

SACAROSE NA FASE DE ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE MAMOEIRO 'TAINUNG 01'

SUCROSE ON *IN VITRO* ROOTING PHASE OF PAPAYA TREE 'TAINUNG 01'

Edilson Romais SCHMILDT¹
José Augusto Teixeira do AMARAL^{2*}
Omar SCHMILDT³

RESUMO

A propagação seminífera do mamoeiro apresenta problemas de disseminação de doenças e de variabilidade genética decorrentes da polinização livre. A micropropagação surge como alternativa para a produção de mudas de boa qualidade e em grande quantidade a partir de um único explante. Com o objetivo de aprimorar as técnicas de propagação *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 1', geração F₁, testaram-se concentrações de sacarose no meio de cultivo, na fase de enraizamento, a partir do quarto subcultivo. Segmentos nodais oriundos do quarto subcultivo, de 1,5 cm de comprimento, contendo 4 folhas visíveis a olho nu, foram submetidas a cinco concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g L⁻¹), em meio MS, acrescido de 0,2 mg L⁻¹ de AIB. De acordo com os resultados obtidos, a adição de sacarose no meio de cultivo, em concentrações variando de 15 a 30 g L⁻¹, favorece o enraizamento *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'.

Palavras-chave: *Carica papaya*; micropropagação; cultura de tecidos.

ABSTRACT

Seminific propagation of the papaya tree has problems of spread of diseases and genetic variability due to the free pollination. The micropropagation seems to be an alternative for the production of seedlings with satisfactory quality and in great amount, starting from a single explant. With the objective of improve the techniques of propagation *in vitro* of papaya tree 'Tainung 1', generation F₁, sucrose concentrations were assayed in the culture media, in the rooting phase, starting from the fourth subculture. Sprouts originating from of the fourth subculture, of 1.5 cm of length, containing 4 visible leaves with the naked eye, were submitted to five sucrose concentrations (0, 15, 30, 45 and 60 g L⁻¹), in MS culture media, added of 0,2 mg L⁻¹ of IBA. According to the obtained results the sucrose addition in the culture media, in concentrations varying from 15 to 30 g L⁻¹, favors the *in vitro* rooting of papaya tree 'Tainung 01'.

Key-words: *Carica papaya*; micropropagation; tissue culture.

¹Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Adjunto, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, C.P. 16, CEP 29500-000 Alegre-ES;

²Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Adjunto, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, C.P. 16, CEP 29500-000 Alegre-ES. *Autor correspondente jata@cca.ufes.br;

³Engenheiro Agrônomo, Mestrando em Produção Vegetal/CAPES.

INTRODUÇÃO

A cultura do mamoeiro apresenta vários problemas agrônômicos, sendo o principal deles a ocorrência de doenças viróticas (DANTAS e MORALES, 1996; LEITE e GARCIA, 1989; MANSHARDT, 1992). Problemas genéticos também são observados. Plantas obtidas a partir de sementes, provenientes de polinização livre, resultam numa mistura de genótipos com considerável variação em susceptibilidade a doenças e em qualidade e rendimento de frutos (DREW, 1987). Tendo em vista todos estes problemas, a busca de alternativas à propagação seminífera torna-se necessária. A cultura de tecidos pode constituir-se numa técnica eficiente de produção de mudas de mamoeiro com alta qualidade fitossanitária e genética, além de produzir um grande número de plantas provenientes de um único explante.

Uma das etapas mais delicadas da micropropagação do mamoeiro é a transferência das mudas para condições *ex vitro*. Para se obter sucesso durante a aclimatização, faz-se necessário otimizar a fase de enraizamento. Essa fase foi conceituada como estágio III por MURASHIGE (1974), sucedendo aos estádios I e II, que se referem à iniciação e multiplicação *in vitro*, respectivamente. A fase III é uma das mais importantes, pois além da busca de uma quantidade maior de explantes enraizados, objetiva-se também melhorar o padrão destes. Assim, o crescimento de brotações e o de folhas dão indicações de que as plantas obtidas *in vitro* estão se desenvolvendo, estando aptas ao processo de aclimação (SCHMILDT *et al.*, 1997).

Para que o padrão de enraizamento de segmentos nodais micropropagados seja vantajoso, a constituição do meio de cultura precisa ser equilibrada, uma vez que as respostas normalmente variam com a espécie e mesmo entre diferentes genótipos da mesma espécie (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Um dos componentes que merece atenção na constituição do meio de enraizamento são os carboidratos. Os tecidos são capazes de fotossintetizar *in vitro*, mas com taxas muito baixas, necessitando de se estabelecer os níveis ótimos de carboidratos adicionais no meio de cultivo para cada tipo de planta (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). Os carboidratos são necessários ao meio de cultivo de modo a fornecerem energia metabólica durante a respiração, bem como de intermediários metabólicos para a síntese de aminoácidos, de proteínas e de todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento celular, além dos polissacarídeos estruturais (CALDAS *et al.*, 1998).

LOVELL *et al.* (1972) sugerem que exista uma concentração ótima de reserva de carbono em que acima ou abaixo da qual a formação de raízes adventícias é inibida. Segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), uma fonte de energia é indispensável para a rizogênese *in vitro*, sendo que adições de sacarose no meio de cultivo em

concentrações acima de 40 g L⁻¹ podem causar um excessivo decréscimo do potencial hídrico do meio, podendo ocasionar desidratação dos tecidos e levar à deterioração das culturas. Por outro lado, concentrações de sacarose no meio de cultivo menor de 20 g L⁻¹, podem causar clorose generalizada da cultura. No entanto, algumas espécies como *Sequoia sempervirens* (TEIXEIRA, 1981) e o híbrido *Eucalyptus gunni* x *Eucalyptus globolusem* (BOYLAY, 1985) responderam melhor a concentrações de 15 g L⁻¹ de sacarose. Outras espécies respondem melhor a níveis mais altos de sacarose, como *Eriostemon stardust* e *E. myoporoids* em concentrações de 50 g L⁻¹ (AULT, 1984), e morangueiro em concentrações de 45 g L⁻¹ (CALVETE *et al.*, 2002).

Em mamoeiro os níveis de sacarose utilizados no cultivo *in vitro* não têm sido padronizados, com alguns autores utilizando 30 g L⁻¹ (SAHA *et al.*, 2004; SCHMILDT *et al.*, 1997; YU *et al.*, 2000). DREW (1992) subcultivou plantas de mamoeiro *in vitro*, observando, que ao fim do terceiro subcultivo, as plantas crescidas em meio de cultivo contendo 10 g L⁻¹ de frutose, em comparação com 20 g L⁻¹ de sacarose, exibiram crescimento reduzido de raízes e brotações, bem como aumento do tempo de enraizamento. Para o mamoeiro 'Tainug 01' há carência de registros na literatura indicando o melhor nível de sacarose para o enraizamento *in vitro* de segmentos nodais micropropagados. Tem-se constatado que na ausência de sacarose ocorre uma drástica redução no número de segmentos nodais enraizados *in vitro* de mamoeiro (DREW e MILLER, 1989), podendo até mesmo ampliar o tempo de enraizamento. FITCH *et al.* (2003) verificaram que os segmentos nodais enraizaram na ausência de sacarose no meio de cultivo, apenas 1 a 2 meses depois de inoculados *in vitro*.

O objetivo deste trabalho foi o de aprimorar a técnica de micropropagação *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 1', geração F₁, avaliando efeitos da concentração de sacarose em meio MS na fase de enraizamento.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, em Alegre-ES. Os cultivos foram realizados em sala de cultura, sob lâmpadas fluorescentes fornecendo 22,8 μmol m⁻²s⁻¹ de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27 ± 2 °C.

Os explantes constituíram-se de segmentos nodais oriundos de plântulas micropropagadas de mamoeiro (*Carica papaya* L.) 'Tainung 01' geração F₁, os quais foram obtidos a partir de ápices caulinares de plantas com quatro meses de idade em casa de vegetação e mantidos no laboratório por 4 subcultivos em meio MS (20), suplementado com BAP (6 - Benzilaminopurina) a 0,45 mg L⁻¹,

ANA (ácido α -naftaleno-acético) a $0,093 \text{ mg L}^{-1}$ e sulfato de adenina a 30 mg L^{-1} . Selecionaram-se 100 segmentos nodais do material micropropagado, os quais foram padronizados em $1,5 \text{ cm}$ de comprimento, contendo 4 folhas visíveis a olho nu. Os segmentos nodais foram então repicados para o meio de cultivo *in vitro*, em meio MS, suplementado com AIB (ácido 3-indolbutírico) a $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ e sacarose nas concentrações de 0, 15, 30, 45 e 60 g L^{-1} . O pH dos meios de cultivo foi ajustado para 5,7, e o volume foi padronizado em 20 ml , contidos em tubos de ensaio de $25 \times 150 \text{ mm}$. Antes da repicagem os tubos contendo os meios de cultivo foram autoclavados a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e pressão de 15 lib pol^{-2} , durante 15 minutos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 repetições. Cada parcela constou de quatro tubos de ensaio, sendo um explante em cada tubo, perfazendo um total de 25 unidades amostrais. Após cinco semanas em sala de cultivo foram feitas as determinações conforme SCHMILDT *et al.* (1997), avaliando-se o enraizamento, o crescimento de segmentos nodais, o comprimento da

maior folha, o número de raízes por broto, o comprimento médio das raízes e, a cada 7 dias, a evolução do enraizamento do 14º até o 35º dia após a inoculação *in vitro*.

Os dados das três primeiras variáveis foram submetidos à análise de variância. As significâncias das diferenças entre as médias foram avaliadas pelo teste de regressão, pelo software Genes (CRUZ, 2001). Para essas três variáveis fez-se também medida da associação entre si pela correlação de Pearson. As demais variáveis foram avaliadas pela estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de sacarose que promoveu o máximo enraizamento de segmentos nodais foi de $25,45 \text{ g L}^{-1}$, proporcionando um percentual de enraizamento de 44,7% (Figura 1). Nas concentrações de 45 e 60 g L^{-1} os percentuais de enraizamento foram de aproximadamente 19 e 6%, respectivamente, enquanto que na ausência de sacarose o percentual de enraizamento foi de 23%.

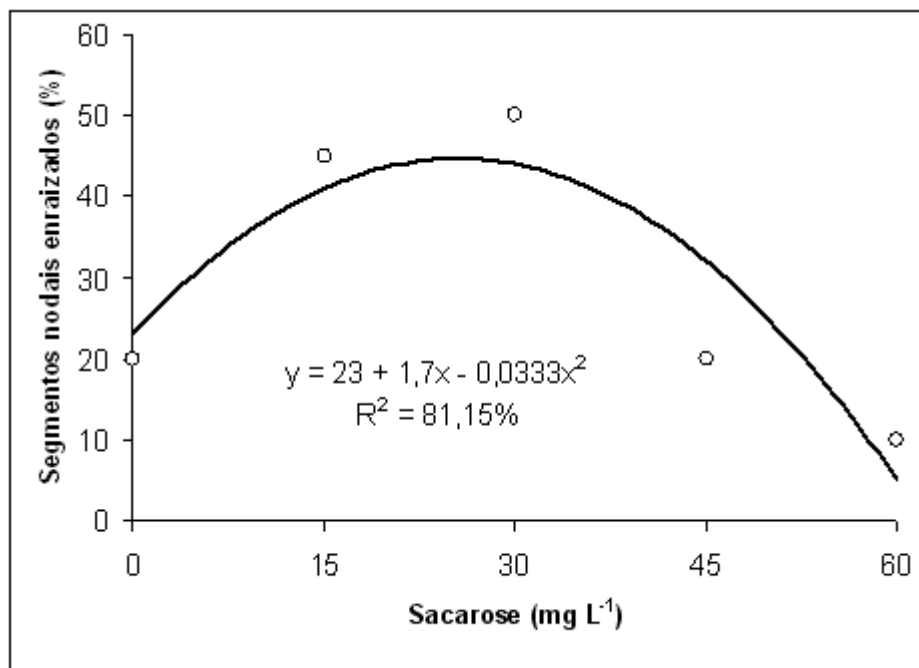


FIGURA 1 – Percentagem de enraizamento de segmentos nodais de mamoeiro 'Tainung 01' em meio MS contendo diferentes concentrações de sacarose.

DREW e MILLER (1989) obtiveram baixo enraizamento *in vitro* em mamoeiro na ausência de sacarose. LOVELL *et al.* (1972) sugeriram que concentração de carbono acima ou abaixo das concentrações ótimas nos explantes pode inibir a formação de raízes adventícias. CALVETE *et al.* (2002) observaram que na ausência de sacarose, na fase de enraizamento *in vitro*, em morangueiro, não houve

desenvolvimento de raízes, sendo que plantas produzidas na concentração de 45 g L^{-1} apresentaram maior enraizamento.

As concentrações de sacarose que corresponderam ao máximo crescimento de segmentos nodais e da maior folha foram de $28,9 \text{ g L}^{-1}$ e $29,4 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 2). O comprimento médio das raízes também seguiu essa tendência promovendo o

crescimento das raízes, com comprimentos médios em torno de 1 cm, nas concentrações de 15 e de 30 g L⁻¹, enquanto que nos níveis de

0, 45 e 60 g L⁻¹ o comprimento médio das raízes foi próximo de 0,4; 0,7 e 0,6 cm, respectivamente (Figura 3).

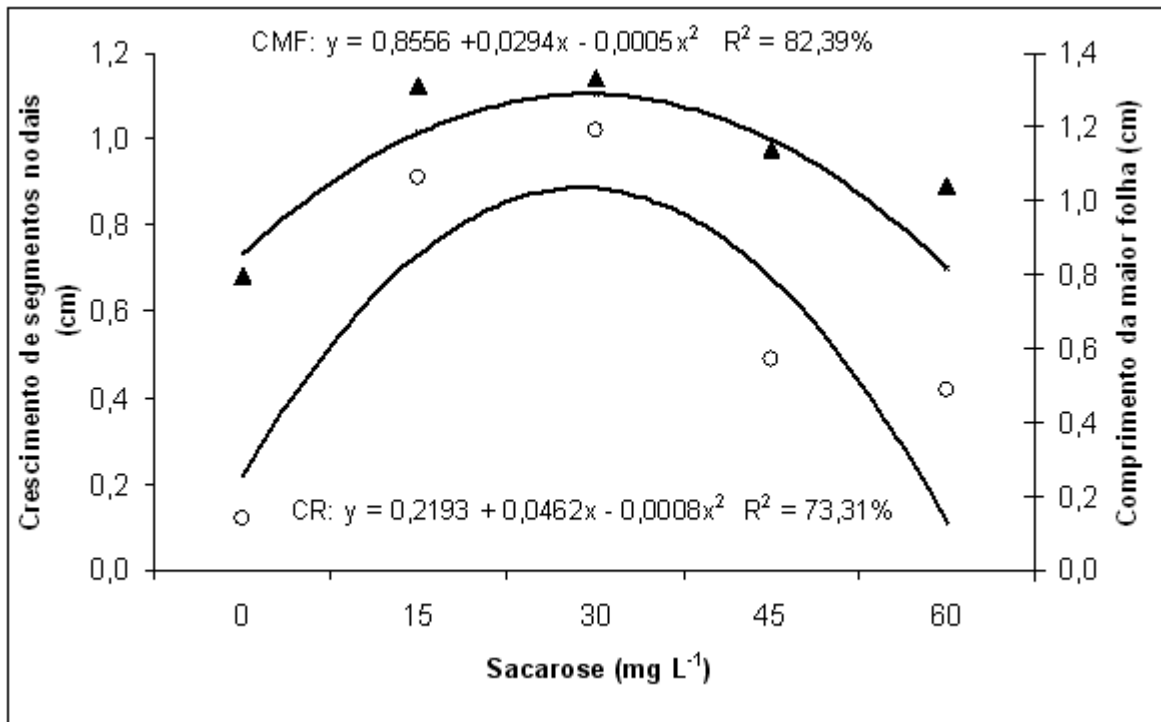


FIGURA 2 – Crescimento de segmentos nodais (CR) e comprimento da maior folha (CMF) de mamoeiro 'Tainung 01' em meio MS contendo diferentes concentrações de sacarose.

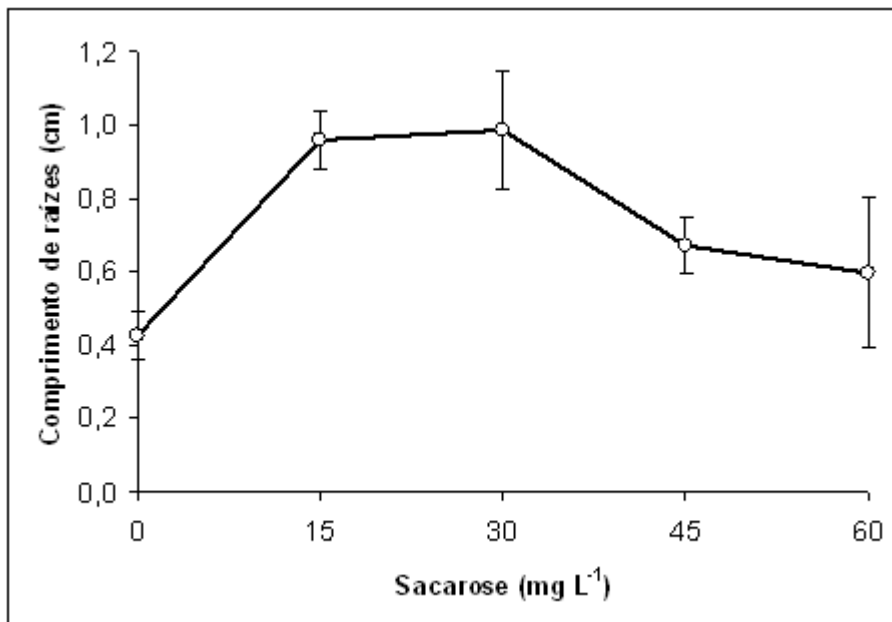


FIGURA 3 – Comprimento médio de raízes formadas em segmentos nodais de mamoeiro 'Tainung 01' em meio MS contendo diferentes concentrações de sacarose. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Os cálculos das correlações de Pearson entre essas variáveis e os crescimentos radiculares resultaram em valores relativamente altos, sendo de 87,37% entre enraizamento e crescimento de segmentos nodais, de 76,44% entre enraizamento e comprimento da maior folha e de 97,12% entre crescimento de segmentos nodais e comprimento da maior folha. De acordo com esses resultados verificou-se padrão semelhante das curvas de respostas para essas três variáveis em relação aos níveis de sacarose no meio de enraizamento.

Na ausência de sacarose as folhas apresentaram-se aclorofiladas evidenciando a necessidade de adição de sacarose no meio de cultivo *in vitro* na fase de enraizamento de explantes de mamoeiro. Sabe-se que a formação de raízes requer energia, oriunda da fotossíntese ou de outra fonte. Segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), uma fonte exógena de carboidratos é indispensável à rizogênese *in vitro*, sendo que adições de sacarose no meio de cultivo em concentrações menores de 20 g L⁻¹ podem causar clorose generalizada da cultura. Em contraposição, adições de sacarose no meio de cultivo em concentrações acima de 40 g L⁻¹ podem causar desidratação dos tecidos e levar à deterioração das culturas.

De fato, nos níveis de 45 e 60 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultivo observou-se coloração deteriorada dos segmentos nodais, variando de amarela a castanha. Isto pode ser explicado pelo decréscimo excessivo do potencial hídrico do meio de cultivo, conforme descrito por GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998), com valores de potenciais osmóticos de -0,300 e -0,461 MPa, respectivamente. CAPELLADES *et al.* (1991) e HDIDER e DESJARDINS (1994) sugerem ainda que *in vitro* não há atividade fotossintética em presença de altas concentrações de sacarose, devido ao acúmulo de amido ou à inibição da enzima Rubisco. Reduções nas taxas fotossintéticas em decorrência do acúmulo de amido nas folhas de cafeeiro foram

demonstradas por DA MATTA *et al.* (1997).

Em função dos resultados alcançados, demonstrou-se a importância da adição de sacarose no meio de cultivo *in vitro* de mamoeiro em concentrações adequadas, de modo a garantir o crescimento, o desenvolvimento e a diferenciação dos tecidos.

Os tecidos vegetais são capazes de fotossintetizar *in vitro*, com taxas variáveis conforme a espécie, sendo imprescindível estabelecer os níveis adequados de açúcares exógenos no meio de cultivo para cada tipo de planta (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). GROUT, citado por CALVETE *et al.* (2002) agrupou as plantas com relação à capacidade fotossintética em duas classes: na primeira, foram agrupadas as plantas cujas folhas formadas *in vitro* não desenvolvem capacidade fotossintética, se crescem em meio contendo sacarose, sendo chamadas heterotróficas e mixotróficas; na segunda classe foram agrupadas as plantas adaptadas a condições autotróficas *in vitro*, as quais podem sintetizar significativamente apesar das condições artificiais de cultivo. Com base nas colorações dos explantes de mamoeiro, nas condições de estudo, estes aparentemente apresentaram baixas taxas fotossintéticas, respondendo como plantas heterotróficas.

O número médio de raízes formadas nos segmentos nodais foi muito próximo nos níveis 15, 30 e 0 g L⁻¹ de sacarose, com valores de 3,35; 2,87 e de 2,75 raízes por ramo, respectivamente (Figura 4). Já as concentrações de sacarose de 45 e 60 g L⁻¹ promoveram menores emissões de raízes formando, respectivamente, 1,80 e 2,01 raízes por ramo. A emissão de raízes pelos níveis mais altos de sacarose poderia ser explicada pela redução do potencial osmótico do meio de cultivo, causando distúrbios no metabolismo, decorrentes da deficiência hídrica, resultando em menor crescimento das plantas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

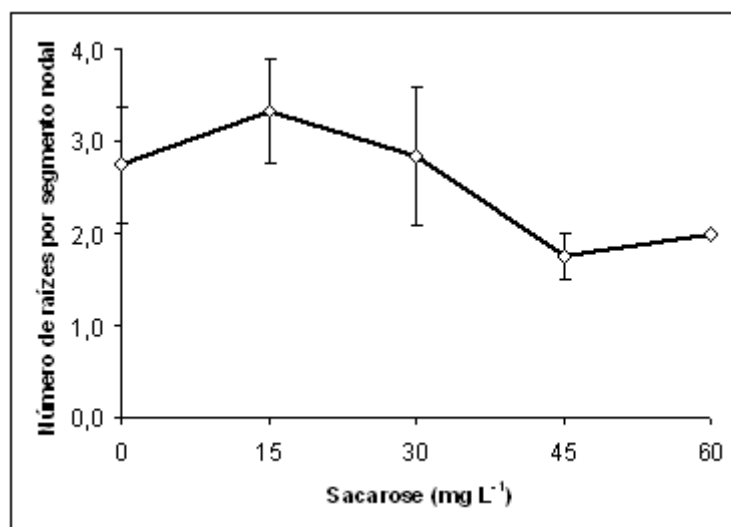


FIGURA 4 – Número de raízes formadas em segmentos nodais de mamoeiro 'Tainung 01' em meio MS contendo diferentes concentrações de sacarose. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Pela evolução do tempo de enraizamento verifica-se que na ausência de sacarose as raízes só foram observadas a partir do 21º dia após inoculação dos ramos, mantendo-se em baixos percentuais de enraizamento até ao final do experimento (Figura 5). Esses resultados estão de acordo com os obtidos para o mamoeiro por outros pesquisadores (DREW e MILLER, 1989; FITCH *et al.*, 2003). DREW e MILLER (1989) observaram baixos níveis de enraizamento na ausência de sacarose. FITCH *et al.* (2003) notaram que na ausência de

sacarose o enraizamento ocorreu tardiamente, somente após 1 a 2 meses da inoculação. No presente estudo, acompanhou-se a evolução do crescimento das raízes até ao 35º dia, e um tempo além deste não se justificaria, visto que na ausência de sacarose, os segmentos nodais já se apresentavam aclorofilados nessa ocasião. Em contraste, aos 14 dias após a inoculação, maiores percentuais dos segmentos nodais haviam enraizado nas concentrações de sacarose 15 e de 30 g L⁻¹, e em menores percentuais nos níveis de 45 e de 60 g L⁻¹.

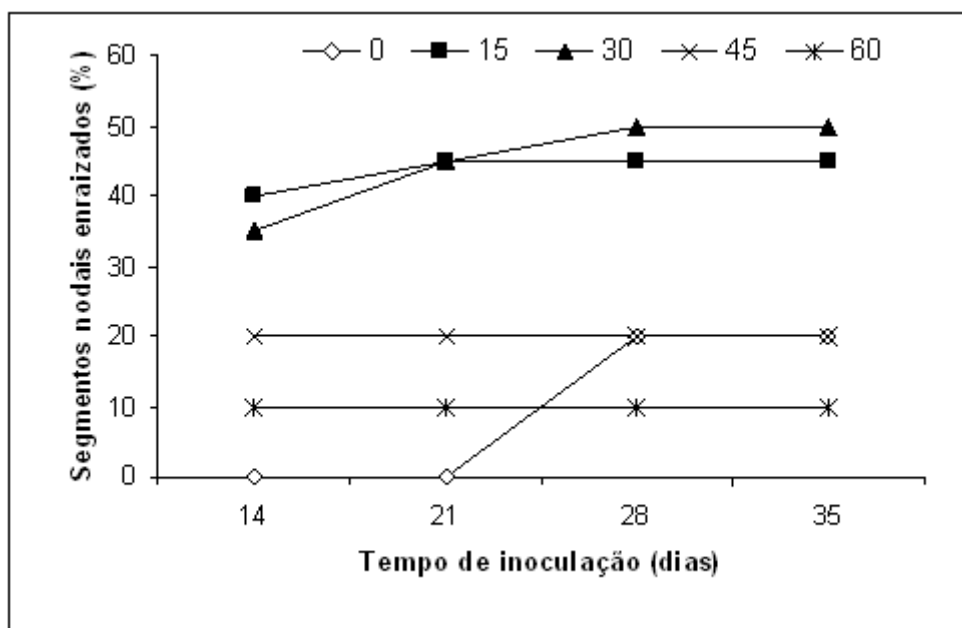


FIGURA 5 – Evolução do percentual de enraizamento de segmentos nodais de mamoeiro 'Tainung 01' durante o tempo de incubação em meio MS contendo diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g L⁻¹).

CONCLUSÃO

Concentrações de sacarose no meio de cultivo

entre 15 e 30 g L⁻¹ promovem um melhor enraizamento *in vitro* de explantes de mamoeiro 'Tainung 01'.

REFERÊNCIAS

1. AULT, J.R. *In vitro* propagation of *Eriostemon myoporoides* and *Eriostemon stardust*. **HortScience**, v. 29, n. 6, p. 686-688, 1984.
2. BOYLAY, M. **Aspects pratiques de la multiplication *in vitro* des essences forestiers**. Nangis: Afocel, 1985. p. 9-43.
3. CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPB, 1998. p. 87-132.
4. CALVETE, E.O.; KÄMPF, A.N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20 n. 2, p. 186-191, 2002.
5. CAPELLADES, M.; LEMEURE, R.; DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 25, n. 1, p. 21-26, 1991.
6. CRUZ, C.D. **Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001. 648 p.
7. Da MATTA, F.M.; MAESTRI, M.; MOSQUIM, P.R.; BARROS, R.S. Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. **Plant Science**, v. 128, p. 43-50, 1997.
8. DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. Melhoramento genético do mamoeiro. In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G (Eds.). **Mamão no Brasil**. Cruz das Almas: EUFBA/EMBRAPA CNPMF, 1996. p. 121-143.
9. DREW, R.A. Improved techniques for *in vitro* propagation and germoplasm storage of papaya. **HortScience**, v. 27, n. 10, p. 1122-1124, 1992.
10. DREW, R.A. The effects of medium composition and conditions on *in vitro* initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of Horticultural Science**, v. 62, p. 551-556, 1987.

11. DREW, R.A.; MILLER, R.M. Nutritional and cultural factors affecting rooting of papaya (*Carica papaya* L.) *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, v. 64, p. 767-73, 1989.
12. FITCH, M.M. *et al.* Photoautotrophic rooting and growth of papayas *in vitro*. **Annals Society of Plant Physiologists (Abstract)**, p. 572, 2003.
13. GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics limites, 1984. 593 p.
14. GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.1. Brasília: Embrapa-SPI, Embrapa-CNPQ, 1998. p. 183-260.
15. HDIDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 1, n. 36, p. 27-33, 1994.
16. LEITE, R.S.S.F.; GARCIA, A.E.B. Aspectos econômicos da produção e mercado. In: MEDINA, J.C.; BLEINROTH, E.W.; SIGRIST, J.M.M.; MARTIN, Z.J. NISIDA, A.L.A.C.; BALDINI, V.L.S.; LEITE, R.S.S.F.; GARCIA, A.E.B (eds.). **Mamão**. 2. ed. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1989. p. 335-367.
17. LOVELL, P.H.; ILLSLEY, A.; MOORE, K.G. The effects of light intensity and sucrose on root formation photosynthetic ability, and senescence in detached cotyledons of *Sinapis alba* L. and *Raphanus sativus* L. **Annals of Botany**, v. 36, p. 123-34, 1972.
18. MANSHARDT, R.M. Papaya. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. (Eds.). **Biotecnology of perennial fruit crops**. Cambridge: University Press, 1992. p. 489-511.
19. MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, 1974.
20. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
21. SAHA, M.; PHATAK, A. CHANDRA, N. *In vitro* culture studies in four dioecious varieties of *Carica papaya* L. Using axillary buds from field-grown plants. **Journal of Tissue Research**, v. 4, n. 2, p. 211-214, 2004.
22. SCHMILDT, E.R.; TEIXEIRA, S.L.; CRUZ, C.D.; COUTO, F.A.D.; LANI, E.R.G. Enraizamento de ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) obtidos por cultivo *in vitro* de ápices caulinares. **Revista Ceres**, v. 44, n. 253, p. 339-345, 1997.
23. TEIXEIRA, S.L. **Factores affecting rhizogenesis in stem culttings**. Riverside, 1981. 222 f. Tese (PhD) - University of California.
24. YU, T.A.; YEH, S.D.; CHENG, Y.H.; YANG, J.S. Efficient rooting for establishment of papaya plantlets by micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, n. 1, p. 29-35, 2000.

Recebido em 18/05/2006

Aceito em 18/12/2006