

# DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES DE MAMOEIRO TAINNUNG Nº 1 SEM O USO DE ANTIBIÓTICOS

**Flávio Santos Lopes**<sup>1</sup>, **Rithiely da Paschoa Queiroz**<sup>2</sup>, **Priscila Andrade Silva**<sup>3</sup>, **Edilson Romais Schmidt**<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Bolsista, CNPq / PIBIC, Universidade Federal do Espírito Santo. Rua Vitório Albani, 67 B, CEP 29 500-000 Alegre – ES e-mail: fslindo@ig.com.br

<sup>2</sup> Bolsista CNPq / PIBIC, colaboradora do projeto, Universidade Federal do Espírito Santo. Auto universitário, s/n, CEP 29 500-000 Alegre – ES e-mail: rithi.pq@bol.com.br

<sup>3</sup> Colaborador do projeto (voluntário), Universidade Federal do Espírito Santo. Auto universitário, s/n, CEP 29 500-000 Alegre – ES e-mail: prianxieta@bol.com.br

<sup>4</sup> Professor orientador DS/FIT, Universidade Federal do Espírito Santo. Auto universitário, s/n, CEP 29 500-000 Alegre – ES e-mail: edilson@cca.ufes.br

**Palavras-chave:** *Carica papaya*, Cultura *in vitro*, bactérias endógenas

**Área do Conhecimento:** V - Ciências Agrárias

**Resumo** – Contaminação em meios de cultura é um problema limitante a propagação massal de mudas de mamoeiro (*Carica papaya* L.). Objetivou-se neste trabalho a descontaminação dos explantes de forma a não aumentar os custos da muda micropropagada. Para tal foram utilizadas plantas em estágio juvenil em pleno crescimento. Os tratamentos utilizados constituíram da combinação de dois fatores, ambiente (campo e casa de vegetação) e tipo de explante (ápice e brotação lateral). O experimento foi avaliado por 30 dias e verificou-se que a interação foi não significativa, porém o fator ambiente apresentou diferença significativa para obtenção de mudas livres de contaminantes endógenos.

## Introdução

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta nativa da América tropical. No Brasil a cultura tem elevada importância econômica para os estados produtores, pois com expansão de mercado de frutos destinados à exportação, aumento-se as áreas plantadas, notadamente nos estados do Pará, Bahia e Espírito Santo [1].

O Brasil é o principal produtor de mamão, tendo contribuído com quase dois milhões de toneladas por ano o que tem correspondido à cerca de 35% da produção mundial [2, 3]. Todavia, a cultura continua apresentando vários problemas agrônômicos, sendo o principal deles as doenças viróticas [4, 5]. Isso exige uma prática agrícola de constante vigilância sanitária pela prática do roquing (eliminação de plantas doentes). Outro problema de ordem econômica diz respeito ao tipo floral do mamoeiro, diretamente ligado ao sexo da planta. Este, por sua vez, só pode ser determinado, com certeza, pelas suas flores, que apenas começam a surgir aos cinco meses ou mais, depois de germinada a semente; isto porque não existe nenhum caráter juvenil nas plântulas que possa ser utilizado para distinção precoce dos sexos em mamoeiros [6]. Desta forma, o uso de 3 a 4 mudas por cova de plantio passa a ser uma prática comum nas plantações comerciais, encarecendo o produto, pois a semente do mamão do grupo Formosa, são importadas e de preço elevado.

Tendo em vista estes problemas quando as plantas são obtidas via seminífera, a busca de alternativas torna-se necessária. A micropropagação do mamoeiro, pode ser a solução. Cultura de ápices caulinares e gemas laterais de plantas adultas, têm sido descritos [7 - 14], todavia, a micropropagação ainda não é viável economicamente, por não apresentar uma metodologia eficiente, ou seja, específica para diferentes variedades que possa permitir vencer os principais obstáculos à propagação, dentre os quais temos: conseguir desinfestação eficiente dos explantes sem o uso de antibióticos, porque encarecem o preço final da muda; conseguir várias gerações de subcultivos *in vitro* a partir de plantas superiores geneticamente.

Este trabalho faz parte de um projeto que visa desenvolver uma metodologia de multiplicação vegetativa do mamoeiro Tainnung nº1, por cultivo de ápices caulinares de plantas juvenis, livres de contaminantes, sobretudo bactérias endógenas, que impõem limitações na fase de cultivo *in vitro* [15, 16]. Justificou-se este trabalho a inexistência de um protocolo micropropagativo eficiente para o mamoeiro comercial; a menor taxa de contaminação *in vitro* de explantes oriundos de plantas juvenis, quando comparadas a plantas adultas; a reação morfogênica de tecidos juvenis ser maior que a de tecidos adultos, o que possibilita uma maior taxa de multiplicação e maior número de subcultivos *in vitro*, o que no final é traduzido em

maior número de plantas obtidas a partir de cada explante inicial.

## Materiais e Métodos

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

O trabalho foi executado no período de janeiro a dezembro de 2003, em duas etapas, realizadas fora e dentro do laboratório. A primeira etapa teve início em casa de vegetação com o plantio de sementes em 250 sacolas de polietileno com volume de 0,5 L. As sacolas foram mantidas em bancadas na casa de vegetação e irrigadas duas vezes ao dia, até a emergência das plântulas e uma vez após a germinação e estabelecimento das plantas. Na quinta semana, foram selecionadas 200 mudas, das quais foram transplantadas 100 para sacolas contendo 1,5 L de substrato composto de três partes de terra e uma de esterco bovino, em casa de vegetação, as outras 100 plantas foram levadas para o campo e plantadas em covas de 0,4 m x 0,4 m x 0,4 m e espaçamento de 2,5 m x 1,5 m, adubadas com 3 L de esterco bovino complementadas com 50 g de superfosfato simples e 25 g de cloreto de potássio.

Os tratamentos foram constituídos da interação de dois fatores, sendo dois ambientes (casa de vegetação e campo) e dois tipos de explantes (ápice e brotação lateral), conforme Tabela 01.

Tabela 1 – Interação entre os fatores para obtenção dos tratamentos

Ambientes	Tipo de Explante	
	Ápice e	Brotação Lateral
Casa de vegetação	A	B
Campo	C	D

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados para disposição das plantas no campo e em casa de vegetação. Cada um dos ambientes contou com 100 plantas.

A obtenção de brotações laterais se deu após excisão dos ápices de parte das plantas da casa de vegetação e campo, na nona semana, para que ocorresse a quebra da dominância apical e as gemas laterais pudessem se desenvolver, e que constituíram os tratamentos B e D. Na décima semana todas as plantas foram adubadas com NPK, pois segundo proposto por [17] a devida adubação pode acelerar o crescimento

vegetativo da planta e reduzir a taxa de contaminantes bacterianos.

Na décima segunda semana iniciou-se a segunda etapa do trabalho. Com 48 horas da retirada dos explantes, foi realizada a aplicação com suspensão à base de 0,7g.l<sup>-1</sup> de thiophanate methyl (1g.l<sup>-1</sup> de Methyil Thiofan) e 0,018 g.l<sup>-1</sup> de abamectina (1ml.l<sup>-1</sup> de Vertimec) para minimizar problemas com fungos e ácaros.

Os explantes foram retirados e levados para o laboratório em recipientes devidamente identificados para que não fosse perdida a rastreabilidade dos plantas matrizes, pois o tipo floral destas ainda não era conhecido. Em laboratório foram retirados os primórdios foliares, e enxaguados em água esterilizada para retirada do excesso de látex e inóculos de patógenos. Feito isso, os explantes foram imersos, sob agitação a 80 rpm, em solução de detergente Tween 20, por cinco minutos, bem como em 100 mL de solução de fungicida thiophanate methyl (0,5 g.l<sup>-1</sup> de Methyil Thiofan) e de abamectina (0,5ml.l<sup>-1</sup> de Vertimec) por 10 minutos, seguido de hipoclorito de sódio a 1% por 15 minutos. Os explantes foram então transferidos para câmara de fluxo laminar horizontal de bancada da marca Pachane, modelo PA210P e enxaguados 3 vezes em água destilada e deionizada. Em câmara de fluxo laminar as plantas foram inoculadas em meio de cultura, que se constitui dos sais de MS [18] suplementados com os reguladores de crescimento Cinetina a 5,38 mg/L e ANA a 0,93 mg/L, conforme proposto [11], para cultivo in vitro de ápices oriundos de plantas juvenis de mamoeiro. O meio de cultura teve o seu pH ajustado em 5,7 ± 0,1 em um medidor de pH de marca Marconi e modelo PA 200 antes da adição do solidificante ágar da marca Lafan usado a 7,0 g/L. Foram usados 20 ml de meio de cultura em tubos de ensaio de 25 x 150 mm. A esterilização dos meios de cultura foi feita em uma autoclave de marca Bio Eng modelo A 50, a temperatura de 121 °C e a pressão de 1,05 kg/cm<sup>2</sup>, durante 15 minutos. As condições de cultivo da sala de crescimento foram ajustadas com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 1,2 Klux fornecida por lâmpadas do tipo luz do dia [19, 20].

Os explantes foram avaliados no período de um mês, os tubos que apresentaram contaminação foram eliminados e a cada cinco dias foram realizadas contagens para posterior análise dos dados.

## Resultados

Verificou-se que as plantas provenientes de casa de vegetação apresentaram apenas uma brotação lateral enquanto as plantas provenientes

do campo apresentaram maior número de brotações, em média de três por planta.

Observou-se também que para o controle das bactérias não houve interação entre ambiente e tipo de explante como verificado na Tabela 2. No entanto evidenciou-se diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os ambientes como verificado na Tabela 3.

Tabela 2 – Análise de variância da contaminação por bactérias

Tratamento	GL	QM	F
Ambiente	1	1620	10,07 *
Tipo	1	180	1,12 <sup>ns</sup>
Amb x Tip	1	320	1,99 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	160,83	
Total	19		-

\* - significativo pelo teste de F a 5% de Probabilidade

<sup>ns</sup> - Não significativo pelo teste de F a 5% de Probabilidade

Tabela 3 – Efeitos do ambiente na contaminação bacteriana de explantes de mamoeiro, em meio de cultura contendo sais de MS, sem a adição de antibióticos.

Tratamentos	Contaminação
	%
Casa de vegetação	77 B
Campo	95 A
CV(%)	14,74

Médias seguidas por letras diferentes, na vertical, diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Discussão

As plantas de campo apresentaram maior número de brotações laterais, pois o grande volume de solo contribuiu com uma maior disponibilidade de nutrientes, enquanto as raízes das plantas que estavam em casa de vegetação, foram limitadas pelas sacolas. Observando este resultado verifica-se que a obtenção de um maior número de explantes para a cultura de tecidos de uma matriz, com características desejáveis, é possível quando as plantas são cultivadas em campo.

O alto percentual de contaminantes de mamoeiro oriundos do campo também foi verificado por outros autores [20, 21, 22]. O maior percentual de contaminação bacteriana, considerada endógena, encontrada nos explantes do campo, pode ser explicado pelas condições que se encontram as plantas-matrizes.

A contaminação bacteriana é prejudicial ao desenvolvimento da planta *in vitro*, pois ao descer para o meio, esta passa a competir com a planta, formando um halo em torno da base da planta ou tomando conta de todo meio.

## Conclusão

1 - O maior nível de contaminação bacteriana foi observado nas plantas provenientes do campo onde estão mais expostas as ações de insetos sugadores, que podem ser vetores de doenças, e a uma maior variação de ambiente.

2 - É conveniente estudar as bactérias, chamadas endógenas, que tem se manifestado na micropropagação do mamoeiro, para saber quais são as suas funções dentro das plantas e a possibilidade de controle com antibióticos e as respectivas dosagens.

## Agradecimentos

Ao Banco do Nordeste pelo financiamento do projeto, ao CNPq pela concessão de bolsas de estudo e a todos que nos incentivam a continuar pesquisando.

## Referências

- [1] MARIN, S.L.D.; SILVA, J.G.F. Aspectos econômicos e mercados para a cultura do mamoeiro do grupo solo na região norte do Espírito Santo. In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. (Eds.). **Mamão no Brasil**. Cruz das Almas, BA: EUFBA/EMBRAPA CNPMF. 1996. p.7 a 20.
- [2] FAO PRODUCTION YEARBOOK. Rome, FAO, 1997. V.51.
- [3] FAO PRODUCTION YEARBOOK. Rome, FAO, 2000. V.54.
- [4] DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. Melhoramento genético do mamoeiro. In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. **Mamão no Brasil**. Cruz das Almas, BA: 1EUFBA/EMBRAPA CNPMF, p. 121 a 143, 1996.
- [5] 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. **Mamão**. 2 ed. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1989. p. 335-367.
- [6] MEDINA, J.C. Cultura. 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. **Mamão**. 2 ed. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1989. p. 1-177.
- [7] DREW, R.A. Improved techniques for in vitro propagation and germoplasm storage of papaya. **HortScience**, v. 27, p. 1122 a 1124, 1992.
- [8] LITZ, R.E.; & CONOVER, R.A. "In vitro" propagation of papaya. **Hort. Sci.**, v. 13, n. 3, p. 241-242, 1978a.
- [9] LITZ, R.E.; & CONOVER, R.A. Recent advances in papaya tissue culture. **Proc. Fla. Sta. Hort. Soc.**, v. 91, p. 180-182, 1978b.
- [10] MONDAL, M.; GUPTA, S.; MUKHERJEE, B.B. In vitro propagation of shoot buds of *Carica papaya* L. (Caricaceae) Var. Honey Dew. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 609 a 612, 1990.
- [11] RAJEEVAN, M.S.; PANDEY, R.M. Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya* L.) for clonal propagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 6, n. 2, p. 181-188, 1986.
- [12] REUVENI, O.; SHLESINGER, D.R. Rapid vegetative propagation of papaya plants by cuttings. **Acta Horticulture**, v. 275, p. 301 a 306, 1990.
- [13] VIANNA, G.R. **Micropropagação do mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizando ápices caulinares de plantas adultas**. Viçosa, MG, UFV, 1996. 66p. (Tese de Mestrado).
- [14] WINNAAR, W. Clonal propagation of papaya in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.12, p. 305 – 310, 1988.
- [15] GEORGE, E.F. ; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture-handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley, Exegetics, 1984. 709p.
- [16] GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In TORRES , M.A.; CALDAS, L.S. eds. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP, EMBRAPA-CNPQ . 1990. p. 99 - 169.
- [17] SCHMILDT, E.R.; AMARAL, J.A.T., Contaminação e reação morfogênica in vitro de explantes do mamoeiro. **Revista Ceres**, v. 49, p. 63-70, 2002.
- [18] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- [19] SCHMILDT, E.R. **Enraizamento "in vitro" e "ex vitro" de ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 76p. (Tese de Mestrado).
- [20] VIANNA, G.R.; COUTO, F.A.A.; Oliveira, A.B.; ZAMBOLIM, L. e MARIA, J. **A rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo**. *Bragantia*, 56:249-54, 1997.
- [21] LITZ, R.E.; & CONOVER, R.A. Tissue culture propagation of papaya. **Proc. Fla. Sta. Hort. Soc.**, v. 90, p. 245-246, 1977.
- [22] 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 of Society of Horticulture Science**, Alexandria, v. 106, n. 6, p. 792-794, 1981.