

CONTAMINAÇÃO E REAÇÃO MORFOGÊNICA *IN VITRO* DE EXPLANTES DE MAMOEIRO¹

Edilson Romais Schmildt²

José Augusto Teixeira do Amaral²

RESUMO

Foram avaliadas a contaminação por fungos e bactérias e a reação morfogênica *in vitro* do mamoeiro (*Carica papaya* L. cv. Improved Sunrise Solo Line 72/12) usando-se ápices e brotações laterais de plantas com três meses de idade, cultivadas em casa de vegetação, e ápices de plantas com nove meses, cultivadas em campo. Usou-se o meio de cultivo MS, suplementado com ácido α -naftalenoacético (ANA) a 0,1 mg.L⁻¹ e 6-furfurilaminopurina (cinetina) a 5,38 mg.L⁻¹. A desinfestação dos explantes foi feita individualmente com hipoclorito de sódio a 1%, por 15 minutos. As melhores respostas, conforme avaliadas pelas menores porcentagens de contaminações fúngica e bacteriana e pela melhor reação morfogênica, foram verificadas nos ápices das plantas cultivadas em casa de vegetação, enquanto as menos satisfatórias foram obtidas nos explantes oriundos de plantas cultivadas no campo.

Palavras-chaves: *Carica papaya*, contaminação fúngica, contaminação bacteriana, micropropagação.

ABSTRACT

CONTAMINATION AND MORPHOGENIC REACTION *IN VITRO* OF PAPAYA EXPLANTS

The contamination by fungi and bacteria and the morphogenic reaction *in vitro* of papaya (*Carica papaya* L. cv. Improved Sunrise Solo Line 72/12) were evaluated

¹ Aceito para publicação em 28.11.2001.

² Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUFES).
Cx. P. 16, 29500-000 Alegre, ES. edilson@npd.ufes.br, augusto@npd.ufes.br

using apices and lateral buds of cultivated under greenhouse conditions and apices of 9 month old plants under field conditions. MS culture was used, supplemented with α -naphthalenoacetic acid (NAA) (0.1 mg L^{-1}) and 6-furfurylaminopurine (kinetin) (5.38 mg L^{-1}). Explants were individually disinfected with sodium hypochloride at 1%, for 15 minutes. The best responses, as evaluated by the lower rates of fungus and bacterial contaminations as well as by a better morphogenic reaction, were verified for the apices of the cultivated plants in the greenhouse, while the least satisfactory ones were obtained for the explants originated from plants under field conditions.

Key words: *Carica papaya*, fungi contamination, bacteria contamination, micropropagation.

INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.), cultivado na faixa compreendida entre os paralelos 32° de latitude norte ou sul (9, 13), encontra no Brasil ótimas condições para o seu crescimento e desenvolvimento (8), sendo as mudas obtidas por via seminífera.

A propagação vegetativa pode ser realizada por estaquia (1, 2). Este método, no entanto, é ineficiente em larga escala (9), e em algumas regiões as plantas não formam ramificações satisfatórias (10). Também é possível a obtenção de propágulos por embriogênese somática, a partir de calo (9, 10). Este método não é aconselhável para propagação clonal, principalmente pelo fato de as células poderem apresentar diferentes níveis de ploidia durante o processo micropropagativo (10). Há, entretanto, evidências de que ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os explantes mais adequados para a propagação clonal *in vitro*, desenvolvendo-se em plantas inteiras, já que possuem determinação para o crescimento vegetativo (5).

Os contaminantes, especialmente as bactérias endógenas, impõem consideráveis limitações mesmo na fase de iniciação *in vitro* (4, 5). Os antibióticos usados para o controle de bactérias podem possuir ação bacteriostática, e não bactericida (5, 16), serem fitotóxicos (5, 15, 22) e conduzir a alterações nas respostas morfogênicas. Os desinfetantes superficiais, como álcool ou hipoclorito de sódio, podem controlar apenas os fungos, mas não garantem níveis aceitáveis de controle de bactérias (21).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a contaminação e a reação morfogênica *in vitro* de explantes cultivados em meio desprovido de antibióticos, provenientes de plantas de mamoeiro de diferentes idades (entre três e nove meses), cultivadas em dois ambientes distintos (casa de vegetação e campo).

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado no município de Alegre, Estado do Espírito Santo, situada a uma altitude aproximada de 270 m e com coordenadas geográficas de 20° 45' S e 41° 30' W.

Utilizaram-se plantas de mamoeiro do cultivar Improved Sunrise Solo line 72/12 provenientes de sementes. A semeadura foi feita em 100 sacos de polietileno pretos (20 x 30 cm), contendo substrato da mistura A, conforme proposto por Marin et al. (13), e três sementes em cada um. Os recipientes foram mantidos sobre bancadas em casa de vegetação, recebendo duas irrigações diárias, até a emergência das plântulas, e uma diária, após a emergência. Quatro semanas após a semeadura foi feito o desbaste, deixando-se apenas a plântula mais vigorosa em cada recipiente. Foi feita uma adubação complementar na 10ª semana após a semeadura, adicionando-se sulfato de amônio (4,0 g), superfosfato simples (5,0 g) e cloreto de potássio (3,0 g) em cada recipiente, em cobertura, dissolvidos em água.

Após dois meses de cultivo em casa de vegetação, as plantas foram divididas em dois grupos de 50, os quais foram conduzidos de maneiras diferentes para retirada dos explantes. No primeiro grupo, as plantas tiveram o ápice caulinar removido e foram conduzidas com apenas as duas principais brotações laterais. Uma destas brotações foi removida aos três meses de idade, constituindo a primeira fonte de explantes (tratamento A). Essas mesmas plantas, com uma brotação lateral remanescente, foram cultivadas no campo e conduzidas neste ambiente por mais seis meses, quando então foram retirados os seus ápices (tratamento B). No segundo grupo, removeram-se os ápices caulinares das plantas cultivadas em casa de vegetação após três meses (tratamento C).

As plantas do primeiro grupo, levadas para o campo, foram cultivadas em covas com dimensões de 0,4 m x 0,4 m x 0,4 m, adubadas, previamente, com esterco bovino curtido e peneirado (5 L), sulfato de amônio (20 g), superfosfato simples (20 g) e cloreto de potássio (10 g). O espaçamento entre plantas foi de 1,0 m x 1,0 m.

Os explantes constituíram-se de brotações laterais, ápices das plantas com três meses cultivadas em casa de vegetação e ápices das plantas com nove meses de idade cultivadas no campo, com tamanho padronizado de 10 mm de comprimento, e foram desinfestados individualmente, conforme proposto por Cohen e Cooper (3), utilizando-se hipoclorito de sódio a 1%, por 15 minutos, seguido por três lavagens em água desionizada estéril.

A inoculação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar. O meio de cultura constituiu-se dos sais e vitaminas de Murashige e Skoog (14), suplementado com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e $5,38 \text{ mg.L}^{-1}$ de cinetina, solidificado com $5,0 \text{ g. L}^{-1}$ de ágar e o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da adição do ágar. Adicionaram-se 15 ml do meio de cultura em tubos de ensaio de 150 x 250 mm, antes de serem autoclavados a $1,05 \text{ kg/cm}^2$ e 121°C por 15 minutos. O ambiente de cultura constituiu-se de bancadas em uma sala de cultivo com lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, fornecendo $25,2 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de fluxo de fótons fotossintéticos, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado, com dez repetições, cada uma constituída por cinco tubos de cultivo *in vitro* contendo explantes. Foram três tratamentos: A = ápices de brotações laterais de plantas cultivadas em casa de vegetação aos três meses de idade; B = ápices de plantas cultivadas no campo aos nove meses de idade; e C = ápices de plantas cultivadas em casa de vegetação aos três meses de idade. Após trinta dias de cultivo *in vitro*, avaliaram-se as variáveis porcentagem de contaminação dos explantes por fungos e bactérias e a porcentagem de reação morfogênica (formação de roseta foliar ou tufo de folhas). Os dados das variáveis foram transformados em arco seno $\sqrt{x/100}$, visando à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,01$), considerando a distribuição binomial conforme apresentada por Gomes (6).

RESULTADOS

Concernente à contaminação microbiana *in vitro*, observou-se visivelmente a presença de fungos e bactérias, algumas vezes num mesmo meio de cultura (Quadro 1).

Os contaminantes fúngicos manifestaram-se nos explantes e na camada superficial do meio de cultura, nos cinco primeiros dias do cultivo *in vitro*, somente em tubos com explantes oriundos do campo. O percentual médio de contaminação bacteriana evidenciou diferenças estatísticas ($P < 0,01$) entre os tratamentos (Quadro 1), sendo superior naqueles cujos explantes procederam do campo (87,34% dos explantes contaminados). Os contaminantes bacterianos manifestaram-se, no decorrer dos dias, na base dos explantes dentro do meio de cultura.

Com relação à reação morfogênica, observou-se resposta estatisticamente significativa ($P < 0,01$) entre os tratamentos, sendo maior nos ápices oriundos da casa de vegetação, onde 83,42% do total

de explantes formaram roseta foliar (Quadro 2). Deve-se destacar que este total de explantes inclui os contaminados por fungos ou bactérias e, mesmo nesta condição, manifestaram potencial para reação morfogênica *in vitro*, não sendo possível, no entanto, aproveitá-los para o processo micropropagativo. Considerando somente os explantes úteis (não contaminados), o tratamento C (ápices aos três meses de idade em casa de vegetação) mostrou-se com porcentagem estatisticamente superior ($P < 0,01$) ao tratamento B, correspondente aos ápices provenientes de plantas do campo aos nove meses de idade (Quadro 2).

QUADRO 1 – Contaminação por fungos e bactérias de explantes de mamoeiro obtidos de três origens distintas (A = ápices de brotações laterais de plantas cultivadas em casa de vegetação aos três meses de idade; B = ápices de plantas cultivadas no campo aos nove meses de idade; e C = ápices de plantas cultivadas em casa de vegetação aos três meses de idade), após trinta dias em meio de cultura contendo sais de MS.

Tratamentos	Fungos	Bactérias
	%	
A	0,00 b	25,97 b
B	45,00 a	87,34 a
C	0,00 b	44,89 b
CV (%)	95,5	36,6

As médias seguidas da mesma letra, na vertical, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,01$).

QUADRO 2 – Reação morfogênica em explantes de mamoeiro em todos os meios de cultura (Todas as culturas) e nos meios de cultura não-contaminados (Culturas não-contaminadas), obtidos de três origens distintas (A = ápices de brotações laterais de plantas cultivadas em casa de vegetação aos três meses de idade; B = ápices de plantas cultivadas no campo aos nove meses de idade; e C = ápices de plantas cultivadas em casa de vegetação aos três meses de idade), após trinta dias em meio de cultura contendo sais de MS.

Tratamentos	Todas as culturas	Culturas não-contaminadas
	%	
A	38,53 b	10,50 ab
B	20,89 b	2,66 b
C	83,42 a	29,89 a
CV (%)	39,8	111,2

As médias seguidas das mesmas letras na vertical não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,01$).

DISCUSSÃO

O alto percentual de contaminantes nos explantes de mamoeiro oriundos do campo também foi verificado por outros autores (10, 12, 21).

A contaminação por fungos ocorre pela constante exposição das plantas matrizes às intempéries em ambiente sem controle, como o vento e a chuva, que poderiam estar conduzindo esporos de fungos para os ápices, nas inserções axilares.

O maior percentual de contaminação bacteriana, considerada endógena, encontrada nos explantes do campo, pode ser explicado pelas condições em que se encontravam as plantas-matrizes. Litz e Conover (12) sugeriram que os contaminantes bacterianos endógenos, que se manifestam *in vitro*, não são fitopatógenos, e que a flutuação periódica em sua porcentagem de contaminação nas plantas-matrizes está relacionada à taxa de crescimento vegetativo das plantas, sendo maior quando essas plantas crescem vagarosamente. Isso também foi verificado neste trabalho, nos explantes retirados das plantas de campo, que concomitantemente apresentavam reduzido crescimento, provavelmente devido à formação de flores e frutos, pois estes são drenos mais fortes que as partes vegetativas (20).

O desenvolvimento de colônias bacterianas a partir da base dos explantes pode ser explicado pelo efluxo dos constituintes do floema (18). Litz e Conover (11) relataram que a adubação equilibrada pode ser um fator importante para a redução dos contaminantes endógenos em mamoeiro. Isso poderia explicar a menor contaminação bacteriana nos explantes oriundos da casa de vegetação, já que as plantas utilizadas foram adubadas duas semanas antes da retirada dos explantes.

A melhor reação morfogênica para explantes da casa de vegetação pode ser explicada pela idade das plantas-matrizes. Segundo George e Sherrington (4), quanto mais jovem o tecido, melhor é a resposta *in vitro*. Quanto à melhor reação morfogênica dos explantes extraídos do ápice, sabe-se que gemas localizadas em diferentes posições morfológicas das plantas podem apresentar comportamentos diferentes, mesmo estando nas mesmas condições ambientais (7), e que as auxinas e citocininas têm efeitos decisivos sobre os processos de diferenciação (19). No presente estudo, utilizaram-se as mesmas concentrações de reguladores de crescimento em todos os tratamentos, em explantes de idade e origens diferentes, o que possivelmente poderia explicar essas diferentes respostas. O fato de os ápices terem melhor resposta que as brotações laterais na mesma idade é normal em espécies herbáceas (5), enquanto no mamoeiro as gemas laterais requerem maior nível de auxina para manifestar reação morfogênica (17).

CONCLUSÕES

1) Explantes de mamoeiro oriundos do campo apresentam maior taxa de contaminação por fungos e bactérias, em relação aos obtidos em casa de vegetação.

2) É possível reduzir a taxa de contaminantes bacterianos acelerando a taxa de crescimento das plantas devidamente adubadas.

3) Explantes oriundos de plantas mais jovens apresentam maior taxa de reação morfogênica *in vitro*, em relação a plantas adultas.

REFERÊNCIAS

1. ALLAN, P. Papaws growth from cuttings. *Farming in South Africa*, 39: 35-40, 1964.
2. ALLAN, P. Papaws research at Pietermaritzburg: production from cuttings. *Farming in South Africa*, 42:15-21, 1967.
3. COHEN, D. & COOPER, P.A. Micropropagation of babaco - A *Carica* hybrid from Ecuador. In: International Congress of Plant Tissue and Cell Cultures, 5^a, Tokio, 1981. Proceedings, Tokio, Japanese Association for Plant Tissue Culture, 1982, p.743-4.
4. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories. Eversley, Exegetics, 1984. 709p.
5. GRATAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: Torres, A.C. & Caldas L.S. (eds.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, ABCTP, EMBRAPA - CNPH, 1990. p. 99-169.
6. GOMES, F. P. Curso de estatística experimental. 13. ed. Piracicaba, Nobel, 1990. 467p.
7. HILLMAN, J. R. Apical dominance. In: Wilkins, M. B. (ed.). Advanced plant physiology. London, Pitman Publishing Limited, 1984. p. 127-48.
8. LEITE, R.S.F. & GARCIA, A.E.B. Aspectos econômicos da produção e mercado. In: Instituto de Tecnologia de Alimentos. Mamão. 2. ed. Campinas, ITAL, 1989. p. 335-67.
9. LITZ, R.E. Papaya. In: Sharp, W.R.; Evans, D.A.; Ammirato, P.V. & Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. Crop species. New York, MacMillan, 1984. p. 349-68.
10. LITZ, R.E. & CONOVER, R. Tissue culture propagation of papaya. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 90: 245-6, 1977.
11. LITZ, R.E. & CONOVER, R. Recent advances in papaya tissue culture. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 91: 180-2, 1978.
12. LITZ, R.E. & CONOVER, R.A. Effect of sex type, season, and other factors on *in vitro* establishment and culture of *Carica papaya* L. explants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106: 792-4, 1981.
13. MARIN, S. L. D.; GOMES, J.A. & SALGADO, J. S. Recomendações para a cultura do mamoeiro cv. Solo no Estado do Espírito Santo. 3. ed. Vitória, EMCAPA, 1987. 64p. (Circular Técnica n^o 3).
14. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*, 15: 473-9, 1962.
15. PEROS, J. P.; TORREGROSA, L. & BERGER, G. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. *Journal of Experimental Botany*, 49: 171-9, 1998.

16. PHILLIPS, R.; ARNOTT, S. M. & KAPLAN, S.E. Antibiotics in plant tissue culture: Rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant cultures of *Heliantus tuberosus*. *Plant Science Letters*, 21: 235-40, 1981.
17. RAJEEVAN, M. S. & PANDEY, R. M. Propagation of papaya through tissue culture. *Acta Horticulturae*, 131: 131-9, 1983.
18. REUVENI, O.; SHLESINGER, D.R. & LAVI, U. *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20: 41-6, 1990.
19. ROBERTS, J. & HOOLEY, R. *Plant growth regulators*. New York, Chapman and Hall, 1988. 190 p.
20. TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Plant physiology*. Redwood City, The Benjamin/Cummings Company, 1991. 559 p.
21. 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*, 56: 249-54, 1997.
22. YEPES, L. M. & ALDWINCKLE, H.S. Micropropagation of 13 *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. *Plant Growth Regulation*, 15: 55-67, 1994.