia e aplicações**. Lavras: UFLA, 2001<sub>a</sub>.

PASQUAL, M. Introdução: fundamentos básicos. **Curso de Pós-Graduação “lato sensu” (especialização) a distância cultura de tecidos vegetais: Tecnologia e aplicações**. Lavras: UFLA, 2001<sub>b</sub>.

PIZA, I. M. de T.; PINHO, R. S. Série: capítulo 7 – **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em mandioca**. V.18. Capítulo 8. Protocolo de micropropagação da mandioca... [http://www.aban.com.br/livroscargil/volume 2.htm](http://www.aban.com.br/livroscargil/volume%202.htm). <acesso 9 de junho de 2012>.

REUVENI, O.; SHLESINGER, D. R.; LAVI, U. *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. **Plants Cell Tissue and Organ Culture**, Israel, v.20, p.6-41, 1990.

RISTOW, N. C.; ANTUNES, L. E. C.; CARPENEDO, S. Substratos para o enraizamento de microestacas de Mirtileiro cultivar “georgiagem”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.1, p.262-264, 2012.

ROMEIRO, R. da S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2 ed, Viçosa: UFV, 2005. 417p.

RUGGIERO, C.; DURIGAN, J. F.; GOES, A. de; NATALE, W.; BENASSI, A. C., Panorama da cultura do mamão no Brasil e no mundo: situação atual e tendências, in MARTINS, D. dos S., **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória: Incaper, p.13-34, 2003.

SAHA, M.; BHOT, M.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. *In vitro* propagation of *Carica papaya* L. var. ‘Coorg Honeydew’ from nodal explants. **Asian Journal Microbial Biotech Environment**. v.5, n.3, p.331-332, .2003.

SAKER, M. M; BEKEET, S. A; TAHA, H. S; REDA, A. A. ***In vitro* propagation of papaya (*Carica papaya* L.)**. Plant cell and tissue culture department, National Research Centre, Dokki, Cairo Eggpt. 1999. Disponível em: <http://www.acgssr.org/BioTechnology/V2N2December1999/fullpaper/p22.pdf>. < acesso em 12 de outubro de 2013>.

SANTOS-SEREJO, J. A. dos; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. da. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In SOUSA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (ED). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cap. 7, Cruz das Almas: EMBRAPA, 2006. p.79-98.

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.; AMARAL, J. A. T. do; SHMILDT, O.; COELHO, R. I.; RABELO, W. S.; MARTINS FILHO, S. Níveis de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro ‘Tainung 01’, **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.32, n.1, p.125-129, 2010.

SCHMILDT, E. R. **Enraizamento “*in vitro*” e “*ex vitro*” de ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 1994. 84 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia - Viçosa: UFV, 1994.

SCHMILDT, E. R.; TEIXEIRA, S. L.; CRUZ, C. D.; COUTO, F. A. D’A.; LANI, E. R. G. Enraizamento de ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) obtidos por cultivo *in vitro* de ápices caulinares, **Revista Ceres**, Viçosa: UFV, v.44, n.253, p.339-345, 1997.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T. do.; COELHO, R. I.; RABELO, W. S.; MARTINS FILHO, S. Resposta rizogênica *in vitro* de ápices caulinares de mamoeiro 'Tainung 01' em diferentes tempos de permanência em meios de indução e regeneração. **Acta Scientiarum Agronomy**. v.31, n.4, p.603-700, 2009.

SCHMILDT, O. **Multiplicação *in vitro* de mamoeiro 'tainung 01'**. 2006. 46f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal – CCA-UFES, Alegre, 2006.

SCHMILDT, O. SILVA, C. A. de; FERREGUETE, G. A.; SCHMILDT, E. R.; CZEPAK, M. P. Correlação canônica entre caracteres vegetativos e da capacidade de brotações em mamoeiro. **Enciclopédia Biosfera**, Centro científico conhecer, Goiânia, v.7, n.13, p. 255-262. 2011.

SCHMILDT, O.; SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T. do; MARTINS FILHO, S. Multiplicação de ramos de mamoeiro 'Tainung 01' em diferentes níveis de sulfato de adenina. In MARTINS, D. dos S.; COSTA, A. N. ca; COSTA, A. de F. S. da. **Papaya Brasil**. Cap. 20, Vitória: Incaper, 2007. p. 290-292.

SCHMILDT, O. **Cultivo *in vitro* e estaquia dos mamoeiros 'Golden' e 'UENF/CALIMAN 01'**. 2010. 119 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, 2010.

SCHMILDT, O.; SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T. de, Enraizamento *in vitro* de ramos de mamoeiro 'Tainung 01' cultivados sob luz e escuro/luz. **Nucleus**, v.9, n.2, p.263-268, 2012.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O. Sacarose na fase de enraizamento *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'. **Scientia Agraria**, v.8, n.1, p.25-30, 2007a.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O. Sulfato de adenina na multiplicação *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'. **Scientia Agraria**, v.8, n.1, p.25-30, 2007b.

SILVA, J. A. da; RASHID, Z.; NHUT, D. T.; SIVAKUMAR, D.; GERA, A.; SOUSA JUNIOR, M. T.; TENNANT, P. F. **Papaya (*Carica papaya* L.) biology and biotechnology**. Global Science Books, 2007. <acesso em 10 de outubro de 2012>.

SMART, D. R.; KOCSIS, L.; WALKER, M.A.; STOCKERT, C. Dormant buds and adventitious root formation by *Vitis* and other woody plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.21, p.296-314, 2003.

SOUSA, M. F. de; SOUSA, T. F. de; MARTINS, M. O.; PEREIRA, E. de O.; COELHO, R. I. Brotasões e vigor dos brotos de mamoeiro 'Tainung 01' em função da altura de poda e aplicação de reguladores vegetais. **XV encontro Latino-americano de iniciação científica e XI Encontro Latino-americano de Pós-Graduação**, Universidade do Vale do Paraíba, 2011.

SOUSA, A. da S.; COSTA, M. A. P. de; SILVA NETO, H. P. da. Aclimatização. In SOUSA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (ED). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cap. 7, Cruz das Almas: EMBRAPA, 2006 b. p.131-140.

SOUSA, F. V. D. S.; JUNGHANS, T. G.; SOUSA, A. da S.; SANTOS-SEREJO, J. A dos; COSTA, M. A. P. de C. Micropropagação. In SOUSA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (ED). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cap. 2, Cruz das Almas: EMBRAPA, 2006 a. p.38-52.

SOUSA, A. das G.; FAQUIN, V.; CHANFUN, N. N. SOUSA, A. A. Produção de mudas de Tangerina 'Ponkan' em sistema hidropônico. **Revista Ciência Agrônômica**, v.44, n.4, p. 902-909, 2013.

SUKSA-ARD, P.; KATAOKA, I.; BEPPU, K.; FUJIME, Y.; SUBHADRBANDHU, S. Root development of tissue-cultured papaya shoots in several rooting substrates. **Environmental Control in Biology**, Bangkok, v.36, n.5, p.115-120, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013. 954p

TEIXEIRA, J. B.. contaminações microbianas em biorreatores. In SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (ED) **Contaminações microbianas na cultura de células tecidos e órgãos das plantas**. Cap. 9, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 393-406.

TEO, C. K.; Chan L.K. The effects of agar content, nutrient concentration, genotype and light intensity on the *in vitro* rooting of papaya microcuttings, **Journal of Horticultural Science**. v.69, p.267 - 273, 1994.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; REIS, G. G. dos. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v.27, n.1, p.1-7, 2003.

TETSUSHI, H.; SADAOKA, K.; MASAHIKO, Y.; HIROSHI, E. Mass production of papaya (*Carica papaya* L.). saplings using shoot. Tissue culture for commercial use. **South, Pacific Studies**, v.28, n.2, p.87-95, 2008.

THOMAS, P.; KUMARI, S. SWARNA, G. K.; GOWDA, T. K. S. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from *in vitro* cultures and hostendophyte interaction *in vitro* and *in vivo*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, p.380-390, 2007.

VASCONCELOS, A. G. V. de; DONATO, V. M. T. S.; BRITO, J. Z. de; LIRA, M. de A. Cultura de tecidos vegetais: técnicas utilizadas para a multiplicação de palma forrageira. In FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. de P.; SANTOS, C. E. de R. e S. **Biotecnologia aplicada a agricultura**: Textos de apoio e protocolos experimentais. Parte 5, Cap. 3, Brasília: EMBRAPA, 2010. p.653-657.

VIANNA, G. R.; COUTO, F. A. A.; OLIVEIRA, A. B.; ZAMBOLIM, L.; MARIA, J. A. rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. **Bragantia**, n.56, p.149-254, 1997.

ZAIDAN, H. A. **Micropropagação e uso de marcadores moleculares na determinação do sexo do mamoeiro**. Tese de Doutorado em Agronomia, Jaboticabal: UNESP, 2002. 154p.

YU, T.-A.; YEH, S.-D.; YANG J.-S. Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.42, Taiwan, Republic of China, p.281-286, 2001.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Produção de mudas de eucalipto por estaquia e miniestaquia. In WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de eucalipto**. Cap. 2, Colombo – PR: EMBRAPA, 2010. p.49-80.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Solução nutritiva para condução de minicepas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em sistema semi-hidropônico. **Circular Técnico 157**. Embrapa, Colombo – PR, 2008. 4p.

## 4 – TRABALHOS

#### 4. 1 – ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE MAMOEIRO HÍBRIDO UENF/CALIMAN 02 COM AIB EM SISTEMA SEMI-HIDROPÔNICO

##### RESUMO

A técnica da micropropagação em mamoeiro é uma alternativa para a multiplicação em larga escala de genótipos com características superiores, de plantas geneticamente modificadas e de híbridos comerciais. O domínio da propagação assexuada do mamoeiro pode proporcionar economia na implantação das lavouras, além de elevar a produtividade. Um dos grandes entraves para a micropropagação do mamoeiro está na promoção ao enraizamento. Para algumas espécies, o enraizamento de estacas depende da aplicação de reguladores vegetais. Em estudos com mamoeiro, o regulador vegetal mais utilizado tem sido o ácido indolbutírico (AIB). O enraizamento em material obtido por micropropagação pode ocorrer tanto *in vitro* quanto *ex vitro*. No enraizamento *in vitro* de ramos de mamoeiro, as raízes formadas podem ser grandes e desproporcionais ao tamanho dos ramos, apresentarem geotropismo negativo e desconexão com o sistema vascular dos ramos, resultando, com isso, em alta mortalidade de plantas durante o processo de aclimatização. No entanto, o enraizamento *ex vitro*, além produzir um sistema radicular mais completo, funcional e com maior número de raízes secundárias, proporciona redução de custos com mão de obra e infraestrutura, pois uma etapa do processo *in vitro* é eliminada gerando economia de energia e espaço na sala de crescimento. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito de níveis de AIB, com indução *in vitro* e *ex vitro* para o enraizamento *ex vitro* de microestacas de plantas hermafroditas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em sistema semi-hidropônico. O experimento foi instalado em um esquema fatorial 2 x 4, sendo dois sistema de indução (*in vitro* e *ex vitro*) e quatro níveis de AIB ( 00; 2,5; 5,0 e 7,5 mg L<sup>-1</sup>) num delineamento inteiramente ao acaso. A indução *in vitro* por 15 dias em meio de cultura com adição de AIB na concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> proporcionou 96.66% de enraizamento e sobrevivência das plantas.

**Palavras chaves:** *Carica papaya*; micropropagação; enraizamento *ex vitro*.

## ROOTING OF PAPAYA MICRO-STAKE CV. UENF/CALIMAN 02 WITH IBA IN THE SEMI-HYDROPONIC SYSTEM

### ABSTRACT

The use of micropropagation technique with papaya is an alternative to multiply in large scale the genotypes with superior characteristics, genetically modified plants, and commercial hybrids. The control of the asexual propagation of the papaya can provide savings in farming, besides increasing productivity. One of the great hindrances for the papaya micropropagation lies in stake rooting production. For some species, stake rooting depends on the isogenic application of vegetable regulators. In papaya studies the most often used vegetal regulator has been the indolebutyric acid (IBA). The rooting in the material obtained by micro-propagation can occur both *in vitro* and *ex vitro*. In the *in vitro* rooting of papaya branches, the roots can be big and disproportionate to branch sizes; they may present negative geotropism and disconnection of the vascular system of the branches, resulting in high plant mortality plants during the acclimation process. The *ex vitro* rooting, on the other hand, besides producing a radicular system that is more complete, functional, and with a great number of secondary roots, provides labor and infra-structure cost reduction, because a step in the *in vitro* process is eliminated, generating the saving of energy and space in the growth room. The objective of the research was to evaluate the effect of the IBA, with the *in vitro* and *ex vitro* application, in the *ex vitro* rooting of the papaya hybrid UENF/CALIMAN 02 microcutting, in the semi-hydroponic system. The experiment was set up in a randomized complete block design factorial 2 x 4, being two induction systems (*in vitro* and *ex vitro*) and for IBA levels (00; 2.5; 5.0 and 7.5 2.5 mg L<sup>-1</sup>) were installed. The *in vitro* induction of 15 days within the cultivation, with the addition of IBA in the concentration of 2.5 mg L<sup>-1</sup> provided 96.66 % of rooting and plant survival.

**KEY WORDS:** *Carica papaya*, micropropagation, *ex-vitro* rooting

#### 4.1.1 – Introdução

O mamão é considerado uma das frutas de maior importância econômica e nutritiva. Fonte de nutrientes com potássio e magnésio, antioxidantes como flavonoides, vitamina C e carotenoides, além de vitaminas do complexo B, ácido fólico pantotênico e fibras. O mamão é fonte, também, da enzima digestiva papaína, que é um ingrediente industrial (MANDAL et al., 2014).

O mamoeiro, *Carica papaya* L., é uma espécie tropical e tem como provável centro de origem a região compreendida entre o Norte da Bacia Amazônica Superior e a América Central. Devido à sua adaptabilidade e aos trabalhos de melhoramento genético, seu cultivo tem-se estendido também para regiões subtropicais (BENASSI & CATTANEO, 2011).

A produção global de mamão vem ganhando acréscimos, principalmente devido a aumentos na produção da Índia, que em 2011 produziu 4.180.075 toneladas da fruta, liderando a produção mundial de mamão. Em segundo lugar, o Brasil produziu 1.854.343 toneladas no mesmo período (FAO, 2014). Já em 2012, o Brasil produziu 1.517.696 toneladas, tendo como maiores produtores os estados da Bahia, com 683.474 toneladas e o Espírito Santo com 489.645 toneladas, em terceiro lugar, o Estado do Ceará produziu 86.414 toneladas da fruta no mesmo período (IBGE, 2014).

O cultivo comercial do mamoeiro explora, principalmente, plantas hermafroditas, uma vez que produzem os frutos mais aceitos pelos mercados interno e externo. Não existe nenhum caráter morfológico visual que possa ser usado para distinguir o sexo do mamoeiro, em plantas juvenis. Como não se conhece o sexo das plantas no início do plantio, os agricultores plantam pelo menos três mudas por cova e esperam de três a cinco meses para realizar a sexagem, o que aumenta os custos de produção, além de afetar o desenvolvimento das plantas hermafroditas em razão da competição (FERREIRA et al., 2011).

Segundo Anandan et al. (2011), a micropropagação do mamoeiro é um método eficiente para a multiplicação de genótipos obtidos por cruzamentos interespecíficos de mamoeiro, bem como mutantes geneticamente transformados, visando

principalmente a resistência ao vírus do mosaico. Plantas transgênicas como as obtidas nos trabalhos de Magdalita et al. (2008), com a inserção do gene da ACC oxidase via *Agrobacterium*, objetivando prolongar o período de maturação do fruto podem também ser multiplicadas por meio da técnica da micropropagação.

Nesse contexto, o desenvolvimento da técnica de micropropagação de explantes por meio da cultura de tecidos destaca-se como uma “ferramenta” de enorme utilidade na produção em larga escala de clones com características superiores, de sexos definidos e livres de viroses (VIANNA et al., 1997) e também de plantas obtidas por meio de cruzamentos incompatíveis e transgênicas (CRUZ et al., 2008).

Para a obtenção de mudas micropropagadas de mamoeiro, a rizogênese é um dos maiores entraves (YU et al., 2001; AGNIHOTRI et al., 2004; SCHMILDT et al., 2010). Os maiores obstáculos ao conhecimento adequado dos fenômenos envolvidos no processo de formação de raízes adventícias e estabelecimento da planta residem na dificuldade de isolar e caracterizar os fatores que controlam esses fenômenos em virtude da sua complexidade e da grande interação existente entre eles (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Para o enraizamento de ramos de mamoeiro, o regulador de crescimento vegetal mais utilizado é o ácido indolbutírico (AIB), devido às suas características de boa estabilidade, maior espectro de ação e menor foto-oxidação (CRUZ et al., 2008).

Segundo Schmidt et al. (1997) e George et al. (2008), o enraizamento *in vitro* de ramos de mamoeiro tem encontrado dificuldade para se alcançar índices de enraizamento satisfatório e as raízes formadas ainda podem ser grandes e desproporcionais ao tamanho dos ramos. Além disso, elas podem apresentar geotropismo negativo e desconexão com o sistema vascular dos ramos, resultando, com isso, alta mortalidade de plantas durante o processo de aclimatização.

O enraizamento *ex vitro* proporciona redução de custos de mão de obra e infraestrutura, pois uma etapa é eliminada e há economia de espaço na sala de crescimento, de energia elétrica e tende a produzir um sistema radicular mais completo e funcional e maior número de raízes secundárias (DUTRA & WENDILING, 2010).

O desenvolvimento de um sistema para enraizamento mais eficiente resulta em mudas com maior qualidade fisiológica e diminuição de perdas durante a fase de aclimatização (DAMIANI & SCHUCH, 2009).

Segundo Silva et al. (2007), a técnica da aclimatização em hidroponia promove aclimatização mais rápida e eleva a taxa de sobrevivência em mudas micropropagadas.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de níveis de AIB (ácido indolbutírico), com indução *in vitro* e *ex vitro*, no enraizamento de ramos micropropagados de plantas hermafroditas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em sistema semi-hidropônico.

#### **4.1.2 – Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecido e casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, sediado no Município de Alegre - ES. Para obtenção dos explantes, estabeleceu-se um minijardim clonal, com plantas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02, cultivadas em vasos plásticos contendo 25 litros de substrato composto por terra, areia e esterco bovino bem curtido, na proporção 3:1:1, respectivamente. No início da floração, realizou-se a sexagem para identificação e seleção das plantas hermafroditas. Feita a seleção, as plantas foram decapitadas a 1,50 m de altura a partir do colo, pulverizadas com fungicida à base de oxiclreto de cobre + mancozeb 2,5 g L<sup>-1</sup> no local de corte e aplicada uma solução contendo 300mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina) e 100 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (ácido giberélico) nos caules das plantas por três vezes em intervalos semanais. A primeira aplicação foi feita por pincelamento, as outras duas aplicações por meio de pulverização. Após 60 dias da primeira aplicação do regulador vegetal, foram selecionados e colhidos os brotos com 20 cm de comprimento com diâmetro entre 9 e 15 mm, sendo colocados imediatamente em sacolas plásticas e conduzidos ao laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo.

No Laboratório, os ápices dos brotos foram reduzidos a quatro centímetros comprimento e tiveram suas folhas removidas, deixando cerca de um centímetro do pecíolo de cada folha, e levados para uma câmara de fluxo laminar onde sofreram os seguintes processos de desinfestação: imersão em álcool 70% durante 60 segundos, hipoclorito de sódio a 1% durante 15 minutos, seguido de três lavagens em água destilada autoclavada. Posteriormente, foram transferidos para erlemayers contendo uma solução com antibiótico rifampicina na concentração de 300 mg L<sup>-1</sup>. Após sua vedação com parafilmes, os frascos foram fixados em um agitador de placa onde permaneceram sob agitação a 30 rpm por 24 horas.

Ao final do período sob agitação, os frascos com os explantes foram levados à câmara de fluxo laminar, onde, a solução com antibiótico foi trocada por hipoclorito de sódio a 0,6%, por 15 minutos, seguido de três lavagens em água deionizada autoclavada com base nos resultados obtidos por Oliveira (2008).

Após os tratamentos realizados visando eliminar a contaminação superficial e a endofítica os explantes, foram retirados dos frascos e postos sobre uma placa de Petri com papel filtro e, com o auxílio de uma pinça e um bisturi, foram reduzidos no seu comprimento a cerca de 0,4 a 0,6 cm e inoculados em frascos contendo meio de cultura.

Para o preparo da solução estoque dos nutrientes, em um frasco com capacidade para um litro, foram diluídos em água deionizada 75 g de nitrato de potássio, 40 g de sulfato de magnésio e 15 g de fosfato monoamônio, constituindo a solução A; em outro frasco, foram diluídos 40 g de nitrato de cálcio, constituindo a solução B; em outros frascos, a solução C de micronutrientes e a D de vitaminas, nas mesmas concentrações da formulação MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Para o preparo de cada litro de meio de cultura, foram adicionados 10 mL de cada solução, 30 g L de sacarose, 7 g de ágar, 0,5 mg de BAP e 0,1 mg de ANA. Após a fusão do ágar, o pH foi ajustado para 5,7 e cada frasco de cultivo recebeu 40 mL de meio de cultura e autoclavados a 120 atm por 20 minutos.

Os frascos, após a inoculação dos explantes, foram conduzidos à sala de cultivo, com temperatura de 28°C, permanecendo em prateleiras com duas lâmpadas

fluorescentes fornecendo  $22,8 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$  de fluxos de fótons fotossintéticos e 16 horas de fotoperíodo.

Para a produção de brotos, os explantes foram submetidos a quatro subcultivos de 20 dias cada, e repicados em tufos menores, sendo que os maiores brotos foram separados dos tufos, subcultivados e inoculados em meio com a concentração de BAP reduzida para  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA por mais dois subcultivos de 15 dias.

Para a instalação do experimento, após a fase de multiplicação, todos os brotos foram individualizados, sendo que, uma parte deles foi transferida para meios de cultura conforme a descrição anterior com regulador de crescimento AIB nas seguintes concentrações: 00; 2,5; 5,0 e  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ , de acordo com os tratamentos. A outra parte foi subcultivada em um meio de multiplicação contendo  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, por 15 dias, quando foram submetidos ao enraizamento em sistema semi-hidropônico.

As microestacas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente, mergulhadas por cinco minutos em solução com fungicida Ridomil® e transferidas para copos plásticos transparentes, perfurados no fundo, contendo 80 mL de vermiculita de textura média cada um. Após receberem as microestacas os copos foram cobertos por copos plásticos leitosos, simulando uma minicâmara-úmida.

Os copos foram então colocados dentro de bandejas plásticas contendo dois litros de solução nutritiva básica de acordo com Furlani (1999) a uma condutividade elétrica de  $1,8 \text{ dS m}^{-1}$  (Figura 1). Sendo colocados em cada bandeja 15 copos contendo dois brotos com 5 cm de comprimento e 5,5 a 7,5 mm de diâmetro, cada um.



**Figura 1** – Enraizamento *ex vitro* de microestacas de mamoeiro em sistema semi-hidropônico com AIB em indução *in vitro* e *ex vitro*.

Para os tratamentos com indução *ex vitro*, o AIB foi adicionado à solução nutritiva contida nas bandejas, nos mesmos níveis utilizados nos meios para os tratamentos com indução *in vitro*, mas somente durante a primeira semana, quando renovou-se a solução, porém sem o AIB.

O experimento foi instalado em um esquema fatorial 2x4 sendo: 2 ambientes (*in vitro* e *ex vitro*), quatro níveis de AIB (00; 2,5; 5,0 e 7,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB), num delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições e seis plantas por repetição.

As bandejas foram mantidas em casa de vegetação com cobertura plástica, sombrite 25% e aluminet<sup>®</sup>, para evitar a luz direta e manter apenas a luz difusa sobre os brotos. Como forma de reduzir a temperatura no interior da cobertura, foi ajustada uma irrigação, por aspersão, sobre a cobertura, para as horas mais quentes do dia. Semanalmente as bandejas eram lavadas para evitar a proliferação de algas e a solução trocada.

Após 15 dias, os copos leitosos foram removidos aos poucos, inicialmente nas horas mais frescas do dia, durante uma semana, até a remoção completa. Após 45 dias em cultivo semi-hidropônico, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos de 600 ml de volume com substrato composto por terra, areia e esterco bovino curtido na proporção 3:1:1, respectivamente, onde permaneceram por mais 30 dias sendo irrigadas por aspersão e recebendo adubações semanais com solução nutritiva básica segundo Furlani (1999).

As mudas clonais de plantas hermafroditas foram retiradas dos vasos (Figura 2) e tiveram suas raízes lavadas cuidadosamente sobre uma peneira, postas em sacolas plásticas identificadas segundo o tratamento e número da repetição e conduzidas ao laboratório para a realização das avaliações. Foram avaliados o comprimento da parte aérea, o comprimento da maior raiz, o diâmetro do colo, o peso da massa seca da parte aérea, o peso da massa seca da raiz e a porcentagem de sobrevivência das plantas obtidas. Os dados coletados foram avaliados no programa GENES (CRUZ et al., 2013).



**Figura 2** – Etapas da micropropagação do mamoeiro. a – Brotos de mamoeiro de plantas hermafroditas em casa de vegetação. b – Frascos de culturas micropropagadas de mamoeiro. c – Brotos micropropagados. d – Microestaca de mamoeiro. e – Enraizamento de microestacas de mamoeiro em sistema semi-hidropônico. f – Broto aclimatado. g – Transplântio para vasos. h – Brotos enraizados de mamoeiro.

### 4.1.3 – Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para as características avaliadas na micropropagação do mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 estão representados na Tabela 1.

A ausência dos resultados para os tratamentos com nível zero de AIB se deve ao fato de não ter ocorrido enraizamento das microestacas. Tal fato demonstra a necessidade da aplicação de auxina para rizogênese em microestacas de mamoeiro. Alguns pesquisadores (CRUZ et al., 2008; SHCMILDT et al., 2009; SCHMILDT et al., 2010), trabalhando com mamoeiro, observaram pouca formação de raízes em explante na ausência de aplicação de auxina, recomendando a utilização do AIB para estimular a iniciação radicular em mamoeiro.

Para a característica porcentagem de enraizamento (PER), verificou-se interação entre os fatores estudados. O melhor resultado (96,66%) foi registrado para o tratamento com indução *in vitro* para a concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB, valor muito superior ao percentual de 70% sugerido por Hartmann et al. (2011), como valor mínimo para emprego da estaquia na multiplicação comercial de plantas. No sistema de indução *in vitro* com 5,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB, o percentual de enraizamento foi significativamente superior ao tratamento com 7,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB, porém inferior ao tratamento com 2,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Tabela 1).

Com exceção do tratamento no nível de 7,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB, a PER com a indução *in vitro* foi superior ao sistema de indução *ex vitro*. Também não se observou efeito do tratamento com AIB para as diferentes concentrações no sistema de indução *ex vitro*, como pode ser observado na Tabela 1.

Estudando a rizogênese em estacas de mamoeiro, alguns pesquisadores como Saker et al. (1999), testando diferentes concentrações de AIB, obtiveram máximo enraizamento *in vitro* (75%), utilizando 2 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Também observaram que com 3 mg L<sup>-1</sup> ocorre redução no percentual de enraizamento, com formação de calo. Agnihotri et al. (2004) obtiveram 95% de enraizamento com 10 mg L<sup>-1</sup> de AIB quando as estacas foram tratadas por um período de 24 horas, sendo que com exposição das estacas por 12 horas na solução, essa concentração foi menos eficaz e com exposição por 36 horas, ocorreu apenas formação de calo. Os resultados

observados nesta pesquisa se explicam, possivelmente, pela sensibilidade das estacas de mamoeiro aos fatores associados à rizogênese adventícia.

**Tabela 1** – Médias para: enraizamento (PER); comprimento da maior raiz (CR); diâmetro do coleto (DC); massa seca da parte aérea (MSPA); massa seca das raízes (MSR); comprimento da parte aérea (CPA), de microestacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 enraizadas em sistema semi-hidropônico tratadas com diferentes níveis de AIB *in vitro* (IV) e *ex vitro* (EV).

AIB (mg L <sup>-1</sup> )	PER (%)		CR (cm)		DC. (mm)	
	IV	EV	IV	EV	IV	EV
00	-	-	-	-	-	-
2,5	96,66 Aa	29,99Ba	25,58 Aa	23,94 Aa	8,16 Aa	6,11Ba
5,0	50,00Ab	26,66Ba	20,44 Aa	25,75 Aa	5,99 Ab	6,28 Aa
7,5	19,99Ac	23,33Aa	20,96 Ba	28,87 Aa	5,96 Ab	6,23 Aa
<b>CV (%)</b>	<b>18,13</b>		<b>27,54</b>		<b>13,12</b>	
	MSPA (g)		MSR (g)		CPA(cm)	
00	-	-	-	-	-	-
2,5	0,821 Aa	0,907 Aa	0,455 Aa	0,541 Aa	15,98Aa	12,66 Aa
5,0	0,838 Aa	0,853 Aa	0,420 Aa	0,427 Aa	12,93 Aa	12,27 Aa
7,5	0,822 Aa	1,025 Aa	0,375 Aa	0,486 Aa	11,75 Aa	14,48 Aa
<b>CV (%)</b>	<b>30,39</b>		<b>33,99</b>		<b>23,38</b>	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal na comparação entre IV e EV para cada característica constituem grupo estatisticamente homogêneo a 5% de probabilidade pelo teste de Scott e Knott. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo a 5% de probabilidade pelo teste de Scott e Knott. CV – Coeficiente de variação.

Em relação à característica comprimento da maior raiz, como observado para porcentagem de enraizamento, a análise de variância também indicou interação entre os fatores avaliados nesta pesquisa. O maior valor para essas características foi registrado para o tratamento com indução *ex vitro* na concentração de 7,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB, diferindo do tratamento na mesma concentração, porém com indução *in vitro*, mas não diferindo dos demais tratamentos com indução *ex vitro* (Tabela 1). Pelizza et al. (2013) avaliaram o enraizamento *ex vitro* de plantas micropopagadas

de amoreira e observaram resposta linear crescente para esta característica em função da elevação da concentração de AIB na solução indutora.

Com relação à característica diâmetro do colo das plântulas, como observado para percentual de enraizamento, também se registrou interação significativa entre os fatores ambiente e concentrações de AIB. Para essa característica, o maior valor foi observado nas condições de indução *in vitro* para concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB diferindo do ambiente de indução *ex vitro* para a mesma concentração de AIB, diferindo também dos outros tratamentos *in vitro* nas demais concentrações de AIB. Não se observou diferença significativa entre ambientes para os demais níveis de AIB utilizados nesta pesquisa. Também não foi observada diferença entre as médias nas diferentes concentrações de AIB para indução *ex vitro* (Tabela 1). A análise do resultado para essa característica deve considerar que o diâmetro das microestacas na implantação do experimento variou entre 5 a 7 mm, fato este, que pode ter interferido nos resultados mesmo considerando a distribuição aleatória das mesmas nos tratamentos.

Não se observou diferenças significativas entre os tratamentos para as características: massa seca da parte aérea (MSPA); massa seca das raízes (MSR) e comprimento da parte aérea (CPA) (Tabela 1).

Para a massa seca da parte aérea e das raízes, a análise de variância não mostrou diferença significativa entre os tratamentos, fato que pode encontrar explicação no curto período entre a iniciação radicular e a avaliação dessas características, mesmo sendo o mamoeiro uma planta de crescimento relativamente rápido, associado ao baixo valor numérico apresentado pelas médias dos tratamentos expressos em grama. Para contornar esse problema, muitos autores preferem não trabalhar com essa característica na análise de experimentos com cultura de tecidos, utilizando apenas medidas de comprimento de partes aéreas e raízes, porcentagens de enraizamento e aclimatização de plantas (CRUZ et al., 2008; SCHMILDT et al., 2010).

O tratamento com 7,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB apresentou plantas muito vigorosas, com denso sistema radicular com 6 a 8 raízes adventícias e muitas radículas. Ao serem retiradas dos vasos, notava-se bastante agregação do torrão, fato benéfico ao

transplante das plantas para o campo, pois confere elevada taxa de sobrevivência no campo, pela reduzida quebra de raízes nessa ocasião.

Não foi observado formação de calo friável nos brotos do tratamento com  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  com indução *in vitro* no momento da transferência dos frascos de cultivo para os copos plásticos no sistema semi-hidropônico. Já no momento do transplante para os vasos com solo, todos os brotos deste tratamento já apresentavam raízes. Para o enraizamento de microestacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02, a indução *in vitro* com AIB na concentração de  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  por 15 dias se mostra adequado. Pesquisas futuras com a utilização de novas tecnologias no cultivo protegido podem ser necessárias, pois, os tratamentos que utilizaram indução *ex vitro* se mostraram vantajosos pela economia de espaço na sala de cultivo, boa formação do sistema radicular e crescimento das plantas. No entanto, devido provavelmente às altas temperaturas (máxima registrada de  $42^{\circ}\text{C}$  no interior da estufa) registradas após a segunda semana da instalação do experimento, estes, não apresentaram resultados satisfatórios quanto à porcentagem de sobrevivência. Por outro lado, os brotos oriundos do nível  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB com indução *in vitro* que já apresentava iniciações radiculares, já na transferência para o sistema semi-hidropônico, apresentou baixa taxa de mortalidade (3,34%), taxa aceitável para a micropropagação comercial.

Testes anteriores à realização do experimento e cuidados com a radiação solar e a temperatura foram essenciais para a obtenção desses resultados, pois, ao longo do dia a taxa de fluxo fotossintética varia muito conforme a nebulosidade atmosférica. Conforme a posição do sol sobre a estufa de vegetação tem-se mudanças repentinas de temperatura e radiação solar, sendo que as vitroplantas são extremamente sensíveis a essas mudanças bruscas. A aclimação deve ser gradual. A redução da radiação solar com aluminet<sup>®</sup>, sombrite e plástico leitoso, bem com a microaspersão no interior da estufa, para elevar a umidade relativa do ar, foram cruciais para a sobrevivência das plantas.

#### 4.1.4 – Conclusão

A indução dos brotos em meio de cultura com 2,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB (ácido indolbutírico) por um período de 15 dias e posterior transferência para sistema semi-hidropônico é o método mais adequado para a micropropagação do mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02.

#### 4.1.5 – Referências

AGNIHOTRI, S. SINGH, S. K.; JAIN, M. SHARMA, M.; SHARMA, A. K.; CHATURVEDI, H. C. In vitro cloning of male *Carica papaya* through tips of shoots and inflorescences, **Indian Journal of Biotechnology**, v.3, n.2, p.235-240, 2004.

ANANDAN, R.; THIRUGNANAKUMAR, S.; SUDHAKAR, D.; BALASUBRAMANIAN, P. *In vitro* organogenesis and plantlet regeneration of (*Carica papaya* L.). **Journal of Agricultural Technology**, v.7, n.5, p.1339-1348, 2011. Disponível em: <<http://www.ijat-aatsea.com>>. Acesso em 12 de jan. 2013.

ASSIS, T. F. de; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformações genéticas das plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. p.261-296.

BENASSI, A. C.; CATTANEO, L. F. **Informes sobre a produção de mamão: agrodúvidas**. <[agroduvidasufersa.webnode.com.br/.../...8](http://agroduvidasufersa.webnode.com.br/.../...8)> jul. 2011 – Antônio Carlos Benassi<sup>1</sup> e Laercio Francisco Cattaneo<sup>2</sup> ... Democrática do Congo, Tailândia, Guatemala, e Colômbia. >. Acesso 02 de fevereiro de 2013.

CRUZ, C.D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

CRUZ, M.; DARIAS, A. L.; CARRERA, D.; PERES, A.; CRUZ-MARTINS; M.; PICHARDO, T.; KOSKY, R. G.; PORTAL, O. Enraizamiento y aclimatización de plantas transgênicas de *papaya* var. 'Maradol roja'. **Biociencia Vegetal**. Santa Clara, Cuba, v.8, n.1, p.35-41, 2008.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Diferentes substratos e ambientes no enraizamento *in vitro* de mirtilo. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.39, n.2, p.563-566, 2009.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I. Micropropagação e microestaquia de eucalipto. In WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de eucalipto**. Cap. 3, Colombo – PR: EMBRAPA, 2010. p.83-120.

FERREIRA, J. P.; SCHMILDT, E. R.; TEIXEIRA, J. A.; SCHMILDT, O.; NASCIMENTO, A. L. Enraizamento *in vitro* de clones de mamoeiro 'Tainung 01' **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.42, n.2, p.563-566, 2011.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**: essential documents, statistics, maps and multimedia resources. [www.fao.org/](http://www.fao.org/) - 18k - <acesso 21 janeiro 2014>.

FURLANI, P.R.; SILVEIRA, L.C-P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIM, V. Cultivo hidropônico de plantas. **Boletim Técnico IAC 180**, Campinas: Instituto Agrônomo, 1999. 52p.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**: volume 1, the background. 3 ed. Dordrecht: Springer, 2008. 501p.

HARTMANN, H.T; KESTER, D.E; DAVIES JR, F.T; GENEVE, R.L. **Plant propagation**: principles and practices. 8 ed., New Jersey: Prentice Hall, 2011. 915p.

IBGE. A:\Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, 16.htm. [www.ibge.com.br](http://www.ibge.com.br) <acesso 21 de janeiro de 2014>

MAGDALITA, P. M.; LAURENA, A. C.; ABUSTAN, M. A. M.; COMIA, R. L.; JOSUE, D. R. Transgenic papaya with delayed ripening characteristics, **PCARRD Highlights**, Institute of Plant Breeding-UPLB, p.104-105, 2008.

MANDAL, L.; SAHU, P.; MANNADE, A. K.; KATARA, J. L. Improvement of papaya production using genetic engineering: a revolution. **Global Journal of Bio-Science and Biotechnology**. Society for science and nature (SFSN), v.3, n.1, p.122-123. 2014

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

OLIVEIRA, M. J. V. de. **Micropropagação e enraizamento *ex vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'**. 2008, 90 f., Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, CCA-UFES, Alegre – ES, 2008.

PELIZZA, T.R.; MUNIZ, J.; CAMARGO, P.; KRETZSCHMAR, A.A.; RUFATO, L. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plântulas micropropagadas de amoreira-preta 'Xavante'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.35, n.1, p.329-332, 20013.

SAKER, M. M; BEKEET, S. A; TAHA, H. S; REDA, A. A. ***In vitro* propagation of papaya (*Carica papaya* L.)**. Plant cell and tissue4 culture department, National Research Centre, Dokki, Cairo Eggpt. 1999. Disponível em: <http://www.acgssr.org/BioTechnology/V2N2December1999/fullpaper/p22.pdf>. < acesso em 12 de outubro de 2013>.

SCHMILDT, E. O.; AMARAL, J. A. T. do; SHMILDT, O.; COELHO, R. I.; RABELO, W. S.; MARTINS FILHO, S. Níveis de ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro 'Tainung 01'. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 32, n.1, p.125-129, 2010.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T. do; COELHO, R. I.; RABELO, W. S.; MARTINS FILHO, S. Resposta rizogênica *in vitro* de ápices caulinares de mamoeiro 'Tainung 01' em diferentes tempos de permanência em meios de indução e regeneração, **Acta scientiarum Agronomy**. v.31, n.4, p.603-700, 2009.

SCHMILDT, E. R.; TEIXEIRA, S. L.; CRUZ, C. D.; COUTO, F. A. D'A.; LANI, E. R. G. Enraizamento de ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) obtidos por cultivo *in vitro* de ápices caulinares. **Revista Ceres**, Viçosa, v.44, n.253, p.339-345, 1997.

SILVA, A. L. L. da; FRANCO, E. T. H.; HORBACH, M. A.; BISOGNIN, D. A.; OVOIRIN, M. Aclimatização de *Dyckia maritima* Baker em hidroponia (Bromeliaceae). **Caderno de pesquisa. Série Biologia**, Santa Cruz do Sul, v.19, n.3, p.16-23, 2007.

VIANNA, G. R.; COUTO, F. A. A.; OLIVEIRA, A. B.; ZAMBOLIM, L.; MARIA, J. A. rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. **Bragantia**, n.56, p.149-254, 1997.

YU, T.-A.; YEH, S.-D.; YANG J.-S. **Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya**. Department of Botany and Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taiwan, Republic of China, v.42, p.281-286, 2001.

## 4.2 – ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE MAMOEIRO COM AIB EM HIDROPONIA

### RESUMO

A propagação vegetativa por estaquia é uma tecnologia bastante aplicada a plantas frutíferas. Uma forma de melhorar o rendimento da produção de brotos é a utilização da miniestaquia. Neste trabalho, foram avaliados os níveis de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de miniestacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em sistema hidropônico. Brotos de 3 a 6 cm de comprimento, de plantas hermafroditas de mamoeiro, foram introduzidos cerca de 1 cm da base em células de espuma fenólica sobre placas de isopor. As placas de isopor foram colocadas no interior de bandejas plásticas contendo solução de Hoagland com diferentes níveis de AIB: 0; 1; 5; 10; 50 e 100 mg L<sup>-1</sup>. A solução nutritiva chegava aos cubos de espuma fenólica por capilaridade através de tufo de algodão transpassados por entre furos na bandeja de isopor. Após 35 dias, foi avaliado o crescimento, a porcentagem de sobrevivência e de enraizamento dos brotos, o nível 5,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB propiciou melhor enraizamento .

**Palavras-chave:** *Carica papaya*, propagação vegetativa, miniestaquia.

## ROOTING OF PAPAYA MINICUTTING WITH IBA IN HYDROPONIC SYSTEM

### ABSTRACT

The vegetative propagation by staking is a technology used constantly with fruit trees. The minicutting is a way of improving the yield of shoots. This work evaluated the levels of indolebutyric acid (IBA) in the minicutting papaya hybrid UENF/CALIMAN 02 rooting, in the hydroponic system. Buds with length of 3 to 6 cm. taken from papaya hermaphrodite plants were introduced at about 1 cm from the base in cells made of phenolic sponges over Styrofoam plaques. The Styrofoam plaques were placed inside plastic trays where Hoagland solution was added, with different levels of IBA: 0; 5; 50 and 100 mg L<sup>-1</sup>. The nutrient solution came to the phenolic foam cubes by capillarity through tufts of cotton trespassed through the holes in the Styrofoam tray. After 35 days, the growth, the survival, and the bud rooting percentages were evaluated. Although not statistically different, the treatment with 5.0 mg L<sup>-1</sup> IBA presented the highest percentage of rooting (50%).

**KEY WORDS:** *Carica papaya*, vegetative propagation, minicutting

### 4.2.1 – Introdução

A produção global de mamão vem ganhando acréscimos, principalmente devido o incremento da produção na Índia, que em 2011 produziu 4.180.075 toneladas da fruta, liderando a produção mundial de mamão. Em segundo lugar, o Brasil produziu 1.854.343 toneladas no mesmo período (FAO, 2014). Já em 2012, o Brasil produziu 1.517.696 toneladas, tendo como maiores produtores os estados da Bahia, com 683.474 toneladas e o Espírito Santo com 489.645 toneladas, em terceiro lugar, o Estado do Ceará produziu 86.414 toneladas da fruta no mesmo período (IBGE, 2014).

O cultivo do mamoeiro explora, principalmente, plantas hermafroditas, uma vez que produzem os frutos mais aceitos pelos mercados interno e externo. têm um custo menor de embalagem e transporte, pois apresentam, em relação ao peso, um menor volume (ARANGO et al., 2008). Como não se conhece o sexo das plantas no início do plantio, os agricultores plantam pelo menos três mudas por cova e são obrigados a esperar de três a cinco meses para realizar a sexagem, o que aumenta os custos de produção, além de afetar o desenvolvimento das plantas hermafroditas em razão da competição. Não existe nenhum caráter morfológico visual que possa ser usado para distinguir o sexo do mamoeiro, em plantas juvenis (FERREIRA et al., 2011). A obtenção de mudas clonais de mamoeiro via estaquia tem como vantagem a obtenção de muitas plantas a partir de uma única matriz (clones), em curto prazo de tempo, o custo é baixo e é de fácil execução (MANICA, 2006).

A pulverização de plantas de mamoeiro com 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido giberélico (GA) apresenta resultados benéficos tanto no incremento do número de brotos laterais quanto na conformação dos mesmos (GIAMPAN et al., 2005). A remoção da gema apical estimula a produção de brotações com maior diâmetro (ONO et al., 2004). A aplicação de reguladores de crescimento é importante para o aumento da velocidade de formação de raízes, aumento do número e qualidade das raízes formadas, bem como maior uniformidade de enraizamento, sendo que este pode ser aplicado via líquida ou via pó (WENDLING & DUTRA, 2010). Para o enraizamento de ramos de mamoeiro, o regulador de crescimento vegetal mais

utilizado é o ácido indolbutírico (AIB) devido as suas características de boa estabilidade, maior espectro de ação e menor foto oxidação (CRUZ et al., 2008).

A miniestaquia, criada com a finalidade de contornar dificuldades no enraizamento de alguns clones de *Eucalyptus*, é muito utilizada no setor florestal, constituindo-se na principal técnica de propagação clonal de *Eucalyptus urophilla* e seus híbridos (OLIVEIRA et al., 2012). Pode ser utilizada em outras culturas como, por exemplo, o maracujá (MELETTI et al. 2002). Essa técnica apresenta como vantagem a redução da área necessária para a formação do minijardim clonal, redução dos custos de transporte e coleta das brotações, maior eficiência das atividades de manejo, além de proporcionar maior porcentual de enraizamento, qualidade do sistema radicular e velocidade de emissão das raízes (LIMA et al., 2009). Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi verificar os níveis de AIB eficientes no enraizamento de brotos de plantas hermafroditas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em hidroponia.

#### **4.2.2 – Material e Métodos**

A pesquisa foi realizada, no Laboratório de Hidroponia do Instituto Federal do Espírito Santo - Campus de Alegre, localizado em Alegre - ES.

Para a obtenção das miniestacas utilizadas no experimento, estabeleceu-se um minijardim clonal, com plantas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02, cultivadas em vasos plásticos contendo 25 litros de substrato composto por terra, areia e esterco bovino bem curtido, na proporção 3:1:1, respectivamente. No início da floração, realizou-se a sexagem para identificação e seleção das plantas hermafroditas. Feita a seleção, as plantas foram decapitadas a 1,50 m de altura a partir do colo. Imediatamente após a decaptação, as plantas foram pulverizadas com fungicida a base de oxiclreto de cobre + mancozeb 2,5 g L<sup>-1</sup> no local de corte. Com o propósito de estimular a brotação, além da decapitação, aplicou-se via pulverização uma solução contendo 300mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP) e 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), repetida duas vezes, totalizando três aplicações em intervalos semanais. Após 60 dias da eliminação do ápice das plantas, a primeira brotação dos ramos produzidos foi coletada para servir de fonte de explantes em

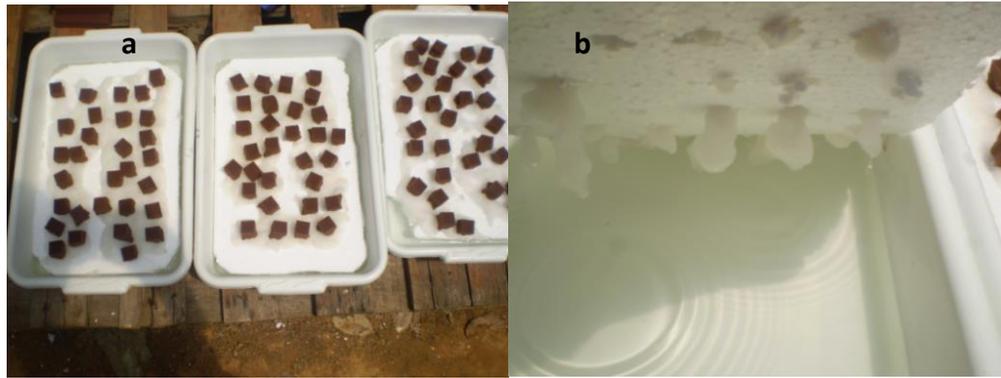
trabalhos com micropropagação, no entanto, 45 dias após a primeira coleta dos brotos, selecionou-se miniestacas de 40 a 60 mm de comprimento, para a realização de experimentos com a utilização de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de miniestacas de mamoeiro em sistema hidropônico.

Para a realização do experimento, as miniestacas foram fixadas em células de espuma fenólica, de 2x2x2 cm, e estas foram colocadas sobre placas de isopor com 3 cm de espessura, perfuradas e cobertas e transpassadas com algodão de modo a transportar a solução nutritiva por capilaridade para as células de espuma fenólica. Dentro de cada bandeja plástica, foi adicionada um litro da solução nutritiva básica proposta por Furlani et al. (1999), a uma condutividade elétrica de 2,0 dS m<sup>-1</sup>, e níveis diferentes de AIB.

Após dois dias, a solução já havia sido absorvida e/ou evaporada, sendo então repostas a cada dois a três dias, sem nova adição de regulador de crescimento.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente ao acaso com seis níveis de AIB: 0, 1, 5, 10, 50, 100 mg L<sup>-1</sup>, quatro repetições e com cinco plantas por repetição (FIGURAS 1, 2 e 3). A temperatura diurna variou de 21 a 35° C e a umidade do ar de 54 a 85% durante os 35 dias antes da avaliação do experimento. Após 35 dias, foram avaliados: a porcentagem de enraizamento e sobrevivência das miniestacas a partir do número inicial, o comprimento da parte aérea e da maior raiz, número de raízes e a matéria seca da parte aérea e das raízes. Os dados de porcentagem de enraizamento e número de raízes, por não atenderem o pressuposto da normalidade, foram transformados em arco-seno da porcentagem e raiz de x, respectivamente, sendo os resultados apresentados na escala original.

Realizou-se análise de variância e posterior teste de média Tukey a 1% de probabilidade. Os dados coletados foram avaliados com auxílio do programa GENES (CRUZ et al., 2013).



**Figura 1 – a** – bandejas plásticas contendo placas de isopor e cubos de espuma fenólica; **b** – detalhe da face inferior da folha de isopor com furos transpassado por algodão.



**Figura 2 – a** – Planta matriz; **b** – brotos e materiais para instalação do experimento.

#### 4.2.3 – Resultados e Discussão

Os resultados observados na Tabela 1 mostram que não foram significativas as doses de AIB para a percentagem de enraizamento nas concentrações de 5; 10 e 50 mg L<sup>-1</sup>. Dentre os níveis utilizados, o nível 5 mg L<sup>-1</sup> apresentou média de 50% das plantas enraizadas aos 35 dias, o nível 50 mg L<sup>-1</sup> obteve a média de 35% e o nível

10 mg L<sup>-1</sup> 25%. Não ocorreu enraizamento sem regulador de crescimento, esse fato corrobora com Teo & Chan (1994), para esses autores, foi necessária adição da auxina AIB na promoção do enraizamento de miniestacas de mamoeiro. Por outro lado, a concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> mostrou-se ineficaz para induzir o enraizamento nos brotos, pois, não ocorreu enraizamento nessa concentração. Com a elevação do nível de AIB para 100 mg L<sup>-1</sup> também não ocorreu enraizamento. É provável que o tempo em que as miniestacas estiveram em contato com esta concentração do regulador vegetal tenha sido muito prolongado, pois, segundo Taiz & Zaiger, (2013) embora a iniciação de raízes laterais e adventícias seja estimulada por altos níveis de auxina, o alongamento da raiz primária é inibido por concentrações elevadas de auxina.



**Figura 3** – Brotos de mamoeiro enraizados após 35 dias em hidroponia com 5,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB dissolvido na solução nutritiva na primeira semana da instalação do experimento.

Para a percentagem de sobrevivência, o nível 5 mg L<sup>-1</sup> de AIB proporcionou a maior média, 100%, embora somente 50% dos brotos apresentaram formação de raízes até o momento de avaliação do experimento. Provavelmente, o tempo necessário

para o enraizamento de todos os brotos seja superior a 35 dias, no entanto, o sistema utilizado no experimento não permitiu maiores crescimentos das raízes, devido ao tamanho reduzido dos cubos de espuma fenólica (2x2x2 cm). Além disso, de acordo com Epstein & Bloom (2006), os pelos radiculares de raízes de plantas que crescem em hidroponia podem ter crescimento retardado, serem reduzidos ou completamente ausentes. Esse fato poderia comprometer o processo de aclimação das plantas. Uma solução para esse problema poderia ser a retirada seletiva dos brotos já enraizados, no momento em que as raízes formadas fossem visualizadas externamente aos cubos de espuma fenólica e transplantá-los para vasos ou sacolas com solo, de modo a propiciar o desenvolvimento das mudas até que atingissem condições adequadas a serem submetidas ao plantio definitivo no campo.

Para o comprimento da parte aérea, não houve diferença significativa entre os tratamentos com 5, 10 e 50 mg L<sup>-1</sup> de AIB, embora, pelo acompanhamento diário do experimento, já se observasse que o crescimento da parte aérea já estivesse iniciado. Segundo Taiz & Zaiger (2004), os órgãos de plantas excisadas respondem de forma intensa a auxina exógena pelo rápido aumento de sua taxa de crescimento aos níveis observados na planta intacta. Aliado a isso, segundo Epstein & Bloom (2006), com altos níveis de nutrientes, as concentrações de auxinas decrescem e estimulam a proliferação de raízes laterais provocando elevação nos níveis de citocininas que estimulam a expansão foliar.

O número de raízes foi superior no tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup> de AIB, no entanto, ocorreu grande número de raízes formadas de calos. De acordo com Schmildt et al. (2010), que trabalharam com níveis de AIB no enraizamento de microestacas de mamoeiro híbrido 'Tainung 01', esse enraizamento não é interessante para trabalhos cujo objetivo é a propagação de plantas, uma vez que essas raízes surgidas pela rediferenciação das células do calo, raramente possuem conexões vasculares com microestacas regeneradas de calo. Por outro lado, as plantas provenientes do nível 5 mg L<sup>-1</sup> possuíam raízes bem conectadas com o caule assemelhando-se a plantas de propagação seminífera originando plantas vigorosas e que se desenvolviam rapidamente.

Para o comprimento radicular, não houve enraizamento com os níveis  $0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, indicando assim a necessidade da adição do regulador de crescimento para o enraizamento de miniestacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02, como evidenciado por Schmildt et al. (2009), que constataram que microestacas de mamoeiro 'Tainung 01' não enraizavam *in vitro* sem a presença de AIB no meio de cultura de enraizamento. O nível  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB também mostrou-se ineficiente na promoção de enraizamento nas miniestacas, por outro lado, foi observado que concentrações mais elevadas de AIB, por volta de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  inibem o enraizamento quando utilizados por tempo prolongado.

Não houve diferença significativa entre os níveis 5; 10 e  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB para a massa seca da parte aérea e do sistema radicular. Provavelmente, o tempo decorrido para a realização do experimento tenha sido curto para que essas alterações pudessem ser notadas.

Os coeficientes de variação foram altos neste experimento para os caracteres relacionados ao crescimento das raízes, isso se deve ao fato de que a iniciação radicular é diferenciada em cada miniestaca e após o início de formação das raízes, o crescimento dos brotos enraizados é muito rápido em condições de hidroponia, o que gera uma grande variação no comprimento e massa das raízes. Como forma de abrandar essa característica do experimento, poder-se-ia em trabalhos futuros reduzir a diferença entre os níveis de reguladores vegetais e realizar as avaliações das plantas após a aclimatação em recipientes com solo.

**Tabela 1** – Médias de enraizamento (PR, em %), porcentagem de estacas vivas (PV, em %), comprimento de parte aérea (CPA, em mm), número de raízes por estaca (NR), comprimento da maior raiz (CMR, em mm), matéria seca de parte aérea (MSPA, em mg) e matéria seca de raízes (MSR, em mg) de miniestacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em sistema hidropônico submetidas a diferentes níveis de ácido indolbutírico (AIB, em mg L<sup>-1</sup>).

AIB	PR	PV	CPA	NR	CMR	MSPA	MSR
5	50,00 a	100,0 a	46,45 a	6,29 b	20,38 a	152,2 a	25,00 a
10	25,00 a	85,0 ab	45,60 a	3,88 b	5,75 a	116,2 a	11,50 a
50	35,00 a	75,0 b	47,80 a	19,38 a	16,13 a	143,0 a	37,00 a
Média	36,67	86,67	46,62	9,85	14,08	137,17	24,50
CV(%)	28,35	9,42	11,15	31,24	52,58	13,96	66,65

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV – Coeficiente de variação.

#### 4.2.4 – Conclusões

O uso de auxina como AIB é essencial para o enraizamento de miniestacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em hidroponia.

Altas concentrações de AIB, em torno de 100 mg L<sup>-1</sup>, não promovem o enraizamento.

Em sistema hidropônico, o nível 5 mg L<sup>-1</sup> de AIB na solução proporciona bom enraizamento e altas taxas de sobrevivência de miniestacas de mamoeiro.

#### 4.2.5 – Referências

ARANGO, L. V., REZENDE, C. R., CARVALHO, S. P. Identificação antecipada do sexo do mamoeiro pelos caracteres físicos das sementes e padrões isoenzimáticos das mudas. **Revista Corpoica** - Ciência y Tecnologia Agropecuária, v.9 n.1, p.22-29, 2008.

CRUZ, C.D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

CRUZ, M.; DARIAS, A. L.; CARRERA, D.; PERES, A.; CRUZ-MARTINS; M.; PICHARDO, T.; KOSKY, R. G.; PORTAL, O. Enraizamiento y aclimatización de plantas transgênicas de papaya var. 'Maradol roja'. **Biotecnologia Vegetal**, Santa Clara, Cuba, v.8, n.1, p.35-41, 2008.

EPSTAIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2 ed., Londrina: Editora Planta. 2006. 86p.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations: essential documents, statistics, maps and multimedia resources**. [www.fao.org/](http://www.fao.org/) - 18k - <acesso 21 janeiro 2014>.

FERREIRA, J. P.; SCHMILDT, E. R.; TEIXEIRA, J. A.; SCHMILDT, O.; NASCIMENTO, A. L. Enraizamento in vitro de clones de mamoeiro 'Tainung 01', **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.42, n.2, p.563-566, 2011.

FURLANI, P.R.; SILVEIRA, L.C-P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIM, V. Cultivo hidropônico de plantas. **Boletim Técnico IAC 180**, Campinas: Instituto Agrônômico, 1999. 52p.

GIAMPAN, J. S.; CERQUEIRA, T. S.; JACOMINO, A. P.; RESENDE, J. A. M.; SASAKI, F. F. Indução de brotos laterais de mamoeiro (*Carica papaya L.*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.185-187, 2005.

IBGE. A:\Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, 16.htm. [www.ibge.com.br](http://www.ibge.com.br) <acesso 21 de janeiro de 2014>

LIMA, D. M. De; TANNO, G. N.; PURCINO, M.; ZANETTE, F. Enraizamento de miniestacas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek) em diferentes substratos. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.2, p.617-623, 2009.

MANICA, I. Cultivares e melhoramento. In MANICA, I.; MARTINS, D. dos S.; VENTURA, J. A. **Mamão: Tecnologia de produção pós-colheita, exportação, mercados**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2006. p.49-82.

MELETTI, L. M. M.; FURLANI, P. R.; ÁLVARES, V.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L. C.; AZEVEDO FILHO, J. A. Novas Tecnologias Melhoram a

Produção de Mudanças de Maracujá. **O Agrônomo**, Campinas, v.54, n.1, p.31-33. 2002.

OLIVEIRA, L. S. De; XAVIER, A.; DIAS, P. C.; CORREIA, A. C. G.; BORGES, S. R.; TAKAHASHI, E. K.; PAIVA, H. N. De. Enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. Globulus* e *Eucalyptus grandis* X *E. Globulus*, **Scientia Florestalis**, Piracicaba, v.40, n.96, p.507-516, 2012.

ONO, E. O.; GRANA Jr, J. F.; RODRIGUES, J. V. Reguladores vegetais na quebra da dominância apical de mamoeiro (*Carica papaya* L.), **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.348-350, 2004.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T. do; SHMILDT, O.; COELHO, R. I.; RABELO, W. S.; MARTINS FILHO, S. Níveis de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro 'Tainung 01', **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.32, n.1, p.125-129, 2010.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T. do.; COELHO, R. I.; RABELO, W. S.; MARTINS FILHO, S. Resposta rizogênica *in vitro* de ápices caulinares de mamoeiro 'Tainung 01' em diferentes tempos de permanência em meios de indução e regeneração, **Acta Scientiarum Agronomy**, v.31, n.4, p.603-700, 2009.

TEO, C. K.; Chan L.K. The effects of agar content, nutrient concentration, genotype and light intensity on the *in vitro* rooting of papaya microcuttings, **Journal of Horticultural Science**, v.69, p.267-273, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013. 954p.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Produção de mudas de eucalipto por estaquia e miniestaquia. In WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de eucalipto**. Cap. 2, Colombo – PR: EMBRAPA, 2010. p.49-80.

### **4.3 – NÍVEIS DE AIB E SUBSTRATOS NO ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE MAMOEIRO HÍBRIDO UENF/CALIMA 02 EM SISTEMA SEMI-HIDROPÔNICO**

#### **RESUMO**

A miniestaquia é uma técnica com grandes aplicações em várias culturas, devido, principalmente, ao aumento dos percentuais e qualidade de enraizamento adventício, reduzindo o tempo para a formação da muda clonal. O objetivo deste trabalho foi avaliar níveis de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de miniestacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02. Para a realização do experimento, as microestacas de mamoeiro foram retiradas de plantas matrizes cultivadas em vasos, em casa de vegetação, induzidas a produzir brotos por meio de podas e aplicações de reguladores vegetais. As microestacas foram afixadas em substrato vermiculita ou fibra de coco em bandejas alveoladas de isopor com células de 4,5x4,5x5,0 cm. As bandejas de isopor foram então colocadas em bandejas plásticas contendo solução nutritiva básica para hidroponia proposta por Furlani (1999), onde foram adicionados diferentes níveis de AIB. Após 45 dias, os brotos enraizados foram transplantados para vasos plásticos, de 600 mL de volume, com terra, areia e esterco bovino bem curtido, na proporção 3:1:1, onde permaneceram por mais 45 dias, quando foram retirados dos vasos, tiveram suas raízes lavadas cuidadosamente e foram coletados os dados de comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz, massa seca da parte aérea e do sistema radicular e porcentagem de enraizamento. O experimento foi instalado em um delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial com cinco níveis de AIB: 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L<sup>-1</sup>, dois substratos: vermiculita e fibra de coco, com três repetições e seis miniestacas por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey e, para a massa seca da parte aérea e do sistema radicular foram também submetidas à análise de regressão. Os níveis de 5,0 mg L<sup>-1</sup> AIB e o substrato vermiculita são os mais adequados para o enraizamento de miniestacas de plantas hermafroditas de mamoeiro 'UENF/CALIMAN 02' em sistema semi-hidropônico em bandejas alveoladas de isopor com células de 4,5x4,5x5,0 cm.

**Palavras-chave:** *Carica papaya*, propagação vegetativa, miniestaquia.

## **IBA LEVELS AND SUBSTRATE IN THE PAPAYA MINI-STAKES HYBRID UENF/CALIMA 02 ROOTING, IN THE SEMI-HYDROPONIC SYSTEM**

### **ABSTRACT**

The minicutting is a technique with large applications in various crops, mainly due to the increase in the percentage and quality of adventitious roots, reducing time for the formation of clonal changes. The aim of this study was to evaluate levels of IBA on the rooting of papaya hybrid minicuttings UENF/CALIMAN 02. To perform the experiment, papaya minicuttings were taken from stock plants grown in pots in a greenhouse, induced to produce shoots through pruning and growth regulator applications. The minicuttings that were taken out were fixed in vermiculite or coconut fiber substrates placed in alveolate trays with cells of 4.5x4.5x5.0 cm, and the styrofoam trays were placed in plastic trays where different levels of IBA were added in a modified Hoagland solution. After 45 days the rooted buds were transplanted to plastic vases of 600 mL of volume with dirt, sand, bovine fertilizer well cured, in the proportion of 3:1:1, where they stayed for 45 days. When they were taken from the vases, their roots were washed carefully, and the length of the outside size, the length of the major root, the dried outside mass, the radicular system and the root percentage were measured. The experiment was set up in a randomized complete block design factorial 5 x 2, with 5 levels of IBA: 0; 2.5; 5.0; 7.5 and 10 mg L<sup>-1</sup>, two substrates: vermiculite and coconut fiber, repeated three times, with six plants per repetition. The levels of 5.0 mg L<sup>-1</sup> IBA and the substrate vermiculite are the most adequate for the minicutting papaya 'UENF/CALIMAN 02' rooting, in the semi-hydroponic system in alveolate styrofoam trays, with cells 4.5x4.5x5.0 cm.

**Key words:** *Carica papaya*, vegetative propagation, minicutting.

### 4.3.1 – Introdução

A importância da propagação vegetativa do mamoeiro é alicerçada por vários aspectos, dentre eles cita-se: no momento do plantio a formação de lavouras com 100% de plantas hermafroditas, com redução de insumos e mão de obra, proporcionando menor custo de produção e elevação da produtividade (SCHMILDT et al., 2005).

A miniestaquia é uma técnica criada pelo setor florestal, que atualmente constitui-se na principal técnica de propagação clonal de *Eucalyptus urophilla* e seus híbridos (OLIVEIRA et al., 2012; WENDLING & DUTRA, 2010). Podendo ser utilizada em outras culturas, como por exemplo, o maracujá (MELETTI et al., 2002). Essa técnica apresenta como vantagem a redução da área necessária para a formação do minijardim clonal, redução dos custos de transporte e coleta das brotações, maior eficiência das atividades de manejo, além de proporcionar maior porcentual de enraizamento, qualidade do sistema radicular e velocidade de emissão das raízes (LIMA et al., 2009).

Vários fatores influenciam direta e indiretamente a rizogênese em estacas. Dentre eles, o genótipo, o tipo de estaca, o ambiente de enraizamento, além da presença de indutores e inibidores de enraizamento. Para a iniciação do processo rizogênico nas estacas, é indispensável um nível endógeno ótimo de auxina, estando à auxina endógena em menor nível na estaca, é necessário aplicar auxina sintética, a qual é capaz de aperfeiçoar o enraizamento adventício da estaca (SILVA et al., 2007).

Em pesquisas com o enraizamento de ramos de mamoeiro, o regulador vegetal mais utilizado é o ácido indolbutírico (AIB), devido às suas características de boa estabilidade, maior espectro de ação e menor foto oxidação (CRUZ et al., 2008). O AIB apresenta também alta atividade, faixa maior de concentração não fitotóxica e é efetivo em várias espécies (SILVA et al., 2007).

O substrato utilizado para o enraizamento de estacas é um fator de grande importância na propagação vegetativa, sendo que o material ideal para a produção de mudas varia de acordo com a espécie a ser propagada e deve permitir um bom suprimento de água e oxigênio para a base das estacas e para o desenvolvimento

das raízes. O substrato mais adequado deve ser inerte, poroso, com boa drenagem e capaz de manter a aeração e a umidade, permitindo o desenvolvimento do sistema radicular (LIMA et al., 2009). A escolha do material a ser utilizado depende não só do objetivo a ser alcançado, mas também da disponibilidade do local, do custo de aquisição e da experiência do viveirista (BRONDANI et al., 2007).

Os substratos utilizados para a estaquia se diferenciam daqueles utilizados para a produção de mudas via semente pelo fato de apresentarem maior porosidade, em vista da maior umidade do ambiente de enraizamento das estacas. Para a promoção do enraizamento, os materiais mais frequentemente utilizados são: vermiculita, casca de arroz carbonizada, casca de pinus, moinha de carvão, fibra de coco e diversas misturas desses constituintes (WENDLING & DUTRA, 2010).

A vermiculita é um substrato que apresenta elevada porosidade e capacidade de retenção de água, apresentando bons resultados na estaquia de diversas culturas, sendo utilizado tanto como substrato único quanto em misturas com outros constituintes, já fibra de coco apresenta ótima aeração, aliada a uma boa capacidade de retenção de água e tendência de fixar cálcio e magnésio, liberar potássio no meio, pH entre 6,3 e 6,5 e sua salinidade é média a elevada (RISTOW et al., 2012). Além de apresentar longa durabilidade sem alteração das características físicas, possibilidade de esterilização, abundância da matéria prima, que é renovável, e baixo custo (BRONDANI et al., 2007).

Visando melhorar o aproveitamento de plantas matrizes, uma vez que pouco tempo após a coleta, novas brotações são formadas, foram utilizadas neste ensaio estacas menores, de 5 a 10 cm. O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de AIB e os substratos vermiculita e fibra de coco no enraizamento de miniestacas de plantas hermafroditas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em sistema semi-hidropônico.

### 4.3.2 – Material e Métodos

Para a formação do minijardim clonal, foram utilizadas sementes de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02, semeadas em bandeja de isopor de 132 células em substrato plantimax<sup>®</sup> hortaliças. Destas, 37 mudas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade para 25 litros contendo terra, areia e esterco bem curtido na proporção 3:1:1, respectivamente. Foram realizadas adubações a cada 20 dias com 5 g de formulado NPK: 13-40-13 e 3,5 g de nitrato de cálcio por planta. Foram realizadas aplicações de fungicida a base de oxiclreto de cobre + mancozeb 2,5 g L<sup>-1</sup> até o florescimento que se iniciou aos quatro meses, sendo que apenas após oito meses pôde-se identificar o sexo de todas as plantas, onde foram identificadas 15 plantas hermafroditas e 22 plantas femininas.

Após o florescimento e sexagem, as plantas hermafroditas foram decapitadas a 1,50 m do colo recebendo a aplicação, no caule, de uma solução contendo 300 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina) e 100 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (ácido giberélico) e uma pulverização com fungicida a base de oxiclreto de cobre + mancozeb 2,5 g L<sup>-1</sup> no local de corte. Foram feitas mais duas aplicações com os reguladores de crescimento vegetal, nas mesmas concentrações anteriores, em intervalos semanais.

A primeira coleta de brotos foi utilizada para servir como explantes em experimentos de micropropagação. Após a primeira coleta, verificou-se a formação de muitos brotos das gemas abaixo do local de corte. Os novos brotos formados foram coletados, na primeira quinzena de dezembro de 2012, seletivamente entre cinco e dez centímetros de comprimento conforme sua produção e submetidos a avaliações nas quais foram testados níveis de AIB e substratos.

Para o ensaio, os brotos foram coletados das plantas matrizes e submersos por cinco minutos em solução com o fungicida Ridomil<sup>®</sup> e fixados em substrato de fibra de coco ou vermiculita previamente umedecidos e postos em bandejas, alveolares de isopor, de produção de mudas, de células de 4,5x4,5x5,0 cm. As bandejas alveolares de isopor foram postas dentro de bandejas plásticas brancas de

43x27x7,5 cm, correspondentes ao comprimento, à largura e à altura. Cada bandeja, após a introdução das microestacas, recebeu dois litros de solução nutritiva básica proposta por Furlani (1999) com os níveis de AIB respectivos a cada tratamento.

Semanalmente, a solução nutritiva era renovada, mas sem novas adições de AIB. Após 45 dias em sistema semi-hidropônico, as miniestacas, enraizadas ou não, foram retiradas das bandejas e foram avaliados o comprimento da parte aérea, radicular e diâmetro. Imediatamente após a avaliação, as microestacas, enraizadas ou não, foram transplantadas para vasos plásticos, de 600 ml de volume, com terra, areia e esterco bovino curtido na proporção de 3:1:1, onde permaneceram por mais 45 dias.

O experimento foi instalado em esquema fatorial com cinco níveis de AIB (Figura1): 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L<sup>-1</sup>, dois substratos: vermiculita e fibra de coco, num delineamento inteiramente casualizado, com três repetições e seis miniestacas por repetição. A avaliação final foi feita aos 90 dias, quando as plantas foram retiradas dos vasos e tiveram suas raízes cuidadosamente lavadas. Foram avaliados o comprimento da parte aérea, o comprimento da maior raiz, a massa seca da parte aérea e do sistema radicular, a porcentagem de enraizamento e a porcentagem de estacas vivas a partir do número inicial. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% e, para a massa seca da parte aérea e do sistema radicular foram também submetidas a uma análise de regressão. Foi utilizado o software estatístico 'Programa GENES' (CRUZ, 2013).



**Figura 1** – Etapas da miniestaquia do mamoeiro em sistema semi-hidropônico. a – Plantas matrizes de mamoeiro com brotações. b – Brotos de mamoeiro. c – Enraizamento de miniestacas de mamoeiro em sistema semi-hidropônico. d – Clones de mamoeiro ‘UENF/CALIMAN 02’ enraizados em sistema semi-hidropônico e transplantados para vasos. e – Clones de mamoeiro exibindo o sistema radicular. f – Planta de mamoeiro obtida por miniestaquia com 15 cm já apresentando flores hermafroditas.

#### 4.3.3 – Resultados e Discussão

A análise das médias do enraizamento de estacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 apresentou interação significativa entre os níveis dos fatores AIB e substrato vermiculita ou fibra de coco, bem como a interação significativa entre esses fatores. Ainda referente ao enraizamento, na comparação dos substratos para

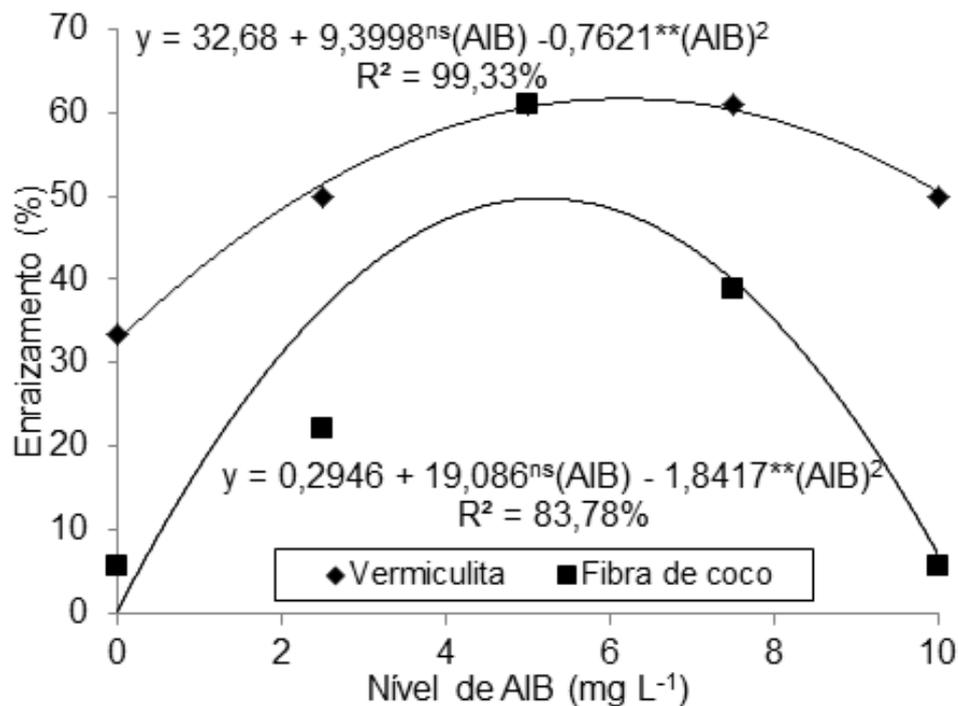
cada nível de AIB, observa-se que o substrato vermiculita permitiu maior enraizamento que o substrato fibra de coco, excetuando-se apenas o nível de 5,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Tabela 1). Segundo Wendling & Dutra (2010), o substrato vermiculita é muito poroso, o que é uma característica benéfica ao enraizamento de estacas. Pescador et al. (2007) obtiveram melhor resultado no enraizamento de estacas de pariparoba do Rio Grande do Sul com a utilização da vermiculita como substrato em comparação com areia grossa.

**Tabela 1** – Enraizamento percentual de estacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em dois substratos na presença de diferentes níveis de ácido indolbutírico (AIB) em sistema semi-hidropônico.

Substrato	AIB (mg L <sup>-1</sup> )				
	0,0	2,5	5,0	7,5	10
Vermiculita	33,31 a	50,00 a	61,11 a	61,11 a	50,00 a
Fibra de coco	5,56 b	22,22 b	61,11 a	38,89 b	5,55 b

Médias seguidas por mesma letra, na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Figura 2, observa-se comportamento quadrático do enraizamento em função de níveis de AIB. No substrato vermiculita, o ponto de máximo enraizamento ocorreu com 6,17 mg L<sup>-1</sup> de AIB, o que corresponde a 61,66% de enraizamento. Para o substrato fibra de coco, o máximo enraizamento ocorreu com AIB a 5,18 mg L<sup>-1</sup> de AIB o que corresponde a 49,74% de enraizamento.



**Figura 2** – Enraizamento de estacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em dois substratos em função de diferentes níveis de ácido indolbutírico (AIB) em sistema semi-hidropônico, ao final de 90 dias de avaliação.

Para os caracteres porcentagem de plantas vivas (PV), crescimento da parte aérea (CPA), crescimento do diâmetro do caule (CDC), comprimento da maior raiz (CMR), matéria seca de parte aérea (MSPA) e matéria seca de raízes (MSR) não ocorreu diferença significativa para a interação entre as médias dos fatores AIB e substrato. Em todos os caracteres, com exceção a CMR, as maiores médias foram para estacas submetidas ao enraizamento no substrato vermiculita (Tabela 2).

Resultados controversos foram obtidos por Lima et al. (2009), que obtiveram taxa mais alta de mortalidade de miniestacas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek) com a utilização de vermiculita (14,77%), em comparação com outros substratos (areia, casca de arroz carbonizada e plantimax<sup>®</sup>). Esses autores obtiveram índices de enraizamento significativamente superiores a vermiculita (78,41%) com a areia (92,04%), casca de arroz carbonizada (88,66%) e Plantmax HT<sup>®</sup> (94,31%). Brondani et al. (2007) obtiveram os melhores resultados para a miniestaqueia de erva-mate aos 90 dias, com substrato a base de casca de arroz carbonizada + vermiculita fina (1:1 v/v). Resultados inferiores foram obtidos com

fibra de coco e com casca de pinus + vermiculita (1:1 v/v). Em seus trabalhos, esses autores obtiveram melhor resultado com substrato à base de casca de arroz carbonizada + substrato para enraizamento à base de casca de pinus e vermiculita (1:1 v/v) tanto em casa de vegetação com controle de temperatura e umidade quanto na casa de vegetação sem controle, onde a casa de vegetação com controle de temperatura e umidade foi melhor para o enraizamento de miniestacas juvenis de erva-mate. Por outro lado, Agnihotri et al. (2004) obtiveram 95% de enraizamento de microestacas de mamoeiro com o subcultivo por 24 horas em meio BM3 com micronutrientes da solução de Knop adicionado 10 mg L<sup>-1</sup> e 2% de sacarose e logo após, subcultivo em meio BM2 suplementado com 50 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,25 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina e 2% de sacarose por 15 dias. Obtiveram 80% de sobrevivência das plantas após transplante para vasos com terra e vermiculita 1:1 (v/v).

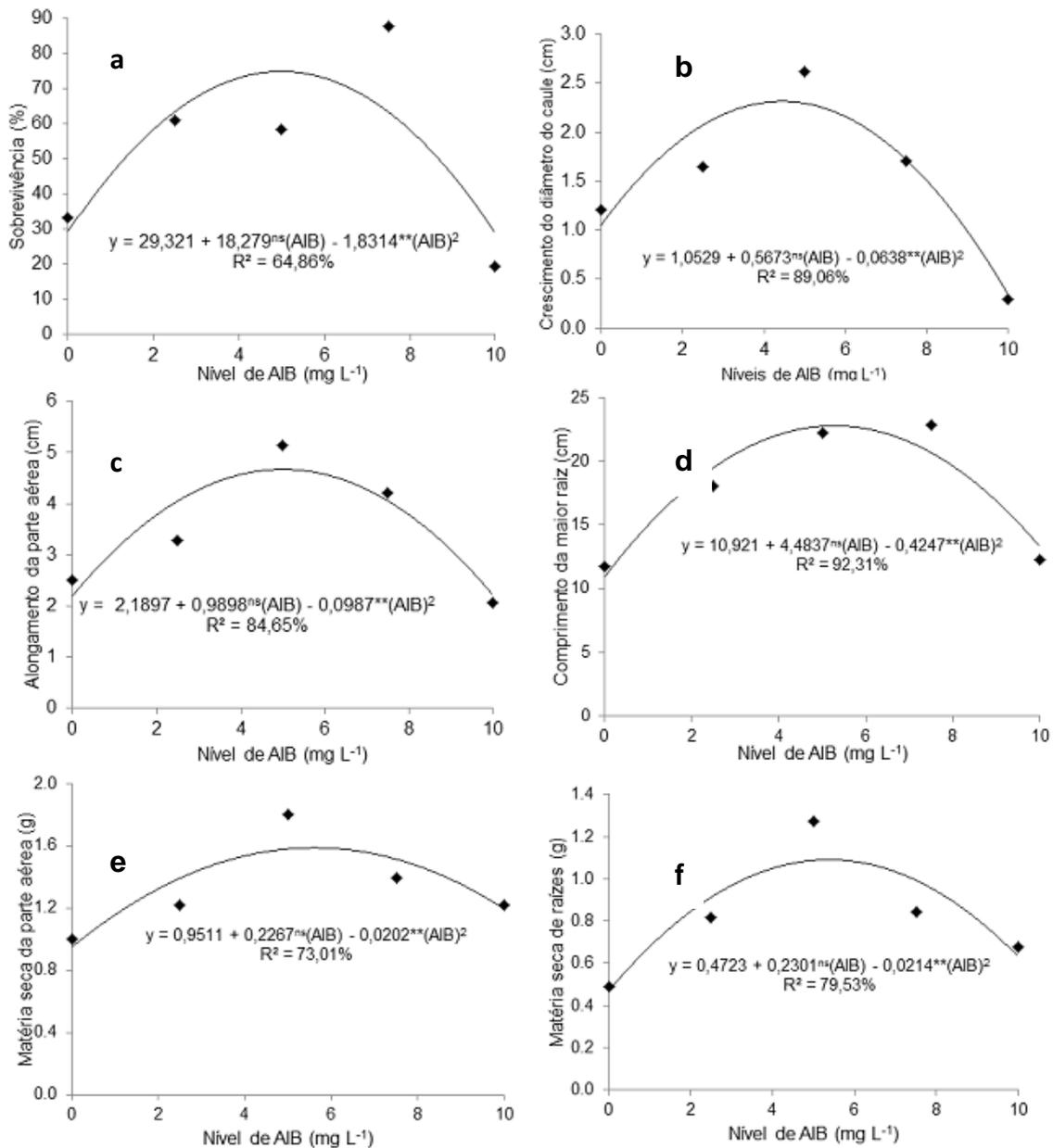
**Tabela 2** – Porcentagem de enraizamento (PE, em %), porcentagem de plantas vivas (PV, em %), crescimento da parte aérea (CPA, em cm), crescimento do diâmetro do caule (CDC, em mm), matéria seca de parte aérea (MSPA, em g) e matéria seca de raízes (MSR, em g) de estacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em dois substratos na presença de diferentes níveis de AIB em sistema semi-hidropônico

Substrato	Caracteres				
	PV	CPA	CDC	MSPA	MSR
Vermiculita	58,88 a	5,17 a	2,35 a	1,90 a	1,15 a
Fibra de coco	45,55 b	1,70 b	0,64 b	0,76 b	0,49 b

Médias seguidas por mesma letra, na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Referente ao caractere porcentagem de estacas vivas (PV) após o período de aclimatização frente a níveis de AIB pode-se representar o comportamento por uma resposta quadrática (Figura 3 – item a), cujo ponto máximo foi de 4,99 mg L<sup>-1</sup> de AIB o que corresponde a 74,93% de sobrevivência. Ocorreu aumento do diâmetro do caule durante a aclimação das estacas. Esse aumento, no entanto, foi influenciado

pele nível de AIB (Figura 3 – item b). Houve aumento até o nível máximo de 4,45 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Nesse nível, o aumento do diâmetro correspondeu a 2,31 mm.



**Figura 3** – Análises de regressão para o enraizamento de miniestacas de plantas hermafroditas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em sistema semi-hidropônico. a – Sobrevivência de estacas ao final de 90 dias de avaliação. b – Crescimento do diâmetro do caule de estacas de mamoeiro durante a aclimação de 45 dias. c – Alongamento da parte aérea durante a aclimação de 45 dias. d - Comprimento da maior raiz após aclimação, ao final de 90 dias de avaliação. e - Matéria seca da parte aérea ao final de 90 dias de avaliação. f - Matéria seca de raízes ao final de 90 dias de avaliação.

Os resultados apresentados na (Figura 3) mostram que também houve crescimento da parte aérea durante o período de aclimação e que esse crescimento foi influenciado pelos níveis de AIB, com comportamento quadrático. O máximo crescimento ocorreu com AIB a  $5,01 \text{ mg L}^{-1}$ , o que corresponde a 4,67cm de alongamento. Esse crescimento observado condiz com a afirmação de Taiz & Zaiger (2013). Segundo esses autores, os órgãos de plantas excisadas respondem de forma intensa a auxina exógena pelo rápido aumento de sua taxa de crescimento aos níveis observados na planta intacta.

Referente ao comprimento da maior raiz (Figura 3 – item d), o comportamento quadrático diante de níveis de AIB mostrou que as maiores raízes atingem cerca de 22,75 cm na presença de AIB a  $5,28 \text{ mg L}^{-1}$ .

Esses resultados se devem provavelmente aos baixos níveis e tempo prolongado de exposição ao regulador de crescimento vegetal utilizados neste trabalho, pois, embora a iniciação de raízes laterais e adventícias seja estimulada por concentrações elevadas de auxina, o alongamento é inibido por concentrações acima de  $10^{-8} \text{ M}$ , visto que as auxinas sintéticas são mais eficientes que o AIA, pois não são metabolizados tão rapidamente pela planta (TAIZ & ZAIGER, 2013). Desse modo, ocorre um decréscimo no alongamento das raízes com a elevação do nível de auxina endógena.

Concernente à matéria seca da parte aérea dos ramos após 90 dias do período de avaliação, observa-se que a mesma também foi influenciada pela presença do AIB de forma quadrática (Figura 3 – item e). A máxima matéria seca da parte aérea foi obtida com AIB a  $5,61 \text{ mg L}^{-1}$  o que corresponde a 1,59 g por estaca.

A matéria seca de raízes das estacas também apresentou crescimento quadrático na presença de AIB (Figura 3 – item f), sendo que no nível de  $5,38 \text{ mg L}^{-1}$  ocorreu o máximo de matéria seca de raízes que foi de 1,09 g por estaca, após 90 dias da instalação do experimento.

Os níveis de nutrientes utilizados neste experimento podem ter contribuído com os resultados obtidos, pois, a primeira fase de enraizamento em hidroponia, com altos níveis de nutrientes, visou estimular a formação das raízes e a segunda com o

transplante para vasos com solo em níveis mais baixos de nutrientes teve a finalidade de permitir a expansão das raízes, de modo que as médias da matéria seca das partes aéreas foram bem próximas das médias obtidas pelas massas secas das raízes. Esses resultados corroboram com Epstein & Bloom (2006), em que as concentrações de auxinas decrescem com altos níveis de nutrientes e estimulam a proliferação de raízes laterais, enquanto os níveis de citocininas aumentam com a melhoria do estado nutricional da planta e estimulam a expansão foliar, mas inibem o alongamento radicular alterando o equilíbrio funcional entre raiz e parte aérea, mas nutrientes resultam em baixas quantidades de citocininas e altas quantidades de auxina, que favorece o desenvolvimento da raiz em relação à parte aérea e vice-versa.

De acordo com esses resultados, podemos afirmar que o nível  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB com o substrato vermiculita e com substrato fibra de coco são mais adequados para o enraizamento de miniestacas de mamoeiro 'UENF/CALIMAN 02' em sistema semi-hidropônico com a utilização de bandejas alveoladas com células de  $4,5 \times 4,5 \times 5,0 \text{ cm}$ . Constatou-se que o posterior transplante para vasos com solo permitiu a formação de mudas de excelente qualidade e aptas ao plantio definitivo no campo, algumas delas já exibiam, inclusive, flores hermafroditas, no momento da avaliação do experimento, comprovando o sucesso da identificação sexual realizada nas plantas matrizes que as originaram.

#### **4.3.4 – Conclusão**

O nível  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB com o substrato vermiculita é o nível mais adequado ao enraizamento de miniestacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02 em sistema semi-hidropônico.

#### **4.3.5 – Referências**

AGNIHOTRI, S. SINGH, S. K.; JAIN, M. SHARMA, M.; SHARMA, A. K.; CHATURVEDI, H. C. *In vitro* cloning of male *Carica papaya* through tips of shoots and inflorescences, **Indian Journal of Biotechnology**, v.3, n.2, p.235-240, 2004.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; SANTIN, D.; BENEDETTI, E. L.; ROVEDA, L. F.; ORRUTEA, A. G. Ambiente de enraizamento e substratos na miniestaquia de erva-mate, v.8, n.3, **Scientia Agrária**. Curitiba, p.257-267, 2007.

CRUZ, C.D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. v.35, n.3, **Acta Scientiarum Agronomy**, p.271-276, 2013.

CRUZ, M.; DARIAS, A. L.; CARRERA, D.; PERES, A.; CRUZ-MARTINS; M.; PICHARDO, T.; KOSKY, R. G.; PORTAL, O. Enraizamiento y aclimatización de plantas transgênicas de papaya var. 'Maradol roja'. v.8, n.1, **Biotecnologia vegetal**, Santa Clara, Cuba, p.35-41, 2008.

FURLANI, P.R.; SILVEIRA, L.C-P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIM, V. Cultivo hidropônico de plantas. **Boletim Técnico IAC 180**, Campinas: Instituto Agrônomo, 1999. 52p.

LIMA, D. M. De; TANNO, G. N.; PURCINO, M.; ZANETTE, F. Enraizamento de miniestacas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek) em diferentes substratos. v.33, n.2, **Ciência Agrotécnica**, Lavras, p.617-623, 2009.

MELETTI, L. M. M.; FURLANI, P. R.; ÁLVARES, V.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L. C.; AZEVEDO FILHO, J. A. Novas Tecnologias Melhoram a Produção de Mudas de Maracujá. **O Agrônomo**, Campinas, v.54, n.1, p.31-33. 2002.

OLIVEIRA, L. S. de; XAVIER, A.; DIAS, P. C.; CORREA, A. C. G.; BORGES, S. R.; TAKAHASHI, E. K.; PAIVA, H. N. de. Enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* X *E. globulus*. v.40, n.96, **Scientia Florestalia**, Piracicaba, p.507-516, dez. 2012.

PESCADOR, R.; VOLTONIA, A.C.; GIRANDI, C. G.; ROSA, F. A. Estaquia de pariparoba do Rio Grande do Sul sob efeito de ácido indolbutírico em dois substratos, v.8, n.4, **Scientia Agrária**, Curitiba, p.391-398, 2007.

RISTOW, N. C.; ANTUNES, L. E. C.; CARPENEDO, S. Substratos para o enraizamento de microestacas de Mirtileiro cultivar 'Georgiagem'. v.34, n.1, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, p.262-264, 2012.

SILVA, J. A. da; RASHID, Z.; NHUT, D. T.; SIVAKUMAR, D.; GERA, A.; SOUSA JUNIOR, M. T.; TENNANT, P. F. **Papaya (*Carica papaya* L.) biology and biotechnology**. Global Science Books, 2007. <acesso em 10 de outubro de 2012>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013. 954p

WENDLING, I. & DUTRA, L. F. Produção de mudas de eucalipto por estaquia e miniestaquia. In WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de eucalipto**. Cap. 2, Colombo – PR: EMBRAPA, 2010. p.49-80.

## 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A formação de jardins clonais em ambiente protegido, para a produção de ramos de mamoeiro, pode permitir a produção de brotos em boas condições fitossanitárias, visto que os controles fitossanitários são facilitados nessas condições.

Os cuidados necessários a serem tomados para a micropropagação do mamoeiro devem iniciar muito antes do cultivo *in vitro* propriamente dito. Práticas como adubação, aplicações de defensivos e reguladores de crescimento, ainda na planta matriz, não só contribuem como também podem determinar o sucesso das técnicas de micropropagação e miniestaquia do mamoeiro.

A indução do enraizamento de microestacas de mamoeiro híbrido UENF/CALIMAN 02, *in vitro* é eficiente com meio de cultura contendo  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB por um período de 20 dias e posterior transplante para sistema semi-hidropônico com substrato vermiculita.

Para o enraizamento de miniestacas de mamoeiro 'UENF/CALIMAN 02' em sistema semi-hidropônico o nível adequado de AIB é de  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ , que propiciou 61,11% de enraizamento com os substratos vermiculita e fibra de coco.

Com este trabalho, espera-se contribuir para que, em um futuro próximo, a micropropagação e a miniestaquia possam atuar na melhoria da qualidade e produtividade da cultura do mamoeiro, propiciando a formação de lavouras com 100% de plantas hermafroditas, de alta produtividade e padrão exigido pelos consumidores, fazendo com que o produtor de mamão possa fidedignamente atender às exigências tanto do mercado interno quanto do mercado externo da fruta.