

## ESTABELECIMENTO DE SEGMENTOS APICAIS DE MAMOEIRO *IN VITRO*<sup>1</sup>

Márcia Torres Teixeira<sup>2</sup>  
Silvio Lopes Teixeira<sup>3</sup>

### RESUMO

Devido à inexistência de protocolos eficientes de propagação assexual do mamoeiro pelas técnicas convencionais, esta espécie tem sido multiplicada tradicionalmente pela semente, apesar dos problemas genéticos que ele apresenta, principalmente quanto à herança do sexo das plantas. Com o desenvolvimento da biotecnologia, a técnica de micropropagação passou a ser indicada como a alternativa potencialmente mais viável para a solução do problema. Todavia, o protocolo de micropropagação já descrito por outros autores para esta espécie, ainda não se encontra suficientemente aperfeiçoado para uso prático. Por este motivo, este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de multiplicação de segmentos apicais do cultivar Sunrise Solo, provenientes de plântulas germinadas *ex vitro* e com três semanas de idade. O meio de cultura semi-sólido constituiu-se basicamente dos sais de MS e vitaminas de White, tendo-se testado concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP em presença de 0,1mg L<sup>-1</sup> de ANA e de 7,52 mg L<sup>-1</sup> de riboflavina e de 0; 0,05; 0,10; 0,15; e 0,20 mg L<sup>-1</sup> de ANA em presença de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, em experimentos concomitantes. O BAP estimulou o alongamento das gemas apicais a concentrações desde 1,0 mg L<sup>-1</sup> até 2,0 mg L<sup>-1</sup>, mas não a quebra de dormência das gemas axilares. O ANA não influenciou na percentagem de calejamento e nem estimulou a rizogênese nos segmentos apicais, mas influenciou no aumento do peso dos calos formados na base dos explantes e no peso da parte aérea.

Palavras-chave: *Carica papaya*, micropropagação, organogênese, calogênese.

---

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 12.04.2004. Apoio da FENORTE.

<sup>2</sup> Bolsista de Apoio Tecnológico (TECNORTE).

<sup>3</sup> Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense. Av. Alberto Lamago, 2000. 28013-600 Campos dos Goytacazes, RJ. E-mail: teixeira@uenf.br

## ABSTRACT

### *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF PAPAYA APICAL SECTIONS

Despite the several disadvantages resulting from its genetic complexity, papaya tree has been traditionally propagated by seeds, due to the lack of efficient conventional asexual propagation protocols for this species. As a result of the biotechnology development, the micropropagation technique has been regarded as the best potential alternative to solve such a problem. Nevertheless, the micropropagation protocol described by other researchers for this species has not received enough refinement yet in order to be used for practical purposes. This work was aimed at establishing a protocol for the Sunrise Solo papaya multiplication, using apical sections from *ex vitro* germinated 3-week old plantlets. The semi-solid culture medium was basically comprised of MS salts and White vitamins. Concentrations of BAP (0 – 0.5 – 1.0 – 1.5 – 0.2 mg L<sup>-1</sup>) in presence of 0.1 mg L<sup>-1</sup> of NAA and of 7.52 mg L<sup>-1</sup> of riboflavin, and concentrations of NAA (0 – 0.05 – 0.10 – 0.15 – 0.20 mg L<sup>-1</sup>) in presence of 1.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP were tried in concomitant experiments. BAP showed to be efficient in enhancing elongation of apical buds in concentrations ranging from 1.0 mg L<sup>-1</sup> to 2.0 mg L<sup>-1</sup>, but did not stimulate axillary branching. NAA did not influence the callusing percentage nor the shoot tip rhizogenesis, but enhanced the shoot basal callus weight and the shoot weight as well.

Key words: *Carica papaya*, micropropagation, organogenesis, callusing.

## INTRODUÇÃO

A propagação do mamoeiro tem sido efetuada tradicionalmente por sementes, devido à inexistência de protocolos para a propagação assexual da espécie, que seria a via preferencial, devido aos inúmeros problemas genéticos que a espécie apresenta. Plantas formadas a partir de sementes provenientes de polinização aberta resultam na mistura de genótipos, com considerável variação em susceptibilidade a doenças e em qualidade e rendimento de frutos (1). De acordo com Rajeevan e Pandey (11), além da heterozigose, constitui problema, para a cultura, a natureza dióica e a suscetibilidade a um grande número de doenças virais. Também o sexo do mamoeiro somente pode ser determinado, com certeza, pelo exame de suas flores, que somente começam a surgir cerca de cinco meses após a germinação da semente, não existindo caráter morfológico nas plantas juvenis que possa ser utilizado na distinção precoce do sexo das plantas (9).

Tendo em vista todos estes problemas, a busca de alternativas de propagação assexual torna-se necessária, constituindo a propagação *in vitro* a alternativa com maior potencial.

Dentre os métodos *in vitro* para a propagação do mamoeiro, a micropropagação por cultura de segmentos apicais e gemas laterais de plantas adultas tem sido proposta como a melhor alternativa para a produção de mudas em larga escala (3, 4, 6, 7, 11, 17). Rajeevan e Pandey (12) afirmam ser esta técnica economicamente viável, no que concordam

Maene e Debergh (8), mas aconselham o enraizamento *ex vitro*, por motivos econômicos, cuja viabilidade já foi demonstrada por Schmildt et al. (15).

O objetivo deste trabalho foi otimizar a técnica de cultura *in vitro* do

### MATERIAL E MÉTODOS

Ápices caulinares de plântulas do cultivar Sunrise Solo, provenientes de sementes e com três semanas de idade, foram utilizados como explantes iniciais. A semeadura foi feita em sacos de polietileno transparentes, contendo o substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>. Os segmentos apicais foram extraídos três semanas após o início da germinação das sementes e desinfestados por 15 minutos em solução de água sanitária Globo<sup>®</sup>, diluída a 0,5% v/v do cloro residual total, contendo uma gota de Tween 20 por 100 mL da solução. Em seguida, os explantes foram enxaguados sucessivamente por três vezes, com água deionizada, autoclavada. A operação de desinfestação e as posteriores foram efetuadas em capela de fluxo laminar.

O meio de cultura constituiu-se dos sais de MS (10), 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, vitaminas de White (15) e 100 mg L<sup>-1</sup> de i-inositol. Esta solução nutritiva serviu como base para se realizarem dois testes: o primeiro com BAP (benzilaminopurina) nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mg L<sup>-1</sup>, todas em combinação com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenoacético) e 7,52 mg L<sup>-1</sup> de riboflavina. O segundo consistiu nas concentrações de 0; 0,05; 0,10; 0,15; e 0,20 mg L<sup>-1</sup> de ANA em combinação com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Estes meios de cultura tiveram o pH ajustado em  $5,7 \pm 0,1$  antes da adição de 8 g L<sup>-1</sup> de agar Vetec<sup>®</sup>, lote 023827. Os meios foram acondicionados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, à base de 20 mL/tubo de ensaio, cobertos com tampa de polipropileno transparente, esterilizados por autoclavagem a 121°C e pressão de 15 lib/pol<sup>2</sup>, por 15 minutos. Em seguida, a parte inferior das tampas dos tubos de ensaio foi envolvida por filme transparente de PVC Rolopac<sup>®</sup>, como medida extra contra contaminação.

O primeiro experimento consistiu de 5 tratamentos e 30 repetições; e o segundo, de 5 tratamentos e 10 repetições. Em ambos os casos, os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, sendo a unidade experimental representada por um tubo de ensaio contendo um explante.

As culturas foram incubadas a  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e irradiância de  $38 \mu\text{mol}$  de fótons. $\text{cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , proporcionada por tubos fluorescentes Silvania<sup>®</sup>, luz do dia, 40W.

Os resultados foram avaliados por meio da percentagem de culturas calejadas, percentagem de ápices caulinares que apresentaram algum alongamento (% de culturas brotadas), peso da massa fresca da parte aérea, desprovida do calo formado na base da cultura, e peso da massa fresca do calo.

Os limites de confiança dos pesos das massas frescas da parte aérea e do calo foram calculados conforme Snedecor (16); e para as percentagens, conforme as tabelas de Rohlf e Sokal (14).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não ocorreu quebra de dormência das gemas apicais, no meio de multiplicação, na ausência de BAP, enquanto a concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  resultou em 20% de culturas com ápices alongados (Quadro 1). Entre as concentrações de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, a porcentagem de culturas com ápices alongados variou entre 43,3 e 53,3%, sem diferenças estatísticas entre elas, mas todas estatisticamente superiores aos dois tratamentos anteriores. Todavia, não ocorreu brotação axilar em nenhum dos tratamentos.

**QUADRO 1** - Número de culturas de segmentos apicais de mamoeiro, iniciais e contaminadas, e número e percentagem de culturas brotadas, em função das concentrações de BAP em combinação com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e de  $7,52 \text{ mg L}^{-1}$  de riboflavina, no meio de multiplicação

Concentrações de BAP ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Nº de culturas		Culturas brotadas*	
	Iniciais	Contaminadas	Nº	%
0	30	0	0	0 ( 0,0-11,6)
0,5	30	8	6	20,0 ( 7,7-38,6)
1,0	30	4	16	53,3 ( 34,3-71,7)
1,5	30	4	13	43,3 ( 25,5-62,6)
2,0	30	3	16	53,3 ( 34,3-71,7)

\*Os números entre parênteses correspondem ao intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Estes resultados discordam daqueles obtidos por Reuveni et al. (13), que observaram brotação axilar e com os melhores resultados em meios contendo  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Da mesma forma, diferentemente do que foi relatado por aqueles autores, não ocorreu calejamento dos segmentos apicais neste trabalho, apesar do ANA na concentração de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  em todos os tratamentos com BAP. Certamente isto se deveu à baixa concentração de ANA e à riboflavina, que inibe esta rota morfogênica em mamoeiro pela aceleração da destruição da auxina adicionada ao meio de cultura, em presença de luz (5). Mesmo com a riboflavina, Drew et al. (2) observaram intensa formação de calo nos explantes, mas as concentrações de auxina por eles utilizadas, bem como o período inicial de cultura no escuro, certamente permitiram a ação desta por algum tempo, antes de ser destruída.

O ANA, no meio de enraizamento, praticamente não exerceu qualquer influência sobre a percentagem de explantes calejados, tendo o calejamento ocorrido igualmente em todos os tratamentos, inclusive no controle, desprovido de ANA (Quadro 2). Nenhuma das concentrações de ANA estimulou o enraizamento, que foi nulo em todos os tratamentos. Este resultado contraria aqueles obtidos por Teo e Chan (17), que observaram o estímulo ao enraizamento do mamoeiro *in vitro*, pelo AIB, quando em combinação com o BAP. Todavia, neste trabalho as concentrações de ANA, de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  e acima desta, em combinação com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e ausência de riboflavina, estimularam o aumento da massa fresca da parte aérea, bem como do calo formado na base dos explantes.

**QUADRO 2** - Número e percentagem de culturas calejadas e massa fresca da parte aérea e do calo, em ápices caulinares de mamoeiro, em função das concentrações de ANA, combinadas com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, no meio de enraizamento

Concentrações de ANA ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Culturas calejadas*		Massa fresca (g)*	
	Nº	%	Parte aérea	Calo
0	4	40 (12,20-73,80)	0,09 (0,08-0,10)	0,06 (0,03-0,09)
0,05	7	70 (34,80-93,33)	0,07 (0,04-0,10)	0,06 (0 - 0,10)
0,10	5	50 (18,20-73,80)	0,13 (0,12-0,14)	0,16 (0,11-0,21)
0,15	7	70 (34,80-93,33)	0,18 (0,11-0,25)	0,21 (0,15-0,27)
0,20	6	60 (26,20-87,80)	0,15 (0,11-0,19)	0,22 (0,11-0,33)

\* Os números entre parênteses correspondem ao intervalo de confiança, a 95% de probabilidade.

## CONCLUSÕES

1) O BAP estimula o crescimento de gemas apicais de segmentos apicais de mamoeiro *in vitro*, a concentrações desde 1,0 até 2,0 mg L<sup>-1</sup>, mas não estimula a quebra de dormência das gemas axilares.

2) O ANA, no meio de enraizamento, não influi na percentagem de calejamento nem a rizogênese na base dos segmentos apicais *in vitro*, mas estimula o aumento do peso dos calos formados na base dos explantes e o peso da parte aérea.

3) A presença de 7,52 mg L<sup>-1</sup> de riboflavina, no meio de multiplicação, parece anular a ação do ANA sobre a rizogênese.

## REFERÊNCIAS

1. DREW, R.A. The effects of medium composition and cultural conditions on "in vitro" root initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Horticultural Science*, 62:551-6, 1987.
2. DREW, R.A.; McCOMB, J.A. & CONSIDINE, J.A. Rhizogenesis and root growth of *Carica papaya* L. *in vitro* in relation to auxin sensitive phases and use of riboflavin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33:1-7, 1993.
3. DREW, R.A. & MILLER, R.M. Nutritional and cultural factors affecting rooting of papaya (*Carica papaya* L.) "in vitro". *Journal of Horticultural Science*, 64:767-73, 1989.
4. DREW, R.A. & SMITH, N.G. Growth of apical and lateral buds of papaw (*Carica papaya* L.) as affected by nutritional and hormonal factors. *Journal of Horticultural Science*, 61:535-43, 1986.
5. DREW, R.A.; SIMPSON, B.W. & OSBORNE, W.J. Degradation of exogenous indole-3-butyric acid and riboflavin and their influence on rooting response of papaya *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 26:29-34, 1991.
6. LITZ, R.E. Papaya. In: Sharp, D.A.; Ammirato, P.V. & Yamada, Y. (eds.). *Handbook of plant cell culture*. New York, Macmillan, 1984. p. 349-68.
7. LITZ, R.E. & CONOVER, R.A. Tissue culture propagation of papaya. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 90:245-6, 1997.
8. MAENE, L.M. & DEBERGH, P.C. Rooting of tissue cultured plants under "in vitro" conditions. *Acta Horticulturae*, 131:201-9, 1983.
9. MEDINA, J.C. Cultura. In: Instituto de Tecnologia de Alimentos. Mamão. Campinas, Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1989, p. 1-177.
10. MURASHIGE, T.M. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-97, 1962.
11. RAJEEVAN, M.S. & PANDEY, R.M. Propagation of papaya through tissue culture. *Acta Horticulturae*, 131:131-9, 1983.
12. RAJEEVAN, M.S. & PANDEY, R.M. Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya* L.) for clonal propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 6:181-8, 1986.
13. 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.
14. ROHLF, F.J. & SOKAL, R.R. *Statistical tables*. San Francisco, W.H. Freeman & Co., 1969. 253 p.
15. SCHMILDT, E.R.; TEIXEIRA, S.L.; CRUZ, C.D.; COUTO, F.A.A. & LANI, E.R.G. Enraizamento de ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) obtidos por cultivo *in vitro* de ápices caulinares. *Revista Ceres*, 44: 339-45, 1997.

16. SNEDECOR, G.W. Statistical methods. Ames, Iowa, The Iowa State College Press, 1946. 485 p.
17. TEO, C.K.H. & 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, 69: 267-73, 1994.