

FORMAS DE ESTERILIZAÇÃO DO GA₃ E REAÇÃO MORFOGÊNICA EM MICROESTACAS DE MAMOEIRO¹

MÁRCIO JOSÉ VIEIRA DE OLIVEIRA², EDILSON ROMAIS SCHMILDT³,
JOSÉ AUGUSTO TEIXEIRA DO AMARAL⁴, RUI MÁRIO INÁCIO COELHO⁴, OMAR SCHMILDT⁵

RESUMO - Este trabalho objetivou estudar os efeitos do ácido giberélico (GA₃) sobre o alongamento de brotos de mamoeiro 'Tainung 01' em meio de multiplicação *in vitro* e posterior enraizamento *ex vitro*. Brotações com menos de 1 cm de comprimento foram submetidas ao alongamento em meio MS contendo GA₃, nos seguintes tratamentos, em mg L⁻¹: T₁ = 0,0; T₂ = 0,5 esterilizado junto com o meio de cultura; T₃ = 0,5 esterilizado a frio; T₄ = 2,0 esterilizado junto com o meio de cultura; T₅ = 2,0 esterilizado a frio. Após esses tratamentos, as brotações foram submetidas ao enraizamento *ex vitro*. Observou-se que o GA₃ nos níveis 0,5 e 2,0 mg L⁻¹, utilizado após autoclavagem em meio de multiplicação, não se mostrou efetivo para o alongamento dos ramos, mas quando esterilizado por filtração, mostrou-se efetivo no alongamento das brotações; no entanto, é prejudicial no estágio subsequente de enraizamento, podendo, estes, necessitar de novo subcultivo em meio suplementado com auxina, visando a induzir o enraizamento.

Termos para indexação: *Carica papaya*, giberilina, alongamento, enraizamento *ex vitro*.

FORMS OF STERILIZATION OF GA₃ AND MORPHOGENIC REACTION IN MICROCUTTINGS OF PAPAYA

ABSTRACT - This study investigated the use of gibberellin (GA₃) in medium *in vitro* propagation of papaya 'Tainung 01' and checking the elongation of shoots and their behavior in the *ex vitro* rooting.. Shoots less than one cm were subjected to elongation on MS medium containing GA₃ treatments as in mg L⁻¹: T1 = 0.0 T2 = 0.5 with sterilized culture medium, T3 = 0.5 sterilized cold, T4 = 2.0 with sterilized culture medium, T5 = 2.0 sterile cold. After these treatments, the shoots were subjected to *ex vitro* rooting. It was observed that GA₃ at levels of 0.5 and 2.0 mg L⁻¹ used in autoclaving after the multiplication has not proved effective for lengthening the shoots, but when sterilized by filtration proved to be effective in lengthening the shoots, however, is harmful in the subsequent stage of rooting and can latter, require subculture to fresh medium supplemented with auxin to induce rooting.

Index terms: *Carica papaya*, gibberellin, elongation, *ex vitro* rooting.

¹(Trabalho 271-13). Recebido em: 07-08-2013. Aceito para publicação em: 05-02-2013.

²MS, doutorando, CCA/UFES, CEP 29520-000, IFES Campus de Alegre-ES. E-mail: marciojvoli@hotmail.com

³DS, Prof. Associado, CEUNES/UFES. E-mail: edilsonschmidt@ceunes.ufes.br

⁴DS, Prof. Associado, CCA/UFES, Cx. Postal 16, 29500-000, Alegre-ES. E-mail: jata53@yahoo.com.br
E-mail:ruimario@cca.ufes.br

⁵Bolsista PNP/CAPEs, Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical/UFES, omar-schmidt@ig.com.br

INTRODUÇÃO

A micropropagação do mamoeiro é um método eficiente na produção em larga escala de clones com características superiores, de sexos definidos e livres de viroses (CRUZ et al., 2008), cruzamentos interespecíficos de mamoeiro, mutantes geneticamente transformados, objetivando prolongar o período de maturação do fruto (MAGDALITA et al., 2008), e resistência ao vírus do mosaico (CRUZ et al., 2008; ANANDAN et al. 2011).

Quando as plântulas apresentam um desenvolvimento insatisfatório da parte aérea, torna-se necessário promover um alongamento antes do enraizamento para facilitar a manipulação dos explantes (MANICA, 2006).

O uso do GA₃ em meio nutritivo, com o objetivo de estimular o alongamento das brotações, tem apresentado respostas contraditórias em função do genótipo (GEORGE et al., 2008; NEUMANN et al., 2009), do fotoperíodo (GEEKIYANAGE et al., 2006; MITROVIC; BOGDANOVIC, 2009) e da concentração do fitormônio (DINIZ et al., 2003; MACHADO et al., 2004; GEEKIYANAGE et al., 2006).

O uso do GA₃ para a cultura de tecidos requer que o mesmo seja preparado imediatamente antes do uso, pela dissolução em água, e pH ajustado para 5,7 com uma base (NaOH - 1N ou KOH - 1N) e esterilizado por filtração (SANTOS-SEREJO et al., 2006). Isso demanda tempo e mão de obra adicionais, fazendo com que a utilização do GA₃ autoclavado, juntamente com o meio de cultura, seja mais frequentemente utilizado (DINIZ et al., 2003; JESUS et al., 2003; PEREIRA et al., 2006). Alguns autores atribuem a ineficiência do GA₃ *in vitro* quando o mesmo é preparado por autoclavagem (YUI et al., 1993; SANTA-CATARINA et al., 2001). Todavia, outros autores demonstram efeitos benéficos do GA₃ por autoclavagem (GHANTI et al., 2004; MADEIRA et al., 2005; MITROVIC; BOGDANOVIC, 2009). No entanto, não foram encontrados na literatura trabalhos que comparem a eficiência do uso do GA₃ esterilizado por filtração com o GA₃ e, esterilizado por autoclavagem. Deve-se destacar que, ao se usar o GA₃ para alongamento de brotações, deve-se fazê-lo com cautela, pois esses tecidos podem ser de difícil enraizamento (GEORGE et al., 2008).

Em mamoeiro, o uso do GA₃ para alongamento de brotações foi avaliado por Winnaar (1988) e por Reuveni et al. (1990). O GA₃ autoclavado em meio de multiplicação, no quarto e quinto subcultivos, mostrou-se efetivo no alongamento das brotações (WINNAAR, 1988). Contudo, a autora não avaliou

o efeito da aplicação do GA₃ no enraizamento das brotações. Por outro lado, Reuveni et al. (1990) usaram GA₃ por filtração em meio de alongamento, o que foi efetivo para alongar as brotações, mas elas ficaram com pequeno diâmetro, com poucas folhas e não enraizaram bem, não indicando o uso de somente um estágio para alongamento das brotações.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da adição do GA₃ no meio de cultura, com esterilizações por autoclavagem e por filtração, sobre o alongamento de brotos de mamoeiro 'Tainung 01' e seu posterior enraizamento *ex vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em laboratório e casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), localizado no município de Alegre-ES, latitude 20°45' sul, longitude 41°48' oeste e altitude de 150 m.

Os explantes usados no experimento de alongamento das brotações de mamoeiro 'Tainung 01' foram obtidos a partir de brotações no terceiro subcultivo, em meio de multiplicação MS com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7,5 g L⁻¹ de ágar Vetec[®], 0,093 mg L⁻¹ de ANA e 0,45 mg L⁻¹ de BAP, pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem, em frascos de vidro com capacidade de 240 mL, contendo 30 mL de meio e condições ambientais conforme Schimdt et al. (2007). Após esse período, o número de brotos obtidos variava de 9 a 16 por explante, mas apenas 3 ou 4 brotos de cada explante atingiram tamanho adequado para o enraizamento.

Experimento 1 – Alongamento de microestacas - Brotações entre 0,7 e 1 cm foram individualizadas e submetidas a um novo subcultivo, visando ao alongamento, em meio MS com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7,5 g L⁻¹ de ágar Vetec[®] e a adição de GA₃, de modo a caracterizar os seguintes tratamentos: T₁ = 0,0 GA₃ mg L⁻¹; T₂ = 0,5 mg L⁻¹ de GA₃ esterilizado por autoclavagem junto com o meio; T₃ = 0,5 mg L⁻¹ de GA₃ esterilizado a frio por microfiltração; T₄ = 2,0 mg L⁻¹ de GA₃ esterilizado por autoclavagem junto com o meio; T₅ = 2,0 mg L⁻¹ de GA₃ esterilizado a frio por microfiltração. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 5 repetições, com 9 brotos por repetição, dispostos em tubos de ensaio individuais, contendo 10 mL de meio em cada um.

Nos tratamentos em que o GA₃ foi esterilizado junto com o meio, o GA₃ foi adicionado ao meio durante o preparo, foi feita a correção do pH para 5,7 ± 0,1, os tubos foram enchidos com 10 mL de

meio de cultura, acondicionados em sacos de polipropileno e autoclavados a uma temperatura de 121 °C e pressão de 1,2 atm, por 20 minutos. Após a solidificação do meio de cultura, os sacos com os tubos foram levados à câmara de fluxo, abertos, e foi inoculado um broto de 0,7 a 1,0 cm em cada tubo. Os tubos foram vedados com parafilm e conduzidos à sala de cultivo.

Nos tratamentos em que o GA₃ foi adicionado a frio, o meio de cultura foi preparado sem o GA₃, o pH corrigido para $5,7 \pm 0,1$ e colocado em erlemayers. As bocas dos erlemayers foram vedadas com papel-alumínio, e os tubos de ensaio colocados em sacos de polipropileno para serem autoclavados a uma temperatura de 121°C e pressão de 1,2 atm, por 20 minutos. Após a esterilização do meio de cultura e dos tubos de ensaio, os sacos com os tubos e os erlemayers com meio de cultura foram conduzidos à câmara de fluxo laminar, onde o GA₃ foi adicionado ao meio de cultura antes da solidificação, com temperatura entre 40 e 45°C, através de microfiltração por filtro millipore® com poros de 0,2 µm de diâmetro, com auxílio de uma seringa previamente autoclavada. Os frascos foram agitados para homogeneização do meio de cultura e foram colocados 10 mL de meio de cultura em cada tubo. Após a solidificação do meio de cultura, foram inoculadas as microestacas de mamoeiro, as bocas dos tubos foram vedadas com parafilm e, estes, conduzidos à sala de cultivo onde permaneceram por mais 20 dias sob iluminação com lâmpadas fluorescentes em fotoperíodo de 16 horas de luz.

Após este período, foram avaliados os tratamentos com relação ao comprimento final das brotações.

Experimento 2 – Enraizamento *ex vitro* - As brotações dos tratamentos que se mostraram efetivos no alongamento, ou seja, apenas os tratamentos em que os brotos utilizaram o GA₃ esterilizado a frio, através do filtro millipore®, nas dosagens de 0,5 e 2,0 mg L⁻¹, e ramos retirados de frascos contendo brotos em meio de multiplicação foram submetidos ao enraizamento *ex vitro*. Todos os ramos foram padronizados com 4 a 4,5 cm. As microestacas tiveram as bases imersas em solução contendo 10 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) por um minuto e posterior cultivo em copos plásticos transparentes, contendo substrato Plantmax®. O substrato e a água usada foram esterilizados por autoclavagem. Os copos plásticos foram cobertos com copos plásticos leitosos invertidos para simular uma câmara úmida, sendo molhados uma vez por dia. Após uma semana, os copos plásticos de cobertura foram levemente tombados, deixando uma pequena

abertura na lateral e, aos quinze dias, foram completamente removidos, com os brotos já aclimatados.

O experimento com o alongamento foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 5 repetições, com 9 brotos por repetição, dispostos em tubos de ensaio individuais, contendo 10 mL de meio em cada um, e o experimento de enraizamento *ex vitro* foi conduzido em delineamento em blocos ao acaso, com três tratamentos com oito repetições, com cinco brotações por repetição cada uma em copos plásticos individualizados. Avaliaram-se, ao final de 30 dias, o percentual de enraizamento, o número de raízes por brotação e o comprimento médio das raízes.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os dados foram avaliados com o programa Genes (CRUZ, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se que o GA₃ afetou o comprimento médio das brotações no meio de multiplicação (Tabela 1).

Essa resposta à presença de GA₃ no meio de multiplicação foi bem pronunciada. O GA₃ esterilizado a frio permitiu as maiores médias de crescimento das brotações. Quando usado autoclavado no meio, a dose de 0,5 mg L⁻¹ de GA₃ não foi efetiva no alongamento dos brotos, enquanto a 2,0 mg L⁻¹ foi prejudicial, ocasionando coloração amarelada nas folhas.

Estes resultados indicam que a giberelina em forma de GA₃ não apenas perde sua atividade ao ser esterilizada por autoclavagem, como também em altas concentrações inibe o crescimento e/ou provoca fitotoxidez nas microestacas de mamoeiro 'Tainung 01'. Esses resultados corroboram os obtidos por Yui et al. (1993) e por Santa-Catarina et al. (2001) em explantes de ápices caulinares de macieira. Em contraposição, outros autores utilizando GA₃ autoclavado obtiveram sucesso no alongamento das brotações de *Carica papaya* 'Sunrise Solo' (WINNAAR, 1988), *Mentha piperita* (GHANTI et al., 2004), *Arracacia xanthorrhiza* (MADEIRA et al., 2005) e *Uncaria guianensis* (PEREIRA et al., 2006).

Pode-se constatar que, nas brotações individualizadas, submetidas ao enraizamento *ex vitro*, o GA₃ no meio de multiplicação também influenciou sobre a porcentagem de enraizamento, o número de raízes e o comprimento médio das raízes. O melhor desempenho quanto ao percentual de enraizamento, número de raízes por brotação e comprimento médio das raízes foi para as

brotações na ausência de GA₃, durante o estágio de multiplicação, demonstrando que o GA₃ afetou negativamente o enraizamento, como também verificado por Jesus et al. (2003) e por George et al. (2008). Diniz et al. (2003) afirmam que o uso do GA₃ associado ao BAP em meio de multiplicação prejudicou o enraizamento de brotações de macela.

O GA₃ usado por microfiltração em meio de multiplicação, apesar de ser efetivo no alongamento dos brotos de mamoeiro 'Tainung 01' nas dosagens de

0,5 e 2 mg L⁻¹, não se recomenda seu uso em brotos submetidos diretamente ao enraizamento *ex vitro*, pois foi observado neste experimento que o GA₃ prejudica o enraizamento de brotos micropropagados de mamoeiro 'Tainung 01', podendo necessitar de novo subcultivo dos ramos alongados em meio de cultura isento de regulador de crescimento ou meio suplementado com auxina, com a finalidade de estimular o enraizamento.

TABELA 1 - Resultados do comprimento das brotações (CB), porcentagem de enraizamento (ENR), número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR) em brotos de plantas adultas de mamoeiro 'Tainung 01', na presença de GA₃, em meio de multiplicação (EA = esterilizado por autoclavagem; EF = esterilizado por filtração).

GA ₃ (mg L ⁻¹)	Alongamento		Enraizamento <i>ex vitro</i>	
	CB (mm) ^{1/}	ENR (%) ^{1/}	NR ^{1/}	CR (mm) ^{1/}
0,0	18,24b	55,31a	15,13a	29,58a
0,5 EA	15,42b	#		
0,5 EF	25,62a	24,99b	11,90b	13,98b
2,0 EA	10,93c			
2,0 EF	24,78a	21,88b	12,00b	13,79b
CV%	20,62	23,43	11,59	24,78

^{1/}Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5%; # Não avaliado.

CONCLUSÕES

O GA₃ usado por autoclavagem em meio de multiplicação não é efetivo para o alongamento de brotos de mamoeiro 'Tainung 01' nas dosagens de 0,5 e 2,0 mg L⁻¹.

O GA₃, quando utilizado no meio de multiplicação, prejudica o enraizamento posterior de brotos micropropagados de mamoeiro.

AGRADECIMENTOS

Ao Banco do Nordeste do Brasil S.A., pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ANANDAN, R.; THIRUGNANAKUMAR, S.; SUDHAKAR, D.; BALASUBRAMANIAN, P. *In vitro* organogenesis and plantlet regeneration of (*Carica papaya* L.). **Journal of Agricultural Technology**, Wellington, v. 7, n. 5, p. 1.339-1.348, 2011.

CRUZ, C.D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, 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, v. 8, n. 1, p. 35-41, 2008.

DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L.; TEIXEIRA, A. L. de A. T.; GOMES, E. S.; HERNANDEZ, F. F. F. Ácido giberélico (GA₃) e 6-benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 934-938, 2003.

GEEKIYANAGE, S.; TAKASE, T.; WATANABE, S.; FUKAI, S.; KIYOSUE, T. The combined effect of photoperiod, light intensity and GA₃ on adventitious shoot regeneration from cotyledons of spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 23, p. 431-435, 2006.

- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, 501p.
- GHANTI, K.; KAVIRAJ, C. P.; VENUGOPAL, R. B.; JABEEN, F. T. Z.; RAO, S. Rapid regeneration of *Mentha piperita* L. from shoot tip and nodal explants. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 3, p. 594-598, 2004.
- JESUS, A. M. S.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Jatropha*. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 50, n. 288, p. 183-189, 2003.
- MACHADO, M. P.; CARVALHO, D. C.; BIASI, L. A. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira 'marubakaido' em diferentes meios de cultivo e concentrações de ácido giberélico. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 5, n. 1-2, p. 69-72, 2004.
- MADEIRA, N. R.; TEIXEIRA, J. B.; ARIMURA, C. T.; JUNQUEIRA, C. S. Influência da concentração de BAP e GA₃ no desenvolvimento *in vitro* de mandioquinha-salsa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 982-985, 2005.
- MAGDALITA, P. M.; LAURENA, A. C.; ABUSTAN, M. A. M.; COMIA, R. L.; JOSUE, D. R. **Transgenic papaya with delayed ripening characteristics**. Bicutan: PCARRD Highlights, 2008. p.104-105, 2008.
- 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.
- MITROVIĆ, A.; BOGDANOVIĆ, J. Effect of gibberellic acid on total antioxidant activity during *Chenopodium rubrum* L.: ontogenesis *in vitro*. **Archives of Biological Sciences**, Belgrade, v. 61, n. 1, p. 49-55, 2009.
- NEUMANN, K. H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant cell and tissue culture: a tool in biotechnology: basics and application**. Berlin: Springer, 2009. 333p.
- PEREIRA, R. de C. A.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CASTRO, E. M. de; SILVA, F. G. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (Unha-de-gato). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 637-642, 2006.
- REUVENI, O.; SHLESINGER, D. R.; LAVI, U. *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 20, p. 6-41, 1990.
- SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, S. da C.; PEDROTTI, F. D. E. L. Micropropagação do porta-enxerto de macieira 'seleção 69' tolerante à podridão do colo (*Phytophthora cactorum*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 757-762, 2001.
- 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**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 2006. cap. 4, p.79-98.
- SCHMILDT, O.; SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T. do. Cinetina e ANA na multiplicação *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 55-60, 2007.
- YUI, E.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; NAGIG, N.; CHALFUN, N. N.; ISHIDA, J. S. Influência de reguladores de crescimento na proliferação *in vitro* de brotos de porta-enxerto de macieira 'M-7'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.5, p.597-602, 1993.
- WINNAAR, W. Clonal propagation of papaya *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 12, p. 305-310, 1988.