

CULTIVO *IN VITRO* E ESTAQUIA DOS MAMOEIROS 'GOLDEN' E  
'UENF/CALIMAN 01'

**OMAR SCHMILDT**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
DEZEMBRO - 2010

CULTIVO *IN VITRO* E ESTAQUIA DOS MAMOEIROS 'GOLDEN' E  
'UENF/CALIMAN 01'

**OMAR SCHMILDT**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para a obtenção  
do título de Doutor em Produção Vegetal”.

Orientador: Prof. Dr. Eliemar Campostrini

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
DEZEMBRO - 2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 054/2011

Schmidt, Omar

Cultivo *in vitro* e estaquia dos mamoeiros 'Golden' e 'UENF/Caliman 01' / Omar Schmidt. – 2010.  
119 f. : il.

Orientador: Eliemar Campostrini

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2010.

Bibliografia: f. 102 – 119.

1. *Carica papaya* 2. Ecofisiologia 3. Ácido 3 indol butírico (AIB) 4. Sistema ventilado 5. Propagação vegetativa I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 634.651

CULTIVO *IN VITRO* E ESTAQUIA DOS MAMOEIROS 'GOLDEN' E  
'UENF/CALIMAN 01'

**OMAR SCHMILDT**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”.

Aprovada em 17 de dezembro de 2010

Comissão Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Alena Torres Netto (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Mara de Menezes de Assis Gomes (D.Sc., Biologia Vegetal) - IST- Campos

---

Prof<sup>a</sup>. Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) - UENF

---

Prof. Eliemar Campostrini (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus...

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pela oportunidade de realização do curso em Pós-Graduação em Produção Vegetal e pela concessão de bolsa, a qual foi de grande auxílio para a realização deste trabalho;

A empresa Caliman Agrícola S/A, pela concessão de área experimental e apoio financeiro ao projeto referente ao trabalho com estaquia do mamoeiro;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro dado aos trabalhos;

Ao meu orientador Eliemar Campostrini, pela amizade, oportunidade, orientação, incentivo e conhecimentos transmitidos;

Ao professor Edilson Romais Schmildt, pela amizade, atenção, e pelo auxílio nos trabalhos e análises estatísticas;

A todos os professores das disciplinas cursadas, pelos ensinamentos transmitidos;

Ao Geraldo Ferregueti, Elieuder Celin e aos funcionários do viveiro de mudas da empresa Caliman Agrícola S/A, pelo apoio e constante suporte durante a realização dos trabalhos;

À Doutora Alena Torres Netto, pela amizade, e pelo constante suporte nas avaliações fisiológicas e demais etapas dos trabalhos;

À professora Virginia Silva Carvalho, pela amizade, e pela concessão de equipamentos, os quais foram primordiais para a realização dos trabalhos de micropropagação;

Ao José Accácio da Silva, por toda ajuda na realização da análise foliar;

Aos amigos do laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial, Anderson, Bruna, Cássia, Daniel, Jefferson, Tarcisio e Tiago, pela amizade, convívio e valioso apoio na realização dos trabalhos;

Aos alunos da UFES, Adriel e Jeferson, pela amizade e auxílio na condução dos trabalhos de estaquia;

Aos meus amigos Aroldo, Cezar, Luciano, Rafael, Ramon e Roberto, por todos os bons momentos de convívio em República;

Ao meu pai Laurenço, à minha mãe Ernestina (*in memoriam*), meu irmão Edilson, minha irmã Leni, meu cunhado Eldo, minha sobrinha Valéria e demais parentes, por sempre me apoiar, incentivar e ajudar nos momentos felizes ou de dificuldade, pois sem eles eu não teria conseguido chegar até aqui;

A todos que de alguma maneira contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Características gerais da espécie.....	5
2.2. Importância econômica.....	8
2.3. Propagação seminífera.....	9
2.4. Propagação vegetativa.....	10
2.4.1. Estaquia.....	12
2.4.1.1. Dominância apical.....	13
2.4.1.2. Enraizamento das estacas.....	15
2.4.2. Micropropagação convencional.....	20
2.4.2.1. Fase de estabelecimento <i>in vitro</i> .....	22
2.4.2.2. Fase de multiplicação <i>in vitro</i> .....	23
2.4.2.3. Fase de enraizamento <i>in vitro</i> .....	25
2.4.2.4. Condições do ambiente de cultivo.....	26
2.4.3. Micropropagação em ambiente modificado.....	28
2.4.3.1. Carboidratos.....	29
2.4.3.2. Trocas gasosas (CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> O).....	31
2.4.3.3. Relações hídricas.....	33

2.4.3.4. Fonte de energia luminosa.....	36
2.4.4. Enxertia.....	39
3. TRABALHOS.....	41
3.1. EFEITO DAS CONDIÇÕES DO AMBIENTE DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> NA MULTIPLICAÇÃO DE MAMOEIRO 'GOLDEN'.....	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	42
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAL E MÉTODOS.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
3.2. PROPAGAÇÃO DE MAMOEIRO 'GOLDEN' E 'UENF/CALIMAN 01' VIA ESTAQUIA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB.....	72
RESUMO.....	72
ABSTRACT.....	73
INTRODUÇÃO.....	74
MATERIAL E MÉTODOS.....	77
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	82
CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102



## RESUMO

SCHMILDT, Omar; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Dezembro de 2010. **Cultivo *in vitro* e estaquia dos mamoeiros 'Golden' e 'UENF/Caliman 01'**. Orientador: Professor Eliemar Campostrini. Co-orientador: Professor Edilson Romais Schmidt.

Neste trabalho, buscou-se o aprimoramento das técnicas de produção de mudas do mamoeiro, e para isto foram realizados experimentos distintos, por micropropagação e estaquia. No primeiro experimento referente à micropropagação, o objetivo foi avaliar os aspectos ecofisiológicos da multiplicação *in vitro* do mamoeiro 'Golden', relacionados à fotossíntese, fluorescência, às relações hídricas, aos teores de macronutrientes, índice SPAD e ao crescimento, em resposta a utilização de diferentes qualidades de luz, tipos de sistema de ventilação dos frascos e concentrações de sacarose. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, e três plantas por repetição, em um esquema de parcelas subdivididas, constituídas de qualidades de luz (branca e vermelha, com FFF de  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), tipos de sistema (fechado e ventilado) e concentrações de sacarose no meio de cultivo (10; 20; 30 e  $40 \text{ g L}^{-1}$ ). No segundo método de propagação, o de estaquia, objetivou-se avaliar a fotossíntese, fluorescência, índice SPAD e o crescimento de estacas de mamoeiro 'Golden' e 'UENF/Caliman 01', em resposta a aplicação de AIB na indução do enraizamento, bem como avaliar as características morfológicas das plantas em campo. O experimento inicial foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema

fatorial 2x5, sendo duas cultivares ('Golden' e 'UENF/Caliman 01') e cinco concentrações de AIB (0; 500; 1000; 1500 e 2000 mg L<sup>-1</sup>), com três repetições e oito estacas por repetição. De acordo com os tratamentos, as estacas de mamoeiro 'UENF/Caliman 01' tratadas com AIB proporcionaram melhor enraizamento, destacando-se a concentração de 1500 mg L<sup>-1</sup>. No plantio, e após 4,5 meses a partir deste, as estacas foram transplantadas no campo, as quais foram comparadas morfológicamente com plantas propagadas via seminífera de mesma idade. Ainda, nas mesmas condições experimentais e de cultivo do experimento anterior, foi realizado outro experimento de estaquia, com as cultivares 'UENF/Caliman 01' e 'Golden', sendo que, na tentativa de melhorar o enraizamento, principalmente do mamoeiro 'Golden', foi elevada a concentração de AIB (0; 750; 1500; 2250 e 3000 mg L<sup>-1</sup>). O cultivo *in vitro* sob luz vermelha promoveu maior crescimento das plântulas. A menor taxa de perda de água das plântulas foi obtida no sistema ventilado, podendo relatar que tais plântulas podem ter melhor adaptação para estas condições, quando forem cultivadas sob condição *ex vitro*. A eficiência fotoquímica das plântulas nas condições de cultivo foi baixa. Em novos experimentos, sugere-se desta forma usar a concentração de sacarose a 10 g L<sup>-1</sup> e aumentar o nível de irradiância (luz vermelha) da sala de cultivo para estimular o metabolismo autotrófico. Nas condições deste experimento, o incremento na produção de biomassa seca do mamoeiro foi devido exclusivamente à fonte exógena de carbono por meio da adição de sacarose no meio de cultivo, uma vez que não houve assimilação fotossintética do carbono. A baixa assimilação fotossintética foi devido ao comprometimento na capacidade fotoquímica, causada pelo baixo FFF na sala de cultivo. Em estacas de mamoeiro 'Golden', em novos estudos, e para a indução de enraizamento, indica-se aumentar a concentração de AIB acima de 3000 mg L<sup>-1</sup>. Quando tratadas com AIB a 1500 mg L<sup>-1</sup>, as estacas de mamoeiro 'Uenf/Caliman 01' apresentaram um índice de enraizamento de 65%. Em ambos os genótipos, as reduzidas quantidades de raízes nas estacas foram suficientes para manter o estado hídrico, a taxa fotossintética, uma significativa quantidade de clorofilas nas folhas e uma eficiente utilização da energia luminosa. Quando cultivadas no campo, as plantas de mamoeiro propagadas por estaquia apresentaram iniciação precoce de flores, menor altura de inserção dos primeiros frutos e baixa estatura, o que pode antecipar e facilitar a colheita.

## ABSTRACT

SCHMILDT, Omar; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. December, 2010. ***In vitro* and cutting cultivate of the papaya trees 'Golden' and 'UENF/Caliman 01'**. Advisor: Professor Eliemar Campostrini. Co-advisor: Professor Edilson Romais Schmildt.

In this work, we looked for the perfect improvement of the techniques of production of seedlings of the papaya tree, and for this purpose different experiments were carried out, by micropropagation and cutting. In the first experiment regarding the micropropagation, the objective was to evaluate the ecophysiological aspects of the *in vitro* multiplication of the papaya tree 'Golden', related to the photosynthesis, fluorescence, to the hydric relations, to the macronutrients contents, SPAD index and to the growth, in response to use of different light qualities, types of system of ventilation of the flasks and sucrose concentrations. The treatments were disposed in randomized complete block design, with four repetitions, and three plants for repetition, in sub plots split, constituted of light qualities (white and red, with FFF of  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), system types (closed and ventilated) and sucrose concentrations in the middle of cultivation (10; 20; 30 and  $40 \text{ g L}^{-1}$ ). In the second propagation method, the one of cutting, was aimed at to evaluate the photosynthesis, fluorescence, SPAD index and the growth of papaya tree cuttings 'Golden' and 'UENF/Caliman 01', in response to application of IBA in the induction of the rooting act, as well as to evaluate the morphologic characteristics of the plants in field. The initial experiment was accomplished in randomized complete block design, factorial 2x5, being two cultivars ('Golden' and 'UENF/Caliman 01')

and five concentrations of IBA (0; 500; 1000; 1500 and 2000 mg L<sup>-1</sup>), with three repetitions and eight cuttings for repetition. In agreement with the treatments, the papaya tree cuttings 'UENF/Caliman 01' treated with IBA provided better rooting, standing out the concentration of 1500 mg L<sup>-1</sup>. In the planting, and after 4,5 months starting from this, the cuttings were transplanted in the field, which morphologically was compared with plants spread in seminiferous way of same age. Still, in the same experimental conditions and of cultivation of the previous experiment, other cutting experiment was carried out, with cultivar 'UENF/Caliman 01' and 'Golden', and, in the attempt of improving the rooting act, mainly of the papaya tree 'Golden', it was high the concentration of IBA (0; 750; 1500; 2250 and 3000 mg L<sup>-1</sup>). The cultivation *in vitro* under red light promoted larger growth of the seedlings. The smallest tax of loss of water of the seedlings was obtained in the ventilated system, and such seedlings can have better adaptation for these conditions, when cultivated under *ex vitro* condition. The photochemistry efficiency of the seedlings in the cultivation conditions was low. In new experiments, is suggested the use of sucrose concentration to 10 g L<sup>-1</sup> and to increase the irradiance level (red light) of the cultivation room to stimulate the autotrophic metabolism. In the conditions of this experiment, the increment in the production of dry biomass of the papaya tree was due exclusively to the hexogen source of carbon through the sucrose addition in the middle of cultivation, once there was no photosynthetic assimilation of the carbon. The low photosynthetic assimilation was due to the compromising in the photochemical capacity, caused by low FFF in the cultivation room. In papaya tree cuttings 'Golden', in new studies, and for the rooting induction, it is indicated to increase the concentration of IBA above 3000 mg L<sup>-1</sup>. When treated with IBA at 1500 mg L<sup>-1</sup>, the papaya tree cuttings 'Uenf/Caliman 01' presented an index of rooting of 65%. In both genotypes, the reduced amounts of roots in the cuttings were enough to maintain the hydric state, the photosynthetic tax, a significant amount of chlorophylls in the leaves and an efficient use of the luminous energy. When cultivated in the field, the papaya tree plants spread by cutting presented precocious initiation of flowers, smaller height of insert of the first fruits and low stature, what can advance and facilitate the crop.

## 1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta cujo fruto tem grande importância econômica, alimentícia e social, e esta planta é cultivada principalmente nos países tropicais. O fruto dessa espécie possui ótima aceitação no mercado internacional (Zaidan, 2002), e várias regiões do Brasil possuem potencial de produção desse fruto. Os Estados da Bahia e do Espírito Santo são os dois maiores produtores e mais recentemente, no Estado do Rio Grande do Norte, a cultura vem apresentando maiores índices tecnológicos de produção (Costa et al., 2005). O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de mamão e em 2008 produziu 1,89 milhões de toneladas de frutos (Agriannual, 2009).

Em lavouras comerciais de mamoeiro, a propagação tem sido efetuada tradicionalmente por meio da utilização de sementes (Costa e Pacova, 2003; Tokuhisa et al., 2007). Segundo os autores, esta forma de propagação apresenta a vantagem de ser um método prático. São José e Marin (1988) ainda destacam que os produtores mantêm suas próprias matrizes, para a produção de sementes. No entanto, este método de propagação apresenta algumas desvantagens. A maioria das sementes das cultivares utilizadas nas regiões produtoras de mamão é proveniente de frutos de polinização livre, sem controle efetivo da polinização. Desse modo, as cultivares estão submetidas às variações na descendência, causando descaracterização dos genótipos e comprometendo a qualidade das lavouras (Drew, 1987; Costa e Pacova, 2003).

De uma maneira geral, para a formação de pomares, as sementes do grupo 'Solo' são obtidas de plantas hermafroditas selecionadas em lavouras comerciais o que, após o plantio destas sementes, produz uma proporção de 67% de plantas hermafroditas e 33% de plantas femininas. No caso dos híbridos do grupo 'Formosa', as sementes produzem na nova geração 50% de plantas femininas e 50% de plantas hermafroditas (Arango et al., 2008). Como a sexagem pode ser feita somente depois de quatro a cinco meses após o transplante e em função da maior aceitação pelo mercado consumidor de frutos provenientes de plantas hermafroditas, o produtor planta três mudas por cova para a futura sexagem, para se obter maior quantidade destes. Na ocasião do florescimento, o produtor mantém apenas uma planta hermafrodita por cova. Estas condições contribuem para a elevação dos custos das lavouras, aumentando assim o preço final dos frutos aos consumidores (Simão, 1998; Arango et al., 2008).

Medina et al. (1989) e Chutteang et al. (2007) relataram que não existe nenhum caráter morfológico visual que seja totalmente eficiente para distinguir o sexo do mamoeiro, em plantas juvenis. De fato no passado, alguns autores como Jindal e Singh (1976) e Magdalita e Mercado (2003) tentaram, por meio de características morfológicas, efetuar a determinação sexual de plântulas de mamoeiro, e não alcançaram os seus objetivos. Já é possível identificar o sexo precoce em plantas de mamoeiro, por meio do DNA com o uso de marcadores moleculares (Zaidan, 2002). Segundo Oliveira et al. (2007), o custo das análises moleculares pode dificultar a difusão dessa metodologia.

Observadas as desvantagens na utilização de sementes, a busca do aprimoramento das técnicas de produção de mudas do mamoeiro por meio da utilização da micropropagação e estaquia para a produção somente de plantas hermafroditas e com as características herdadas das plantas matrizes, torna-se uma alternativa muito importante. Em escala comercial, sabe-se que propagação vegetativa ainda não é usual, devido à dificuldade de retirada de material para essa metodologia, pois o mamoeiro apresenta pouca brotação lateral. Esse fato deve-se à dominância apical que ocorre em algumas culturas em consequência da presença de auxina na zona meristemática, limitando o desenvolvimento dos meristemas laterais (Taiz e Zeiger, 2009). No mamoeiro, isto é verificado, pois o caule é do tipo estipe, ou seja, não ramificado, com uma coroa de folhas apenas no ápice. A quebra da dominância apical em mamoeiro pode ser feita por meio de

podas na parte superior do tronco do mamoeiro (remoção da gema apical). Esta remoção promove o surgimento de novas brotações laterais (Grana Jr, 2000; Lopes et al., 2008; Barros et al., 2009).

Outro problema verificado na propagação vegetativa por estaquia é a dificuldade de enraizamento das estacas (Grana Jr, 2000). Segundo Allan (1990), as estacas de mamoeiro podem ser enraizadas por meio da utilização de ácido indol-3-butírico (AIB), sob nebulização intermitente e temperatura mínima em torno de 30 °C no substrato de areia com leito aquecido. Entretanto, a grande desvantagem encontrada neste sistema descrito por Allan está no fato de que para manter a temperatura na base estacas em torno de 30 °C é necessária a utilização de instalações mais sofisticadas, como o leito de areia aquecido, o que acaba por final encarecendo o processo de produção de mudas. Nestas condições experimentais, Allan (1964) trabalhando com F<sub>1</sub> de 'Hortus Gold', na África do Sul, utilizando AIB a 1000 mg L<sup>-1</sup> obteve 87% de enraizamento usando estacas de 2,5 cm de diâmetro e tamanho entre 12,7 e 30,5 cm colhidas no outono. O autor enfatiza a importância destas medidas para bom enraizamento. Desta forma, quando usou estacas com apenas 1,25 cm de diâmetro e menores que 12,7 cm, também colhidas no outono, obteve apenas 6% de enraizamento.

Uma alternativa à propagação seminífera é a utilização da técnica de micropropagação, a qual, a partir de um único explante, torna-se possível obter mudas de boa qualidade e em grande quantidade. Diversos autores utilizaram esta técnica a partir de explantes provenientes de plantas adultas (Litz e Conover 1978; Panjaitan et al., 2007; Talavera et al., 2009) ou de plantas juvenis produzidas em casa de vegetação (Teixeira e Teixeira, 2004; Schmildt et al., 2007a; Schmildt et al., 2010). Apesar da técnica de micropropagação ser possível para o mamoeiro, os protocolos descritos até o momento ainda não se encontram suficientemente aperfeiçoados para o uso comercial, principalmente por causa dos contaminantes endógenos, que são provenientes dos explantes retirados de plantas matrizes de mamoeiro cultivadas em campo.

Em sistema convencional de micropropagação, as plântulas são cultivadas *in vitro* em condições de ambiente fechado, sem trocas gasosas, com alta umidade do ar, baixa luminosidade e com a utilização de açúcares no meio de cultura como fonte de carbono e energia (Arigita et al., 2002; Rogalski et al., 2003). Devido às condições de cultivo, as plântulas apresentam alterações

anatômicas e metabólicas que as tornam organismos praticamente heterotróficos (Kozai, 1991). Estas alterações impossibilitam que a maquinária fotossintética opere normalmente (Arigita et al., 2002).

Quando as plântulas produzidas pela micropropagação convencional são transferidas para a casa de vegetação, estas podem ser submetidas a estresse devido à perda excessiva de água e à necessidade de mudança rápida do metabolismo heterotrófico para o autotrófico (Moreira, 2001). Este estresse hídrico é relatado como principal causa de mortalidade das plântulas (Barboza et al., 2006). Portanto, torna-se importante que se busque um maior desempenho das plântulas cultivadas *in vitro*, por meio da alteração deste ambiente, de modo que a condição *in vitro* fique mais próxima possível das condições *ex vitro*, o que pode aumentar assim a taxa de sobrevivência. O estímulo fotoautotrófico da plântula *in vitro* pode ser feito por meio da redução da concentração de carboidrato do meio de cultura, pela ventilação dos frascos de cultivo, e pela elevação da qualidade e da intensidade da luz (Zobayed et al., 2000; Crespo, 2007; Aragón, 2010).

Neste trabalho, buscou-se o aprimoramento das técnicas de produção de mudas do mamoeiro, e para isto foram realizados experimentos distintos, por micropropagação e estaquia. No primeiro experimento referente à micropropagação, o objetivo foi avaliar os aspectos ecofisiológicos da multiplicação *in vitro* do mamoeiro 'Golden', relacionados à fotossíntese, fluorescência, relações hídricas, aos teores de macronutrientes, índice SPAD e ao crescimento, em resposta a utilização de diferentes qualidades de luz, tipos de sistema e concentrações de sacarose. No segundo método de propagação, o de estaquia, objetivou-se avaliar a fotossíntese, fluorescência, índice SPAD e o crescimento de estacas de mamoeiro 'Golden' e 'UENF/Caliman 01' em resposta a aplicação de AIB na indução do enraizamento, bem como avaliar as características morfológicas das plantas em campo.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Características gerais da espécie

O mamoeiro cultivado comercialmente (*Carica papaya* L.) é uma planta herbácea, pertencente à classe Dicotyledoneae, subclasse Archichlamydeae, ordem Violales, subordem Caricineae, família Caricaceae e gênero *Carica* (Badillo,1971).

A espécie *Carica papaya* L. apresenta plantas masculinas, femininas e hermafroditas, de crescimento rápido, atingindo alturas entre 3 e 8 m. O caule se apresenta com diâmetro entre 0,1 e 0,3 m, ereto, indiviso, herbáceo, fistuloso, terminando com uma concentração de folhas na região apical, disposta de forma espiralada. As folhas se apresentam, de forma alternada no tronco, com grandes limbos foliares, de lâminas ovais ou orbiculares, palmatilobadas, com 7 a 11 nervuras. Os pecíolos são fistulosos, cilíndricos, de comprimento variando de 0,5 a 0,7 m, podendo atingir 1,0 m. O sistema radicular é pivotante, com ramificações radiais, com raiz principal napiforme (Dantas e Castro Neto, 2000).

A cultura do mamoeiro apresenta três fases de desenvolvimento bem distintas que são: formação da planta (do 1º ao 4º mês); floração e frutificação (do 5º ao 8º mês) e produção (do 9º mês em diante). No segundo ano de cultivo o mamoeiro entra em processo de colheitas contínuas (Oliveira et al., 2004). Em plantios comerciais, as áreas são renovadas a cada 2 a 3 anos, pois acima deste

período, as plantas tornam-se altas, e a colheita torna-se economicamente inviável (Ming et al, 2008).

Com relação ao solo de cultivo, o mamoeiro se desenvolve em todas as classes de solo, considerando o mais adequado ao seu cultivo, solos com textura areno-argilosa, bem drenados, ricos em matéria orgânica, com um pH variando de 5,5 a 6,7 (Oliveira et al., 2004).

O mamoeiro se desenvolve bem em áreas com precipitações anuais superiores a 1.200 mm e bem distribuídas ao longo do ano, em ambiente de boa luminosidade e com temperatura média anual de 25 °C. Os plantios em locais onde ocorram temperaturas abaixo de 15 °C devem ser evitados, pois o mamoeiro paralisa o crescimento vegetativo, reduz o florescimento, atrasa a maturação e produz frutos de qualidade inferior (Marin et al., 1995). De acordo com as condições ambientais citadas, o mamoeiro encontra excelentes condições de crescimento e desenvolvimento em latitudes entre 21° Norte e 21° Sul (Alves, 2003). Esta espécie *Carica papaya* L., originária das regiões tropical e subtropical da América, é uma das principais frutíferas cultivadas em todo o mundo, e encontra no Brasil ótimas condições para o crescimento e desenvolvimento, principalmente na região Nordeste e no Norte do Estado do Espírito Santo (Marin e Silva, 1996; Alves, 2003). Nestas regiões, o mamoeiro é amplamente cultivado utilizando genótipos como 'Sunrise Solo', 'Improved Sunrise Solo Line72/12', e 'Sunrise Golden' pertencentes ao grupo Solo, e o 'Tainung 01' do grupo Formosa. Os genótipos do grupo Solo são linhagens puras, enquanto o genótipo Tainung F<sub>1</sub> é um híbrido (Dantas et al., 2002; Costa e Pacova, 2003). Com relação ao grupo Formosa, recentemente foi lançado no Brasil, o híbrido 'UENF/Caliman 01' (Ferregueti, 2003; Pereira et al., 2003).

A cultivar 'Sunrise Solo' é procedente da Estação Experimental do Havaí (EUA) sendo conhecida como mamão Havaí, papaya ou mamão do Amazônia. O fruto proveniente de flor feminina é ovalado e o de flor hermafrodita é piriforme, possui casca lisa, firme, cavidade interna estrelada, com polpa vermelho-alaranjada e peso médio de 425 a 625 gramas, com boa aceitação no mercado interno e no mercado externo (Costa e Pacova, 2003).

A 'Improved 'Sunrise Solo Line72/12', também é procedente do Havaí. Foi introduzida no Brasil em 1982 e melhorada pelo Instituto Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural (Incaper), que antigamente se chamava Emcapa. O fruto oriundo

de flor feminina é ovalado e o de flor hermafrodita é piriforme, possui casca lisa, firme e peso médio de 405 gramas, com boa aceitação tanto no mercado interno quanto no mercado externo (Dantas et al., 2002).

O genótipo 'Sunrise Golden', conhecido como 'Golden' é proveniente de seleção massal realizada em campos de produção de 'Sunrise Solo', pela empresa Caliman Agrícola S/A, no Estado do Espírito Santo. Os frutos de plantas hermafroditas são piriformes, com polpa rosa-salmão, cavidade interna estrelada, casca lisa, tamanho uniforme, peso médio de 450 gramas e de excelente aspecto visual. No estágio verde apresenta cor da casca mais clara que a variedade que lhe deu origem. A fruta tem boa aceitação no mercado interno e externo, porém com teor de sólidos solúveis dos frutos e produtividade inferiores ao 'Sunrise Solo'. (Dantas et al., 2002; Costa e Pacova, 2003).

O híbrido 'Tainung 01' foi obtido pela "Fengshan Tropical Horticultural Experiment Station" de Formosa (Taiwan) e é resultante do cruzamento de uma linhagem de 'Sunrise' com uma outra linhagem introduzida da Costa Rica, de polpa vermelha. O fruto proveniente de flor feminina é redondo-alongado e o de flor hermafrodita é alongado, com peso médio de 900 a 1100 gramas. Os frutos apresentam casca de coloração verde-clara e cor da polpa laranja-avermelhada, possui boa durabilidade e resistência ao transporte, pouca resistência ao frio e tem grande aceitação no mercado interno (Dantas et al., 2002; Costa e Pacova, 2003).

Recentemente, foi lançado no Brasil o primeiro híbrido de mamoeiro do grupo Formosa, o 'UENF/Caliman 01'. O híbrido foi desenvolvido pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em parceria com as empresas Caliman Agrícola S/A e a Empresa Agropecuária de Pesquisa do Rio de Janeiro (PESAGRO-Rio). O fruto deste genótipo possui a casca fina, cor verde, polpa de cor avermelhada, com aroma intermediário e ótima qualidade de mesa. Este híbrido apresenta peso médio de 1200 gramas (Pereira et al., 2003). O híbrido 'Uenf/Caliman 01' foi desenvolvido do cruzamento entre um progenitor do grupo Formosa e um progenitor do grupo Solo (Ferregueti, 2003).

## 2.2. Importância econômica

De acordo com a FAO (2010) no ano de 2008, os principais produtores mundiais de mamão foram Índia, Brasil, Nigéria, Indonésia e México. A Comunidade Européia (Holanda, Portugal, Espanha, Reino Unido, França, Itália, Alemanha e Suíça) e os Estados Unidos são os principais importadores do mamão brasileiro, representando 80% e 14%, respectivamente (Brapex, 2010). Em 2008, o Brasil produziu 1,89 milhões de toneladas de frutos, em uma área de 36,65 mil hectares, e foi a terceira fruta mais produzida no país (Agriannual, 2009). Os estados da Bahia e do Espírito Santo, juntos, são responsáveis por quase 90% da produção nacional. A região Nordeste apresenta produção de aproximadamente 1 milhão de toneladas e a região Sudeste chega a quase 700 mil toneladas (Campo e Negócios, 2010). De toda produção nacional da fruta, 95% são destinadas ao mercado *in natura* e apenas 5% são processadas pelas indústrias (Monteiro, 2006).

Além da grande importância econômica, o cultivo do mamoeiro no Brasil está relacionado ao aspecto social, como gerador de emprego e renda, absorvendo mão-de-obra durante o ano todo, uma vez que a lavoura necessita de um constante manejo, como os tratos culturais, a colheita e a comercialização. Estes tratos culturais são efetuados de maneira contínua nas lavouras, além dos plantios serem renovados, em média, a cada três anos (Benassi, 2006).

O mamão é considerado como uma das frutas mais ricas em vitamina A e C. Além do aspecto alimentar, que é o mais direto e conhecido, frutos, folhas e sementes da planta fornecem produtos de amplo uso medicinal e de utilização na indústria, nos segmentos alimentícios, têxtil e cosmético, como a papaína, uma enzima proteolítica, e a carpaína, um alcalóide empregado como ativador do músculo cardíaco. A papaína é produzida nos vasos laticíferos distribuídos em todo corpo da planta, mas é encontrada principalmente em frutos imaturos (Pereira, 1992).

Outro aspecto importante da cultura está relacionado ao fato de que os grandes mercados consumidores preferem os frutos de formato alongado ou piriforme, os quais são produzidos nas plantas hermafroditas. Esses frutos têm um custo menor de embalagem e transporte, pois apresentam, em relação ao peso, um menor volume (Arango et al., 2008).

As principais cultivares de mamoeiro exploradas no Brasil são classificadas em dois grupos, o Solo e o Formosa. As cultivares do grupo Solo são as mais utilizadas para a exportação, enquanto as do grupo Formosa são preferidas para a agroindústria e a hotelaria (Oliveira et al., 2004).

### **2.3. Propagação seminífera**

Em plantios comerciais, o mamoeiro é propagado principalmente por via seminífera (Costa e Pacova, 2003; Tokuhisa et al., 2007). Segundo os autores, esta forma de propagação apresenta a vantagem de ser um método prático. São José e Marin (1988) destacam que os produtores mantêm as próprias matrizes, para a produção de sementes. No entanto, este método de propagação ocasiona problemas genéticos, visto que a maioria das sementes das cultivares utilizadas nas regiões produtoras de mamão é proveniente de frutos de polinização livre, sem controle efetivo da polinização. Desse modo, as cultivares estão submetidas às variações na descendência, o que pode causar uma descaracterização dos genótipos, e assim pode-se ter um comprometimento da qualidade das lavouras (Drew, 1987; Costa e Pacova, 2003). Este fato pode resultar em perda de vigor da planta e ocorrer uma segregação para o formato do fruto (Marin, 2001).

Na maioria das vezes, para a formação de pomares, as sementes do grupo 'Solo' são obtidas de plantas hermafroditas selecionadas em lavouras comerciais o que, após o plantio destas sementes, produz uma proporção de 67% de plantas hermafroditas e 33% de plantas femininas. No caso dos híbridos do grupo 'Formosa', as sementes produzem na nova geração 50% de plantas femininas e 50% de plantas hermafroditas (Arango et al., 2008). Como a sexagem (desbaste) do mamoeiro pode ser feita somente depois de quatro a cinco meses após o transplante, e em função da maior aceitação dos frutos provenientes de plantas hermafroditas para se obter maior quantidade dessas, o produtor tem que plantar três mudas por cova para a futura sexagem. Na ocasião do florescimento, o produtor realiza o desbaste e mantém apenas uma planta hermafrodita por cova. Estas condições contribuem para a elevação dos custos das lavouras, aumentando assim o preço final dos frutos aos consumidores (Simão, 1998; Arango et al., 2008).

Segundo Garcia et al. (2003), se o produtor plantasse somente uma muda por cova, com o sexo desta muda previamente determinado, teria uma economia de 67% em relação à quantidade de mudas produzidas e em serviços inerentes ao estabelecimento, como transporte, distribuição, plantio e desbaste.

Medina et al. (1989) e Chutteang et al. (2007) relataram que, em plantas juvenis, não existe nenhum caráter morfológico visual que seja totalmente eficiente para distinguir o sexo do mamoeiro. No passado, alguns autores tentaram, por meio de características morfológicas, efetuar a determinação sexual de plântulas de mamoeiro. Estas características morfológicas foram associadas à cor da parte externa das sementes, bem como à morfologia da raiz (Magdalita e Mercado, 2003). Nesses estudos iniciais, foi descrito que as plantas femininas apresentavam uma coloração mais clara da parte externa das sementes, e o sistema radicular destas plantas apresentava-se mais ramificado. Jindal e Singh (1976) têm proposto o uso do teste colorimétrico relacionado ao conteúdo total de fenol. Este teste distinguiu em cerca de 86% as plantas femininas e 77% as plantas masculinas. Entretanto, este teste não foi eficiente em plantas hermafroditas. Já é possível identificar o sexo precoce em plantas de mamoeiro, por meio do DNA com o uso de marcadores moleculares (Zaidan, 2002). Segundo Oliveira et al. (2007), o custo das análises moleculares pode dificultar a difusão dessa metodologia.

Observadas as desvantagens na utilização de sementes, devido às características indesejáveis nas progênes, com frutos de padrão diferencial e inferior, assim como a utilização de mais mudas/cova, a busca do aprimoramento das técnicas de produção de mudas do mamoeiro por meio da utilização da micropropagação e estaquia para a produção de somente plantas hermafroditas e com as características herdadas das plantas matrizes, torna-se uma alternativa muito importante principalmente para a redução de custos com a produção de mudas.

#### **2.4. Propagação vegetativa**

A propagação vegetativa é um processo de multiplicação baseado na regeneração de partes da planta-matriz, que ocorre pelos mecanismos de divisão

e diferenciação celular e baseia-se no princípio de que todas as células vegetais contêm informação genética necessária para a regeneração de plantas a partir de qualquer órgão vegetal, sendo esta capacidade denominada de totipotência. A utilização deste modo de propagação permite a formação de clones, ou seja, indivíduos que possuem a mesma carga genética da planta-matriz, garantindo a manutenção das características agronômicas de interesse (Hartmann et al, 2011). São José e Marin (1988) relataram que, em mamoeiro, cada vez mais haverá tendência de obter material propagativo de forma assexuada, usando estacas, enxertia e a técnica da micropropagação. Entretanto, não existem ainda plantios comerciais utilizando estas formas de propagação, devido à dificuldade de retirada de material para essa metodologia, uma vez que o mamoeiro apresenta pouca brotação lateral. Esse fato deve-se à dominância apical que ocorre em algumas culturas, em consequência da presença de auxina na zona meristemática, limitando o crescimento dos meristemas laterais (Taiz e Zeiger, 2009).

Allan et al. (2010) reforçaram que um dos maiores problemas à adoção de técnicas de propagação vegetativa por estaquia ou por enxertia continua sendo os contaminantes, principalmente os bacterianos, que têm levado a perda de muitas mudas. Segundo os autores, um outro fator determinante no processo de estaquia e enxertia são os problemas com vírus do mosaico do mamoeiro, o que é muito real para as condições de cultivo no estado do Espírito Santo. Portanto, um cuidado especial deve ser tomado ao se preparar as mudas.

Zuffellato-Ribas e Rodrigues (2001) relataram que as razões para a utilização da propagação vegetativa estão relacionadas à fixação de genótipos selecionados, uniformidade de populações, facilidade de propagação, antecipação do período de florescimento, combinação de mais de um genótipo em uma planta-matriz, e maior controle das fases de desenvolvimento. Além das características supracitadas, destaca-se como principal importância nos diferentes métodos de propagação vegetativa, a produção de mudas 100% hermafroditas tanto por micropropagação (Zaidan, 2002; May et al., 2007) quanto por estaquia (Allan, 1964; Giampan et al., 2005).

### 2.4.1. Estaquia

A propagação vegetativa por estaquia é um método muito utilizado na floricultura, horticultura, fruticultura e silvicultura, podendo as estacas ser obtidas de caules, caules modificados (rizomas, tubérculos e bulbos), folhas ou raízes, constituindo-se em uma das formas de propagação que antecipa o período de florescimento da planta, em função da redução do seu período juvenil. Tal técnica possibilita maior uniformidade e número de mudas produzidas a partir de uma planta matriz (Janick, 1996; Hartmann et al., 2011), mantendo as características genéticas na descendência, reduzindo assim custos e o período necessário para a produção de mudas (Zuffellato-Ribas e Rodrigues, 2001).

Em mamoeiro, a estaquia pode ser realizada pela coleta de brotos verdes crescidos lateralmente no tronco de plantas pré-selecionadas, os quais passam por um processo de desinfecção, aplicação de fitorregulador e nebulização, para que ocorra o enraizamento e brotação. Entretanto, essa técnica não vem sendo utilizada devido à dominância apical do mamoeiro, o que proporciona poucas brotações laterais e também em razão da baixa capacidade de enraizamento das estacas (Grana Jr, 2000).

Os primeiros trabalhos objetivando a melhoria da técnica de estaquia para o mamoeiro foram iniciados por Peter Allan em 1964, na África do Sul. Estes trabalhos foram realizados com os clones 'Hortus Gold' e 'Honey Gold', sendo este último genótipo resistente à antracnose. Segundo Allan (1995), para utilização das estacas, a indução de brotações laterais no caule, pode ser promovida pela aplicação direta ou via injeção nos ramos, de uma mistura de vários fitorreguladores como citocininas e ácido giberélico. O mesmo autor citou que a remoção de pontos de crescimentos terminais e frutos, com retenção das folhas, promove o desenvolvimento de gemas laterais. Outros autores citaram que a indução de brotações laterais por meio de somente podas no caule é eficiente na indução de brotações laterais e tornam o processo mais econômico (Lopes et al, 2008; Barros et al, 2009).



#### **2.4.1.1. Dominância apical**

Em mamoeiro, a gema apical exerce forte dominância sobre as gemas laterais, impedindo que as brotações laterais possam crescer e se desenvolver uniformemente (Lopes et al., 2008). O elevado nível de auxina nas gemas apicais auxilia na manutenção de altos níveis de ABA (ácido abscísico) nas gemas laterais, inibindo o crescimento dessas. A dominância apical está relacionada ao balanço hormonal endógeno entre auxinas e citocininas. A alta relação auxina/citocinina mantém as gemas laterais dormentes, enquanto que a baixa relação auxina/citocinina estimula a formação das gemas laterais. Estas duas classes hormonais controlam o desenvolvimento vegetal atuando diretamente na definição dos meristemas e no tipo de órgão a ser formado (Taiz e Zeiger, 2009).

As auxinas são produzidas no ápice meristemático de órgãos aéreos, assim como gemas em brotamento, folhas jovens e, em menor proporção, nas extremidades da raiz, flores ou inflorescências de ramos florais em crescimento. O transporte deste hormônio vegetal é do tipo polar basípeto e a maior parte da auxina que atinge a raiz é translocada via floema. As citocininas são sintetizadas, principalmente, nas células jovens em divisão nos meristemas do ápice radicular e, em menor proporção, nos da parte aérea. O transporte da citocinina é realizado passivamente a partir das raízes, até a parte aérea através do xilema, juntamente com a água e os sais minerais. Quando uma planta tem o ápice caulinar removido, suprime-se a produção da auxina, fazendo com que a citocinina passe a atuar sobre o desenvolvimento/crescimento das gemas laterais (Shimizu-Sato e Mori, 2001; Taiz e Zeiger, 2009).

Em mamoeiro 'Tainung 01', em plantas de seis meses mantidas em casa de vegetação, com o objetivo de quebrar a dominância apical, Lopes et al. (2008) utilizaram de diferentes alturas de cortes no caule (20; 35 e 50 cm). Estes autores constataram que não houve diferença significativa entre os tratamentos para o número de brotos. No entanto, as plantas que foram submetidas ao corte de menor altura (20 cm), foram as que obtiveram o maior crescimento do broto terminal, com 7,79 cm, após 30 dias da poda. De acordo com esses autores, a menor altura da poda no tronco pode promover maior proximidade entre a parte aérea e o sistema radicular, o que pode favorecer uma ação hormonal mais rápida e uma concentração mais elevada de citocinina nas gemas laterais,

quando comparada às maiores alturas de poda dos demais tratamentos. A justificativa encontrada pelos autores se baseou em Taiz e Zeiger (2009), que citam que os meristemas dos ápices das raízes são regiões do tecido vegetal de maior síntese de citocininas livres, principalmente zeatina ribosídeo, que se movimentam das raízes para a parte aérea, via xilema, juntamente com a água e minerais.

Reuveni e Shlesinger (1990), quando utilizaram plantas jovens crescidas em casa de vegetação, fazendo apenas a remoção da gema apical, não obtiveram brotações. Barros et al. (2009) trabalharam com mamoeiro com 30 meses de idade e fizeram a poda do tronco do mamoeiro em várias alturas e, em plantas podadas a 2 metros de altura, a partir do solo obtiveram após 50 dias, uma média de 20,5 brotações,.

A quebra da dominância apical pode ser promovida com citocininas sintéticas, e o crescimento das gemas laterais pode ser promovido pela aplicação de giberelina (Cline, 1997). Estudos mostram que o ácido giberélico ( $GA_3$ ) apresenta importância fundamental na regulação do crescimento das brotações. Particularmente, o  $GA_3$  é dentre as giberelinas, o mais utilizado para manipular o crescimento de plantas, por promover grande alongamento da haste, devido ao aumento de expansão celular e do estímulo à dominância apical (Takahashi et al., 1991; Taiz e Zeiger, 2009).

A aplicação de fitorreguladores, como a BAP e o  $GA_3$  foram os mais eficientes para a indução de brotações laterais, principalmente quando aplicados em conjunto com a retirada da gema apical. As formas de aplicações destes fitorreguladores foram por meio da pasta lanolina pincelada no tronco, injeção no tronco com auxílio de seringa, e pulverizações na copa do mamoeiro (Reuveni e Shlesinger, 1990; Grana Jr, 2000; Giampan et al., 2005). Ono et al. (2004) utilizaram tratamentos com BAP e  $GA_3$  associados à retirada da gema apical. Estes autores verificaram que quando comparado a indução da formação das brotações laterais, a retirada da gema apical parece ter sido mais benéfica, tanto no crescimento em diâmetro, como no crescimento em comprimento das gemas laterais desenvolvidas. Os melhores resultados que estes autores conseguiram foram brotações de 0,83 cm de diâmetro e 19,38 cm de comprimento, com a utilização de BAP e  $GA_3$  a  $250 \text{ mg L}^{-1}$  cada, aplicados via foliar, associados à remoção da gema apical. As brotações laterais começam a surgir na primeira

semana após a eliminação da gema apical, e podem ser produzidas de 50 a 200 estacas por mamoeiro adulto (Reuveni e Shlesinger, 1990; Allan e Macmillan, 1991). Allan e Macmillan (1991) conseguiram obter 50 estacas adequadas para o enraizamento, utilizando a aplicação de fitorreguladores pelo método de injeções no tronco. Embora a utilização de fitorreguladores como as citocininas e o ácido giberélico possam promover a formação de brotações laterais em mamoeiro, esta metodologia não é viável economicamente em função dos gastos que se tem com a mão-de-obra e com a aquisição dos fitorreguladores. A utilização de somente a poda no caule, sem a aplicação dos fitorreguladores também estimula as brotações laterais no mamoeiro, conforme já descrito anteriormente (Lopes et al. 2008; Barros et al, 2009), sendo portanto a forma mais econômica para a obtenção das brotações laterais.

Segundo Barros et al. (2009), a poda do mamoeiro pode ser interessante, quando se pretende obter brotações laterais para propagação de matrizes superiores. Entretanto, estas plantas devem estar em ciclo final de produção, para evitar o desperdício de frutos. O mamoeiro tem um ciclo de produção com aproveitamento comercial relativamente curto, de aproximadamente 16 meses (Ferregueti, 2003). Sendo assim, a cada dois anos, teriam-se matrizes com sexo já definido, disponíveis para indução das brotações laterais (Barros et al., 2009).

#### **2.4.1.2. Enraizamento das estacas**

Em estacas, a formação de raízes ocorre a partir de modificações morfológicas e fisiológicas dos tecidos, e o início do processo ocorre pela desdiferenciação de algumas células adultas, que retornam à atividade meristemática e originam um novo ponto de crescimento, que pode diferenciar células em primórdios de raízes. Estas células diferenciadas crescem conectadas com um novo sistema vascular e rompem o córtex e a epiderme da estaca. Já em estacas herbáceas, as raízes podem surgir entre os feixes vasculares e emergir em filas, acompanhando-os, e as folhas na estaca podem favorecer o enraizamento, pois são locais de síntese de auxinas que serão translocadas para a base da estaca (Fachinello et al., 2005).

O enraizamento adventício de estacas é um processo peculiar e complexo, estando associado a estresse por dano mecânico, mudanças nas relações de água na planta e perda de influências correlativas devido à separação da parte aérea do sistema radicular original. Este processo é regulado pela interação de múltiplos fatores como fitormônios, carboidratos, compostos fenólicos, estado fisiológico da planta-matriz e características genéticas (Haissig, 1982; Smart et al., 2003).

Algumas plantas apresentam baixa capacidade de enraizamento nas estacas, como é o caso do mamoeiro, devendo assim ser tratadas com auxinas. Normalmente, se utiliza a aplicação de auxina visando reduzir o balanço citocinina/auxina, para promover a maior porcentagem, velocidade, qualidade e uniformidade de enraizamento (Xavier e Comercio, 1996; Hartmann et al 2011).

Dentre as substâncias hormonais, as auxinas são as mais utilizadas no enraizamento de estacas, por apresentarem relação direta com a formação de raízes laterais e adventícias. As auxinas mais conhecidas e utilizadas no enraizamento de estacas são o ácido indol-3-acético (AIA), o ácido indol-3-butírico (AIB), e o ácido  $\alpha$ -naftaleno acético (ANA) (Blazich, 1987, Hartmann et al., 2011). Dentre as auxinas, e em comparação às demais auxinas sintéticas, o AIB é a mais utilizada por se tratar de uma substância fotoestável, de ação localizada, menos sensível à degradação biológica, e devido à maior aderência à estaca (Hoffmann et al., 1996; Fachinello et al. 2005).

O fornecimento exógeno de auxina, em certas quantidades, pode promover uma alteração hormonal, favorecendo ou não o enraizamento de estacas. O aumento da concentração de auxina exógena aplicada em estacas provoca efeito estimulador de raízes até um valor máximo, a partir do qual qualquer acréscimo de auxinas tem efeito inibitório (Ramos et al., 2003; Tofanelli et al., 2003; Hartmann et al., 2011). De fato, alguns autores verificaram o baixo enraizamento em estacas quando tratadas com AIB, e eles justificaram que as estacas já possuíam níveis endógenos de auxinas suficientes para promoverem o enraizamento, assim a aplicação exógena de AIB não propiciou ganhos significativos no enraizamento. Com a utilização de  $2.000 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, e em comparação à ausência do tratamento, Pio et al. (2008) conseguiram apenas o acréscimo de 12,39% de estacas apicais de figueira enraizadas. Com a utilização de AIB, Lone et al. (2010) conseguiram apenas 19% de enraizamento em estacas

herbáceas do porta-enxerto de videira VR 43-43, enquanto que a não-utilização do tratamento apresentou 41% de enraizamento.

Dentre os vários fatores de que depende o enraizamento de estacas, destacam-se os ambientais, o estado fisiológico, o tipo de propágulo, a sua origem na copa e a época de coleta, que influenciam, sobretudo, na capacidade e na rapidez de enraizamento (Gomes, 1987; Paiva e Gomes, 2001).

A maturação fisiológica das brotações influencia no enraizamento, sendo a base da copa a mais favorável para a retirada das estacas (Paiva e Gomes, 2001). As estacas de plantas jovens possuem maior capacidade de enraizamento, entretanto o rejuvenescimento em plantas velhas pode se feito por meio de podas no caule (Couvillon, 1988; Simão, 1998). Em mamoeiro, este rejuvenescimento, por meio da poda, pode ser feito em plantas que estão em ciclo final de produção (Barros et al, 2009).

Nicoloso et al (2001) citaram que a resposta em relação ao tamanho da estaca no enraizamento e desenvolvimento da muda é dependente da espécie vegetal

A época do ano está estreitamente relacionada com a consistência da estaca, e estacas coletadas no período de crescimento vegetativo intenso (primavera/ verão) apresentam-se mais herbáceas e, de modo geral, nesta época, espécies de difícil enraizamento mostram maior capacidade de enraizamento, enquanto estacas coletadas no inverno possuem maior grau de lignificação e tendem a enraizar menos (Fachinello et al., 2005). De acordo com Zuffellato-Ribas e Rodrigues (2001), em relação àquelas que são retiradas no outono e inverno (semilenhosas e lenhosas), as estacas herbáceas retiradas no verão, os ramos estão em pleno crescimento e apresentam maiores doses de auxinas. Para o mamoeiro que apresenta uma baixa capacidade de enraizamento, a época mais propícia para a retirada das estacas é na estação de primavera e verão (Allan 1964; Allan 1990).

O horário em que os ramos são retirados da planta matriz pode influenciar na resposta de enraizamento. Recomendam-se as primeiras horas da manhã ou à noite, quando a planta não se encontra com deficiência hídrica, o que diminuirá a mortalidade das estacas decorrente da maior perda de água (Simão, 1998).

A luz interfere na produção de carboidratos dos ramos e nas características da estaca por meio da intensidade, da qualidade e do

fotoperiodismo (Simão, 1998). De acordo com Paiva e Gomes (2001), as estacas com folhas devem receber luminosidade máxima, de forma a propiciar um máximo de fotossíntese, para que haja acúmulo de substâncias indutoras do enraizamento. Hartmann et al. (2011) citaram que a luz deve ser controlada para que não ocorra aquecimento das folhas de modo a evitar a dessecação das estacas. A intensidade luminosa geralmente precisa ser reduzida, protegendo a planta com sombrite (50%) ou ripados, para evitar o excesso de irradiância nas estacas (Paiva e Gomes, 2001).

A temperatura tem importante função regulatória no metabolismo das estacas, sendo que as flutuações de temperatura são altamente desfavoráveis para o processo de formação de raízes adventícias (Bertoloti e Gonçalves, 1980). Segundo Hartmann et al. (2011), o ideal seria induzir o enraizamento em um meio artificial, em que a temperatura do substrato seja um pouco superior à do ar. Analisando por outro lado, os autores citam que em baixas temperaturas, a respiração é reduzida, o que permite um melhor acúmulo dos produtos obtidos por meio da fotossíntese. Este acúmulo pode otimizar o desenvolvimento das raízes. Segundo Couvillon (1998), um substrato ideal é o que retém um teor de água suficiente para evitar a dessecação da base da estaca e, uma vez saturado, este substrato tenha espaço poroso adequado para facilitar o enraizamento e evitar o desenvolvimento de doenças. O substrato deve possuir baixa densidade, boa capacidade de absorção e retenção de água, boa aeração e drenagem, para evitar o acúmulo de umidade, além de estar isento de pragas, doenças e substâncias tóxicas (Wedling et al, 2002).

O enraizamento é influenciado por hormônios presentes nas estacas. As auxinas são as responsáveis pelo enraizamento, dentre elas destacam-se o AIA, que está presente nas regiões de crescimento, como no ápice caulinar, gemas de crescimento e folhas (Hinojosa, 2000). De acordo com Fachinello et al. (2005), as folhas e gemas são consideradas fontes de auxinas, carboidratos e nutrientes, necessárias para a formação de raízes nas estacas. Paiva e Gomes (2001) citam que a presença de folhas nas estacas pode favorecer o enraizamento, aumentando, porém, a transpiração, o que pode desidratá-las e inviabilizar o pegamento. O uso de um sistema de nebulização pode contornar este problema, por manter a umidade elevada ao redor da estaca, diminuir a temperatura e reduzir a transpiração e respiração, favorecendo assim o enraizamento. Embora

seja necessária a nebulização, Hartmann et al. (2011) reportaram que se deve tomar cuidado, pois o excesso de água no substrato reduz o arejamento, o que pode levar a condições de anaerobiose e conseqüentemente, à morte das estacas.

Allan (1964) demonstrou que a estaquia é um método de propagação vegetativa que pode ser realizado em mamoeiro. Por este método, é possível multiplicar plantas com características desejáveis, como híbridos, plantas hermafroditas livres de pragas e doenças, entre outras. As plantas assim propagadas apresentam a característica adicional de iniciarem o florescimento logo após o plantio e produzir os primeiros frutos próximos ao solo. O início de frutificação dessas plantas, portanto, é anterior ao de plantas provenientes de sementes (Giampan et al., 2005).

De acordo com Allan (1990), as estacas de mamoeiro podem ser enraizadas por meio da utilização de ácido indol-3-butírico (AIB), sob nebulização intermitente e temperatura mínima em torno de 30 °C no substrato de areia com leite aquecido. A grande desvantagem encontrada neste sistema descrito por Allan está no fato de que para manter a temperatura na base estacas em torno de 30 °C é necessária a utilização de instalações mais sofisticadas, como o leite de areia aquecido. Este sistema requer gastos adicionais com a utilização de energia elétrica para aquecer o leite e também demanda mais mão-de-obra, visto que depois de enraizadas as mudas, é necessário o transplante para sacolas plásticas. Nestas condições experimentais, Allan (1964) trabalhando com F<sub>1</sub> de 'Hortus Gold', na África do Sul, utilizando AIB a 1000 mg L<sup>-1</sup> e usando estacas de 2,5 cm de diâmetro e tamanho entre 12,7 e 30,5 cm colhidas no outono, obteve 87% de enraizamento. O autor enfatiza a importância destas medidas para o bom enraizamento. Desta forma, quando usou estacas com apenas 1,25 cm de diâmetro e menores que 12,7 cm, também colhidas no outono, obteve apenas 6% de enraizamento. Em outro trabalho Allan (1967) utilizou o leite aquecido a 30 °C e em função da época de cultivo, teve resultados diferentes na porcentagem de enraizamento, com 68% de enraizamento quando as estacas foram cultivadas no início da primavera, e 80% quando cultivadas no verão.

Em dois genótipos de mamoeiro, 'Sunrise Solo' e 'Tainung 01', Costa e Costa (2003) induziram o enraizamento com o fitorregulador AIB a 4000 mg L<sup>-1</sup>, e conseguiram 83% e 85% de enraizamento, respectivamente. Neste tratamento, os

autores eliminaram os limbos foliares basais, permanecendo o pecíolo com aproximadamente 10 cm de comprimento. Já em outro tratamento em que houve a eliminação total das folhas basais (limbos foliares + pecíolo), houve menor porcentagem de enraizamento, 55% no 'Sunrise Solo' e 59% no 'Tainung 01'. Os autores relataram que a retirada por completo dos pecíolos, promoveu a entrada de patógenos no caule do mamoeiro, e que nas estacas, mesmo sendo tratadas com fungicidas, houve a ocorrência de doenças, levando algumas destas à morte. Ramkhelawan et al. (1999) obtiveram 83,3% de enraizamento em estacas de mamoeiro, quando utilizaram 3000 mg L<sup>-1</sup> de AIB. No entanto, os autores obtiveram 35% de mortalidade no transplântio.

#### **2.4.2. Micropropagação convencional**

A micropropagação vegetal consiste basicamente, no cultivo *in vitro*, sob condições assépticas e controladas, de propágulos vegetativos chamados de explantes, os quais na presença de fitorreguladores e meio nutritivo adequado são induzidos a produzir novas gemas, que serão então multiplicadas nestas mesmas condições, a cada novo ciclo de cultivo (Hartmann et al., 2011).

No Brasil, em várias culturas como plantas ornamentais, batata, morango, banana e abacaxi, a produção de mudas via micropropagação, já é amplamente utilizada em escala comercial (Brscan, 2009). Já para o mamoeiro, a propagação clonal *in vitro* ainda não é empregada comercialmente. Os protocolos de micropropagação descritos até o momento ainda não se encontram suficientemente aperfeiçoados para o uso comercial, principalmente por causa dos contaminantes endógenos. Quando se retira o explante das plantas matrizes no campo, para levar ao laboratório, levam-se também fungos e bactérias, e ao cultivar os explantes *in vitro*, onde há açúcares e nutrientes, estes microorganismos têm tendência em aparecer antes de o material se multiplicar, matando assim os explantes.

O sucesso da micropropagação de uma cultura envolve diversos estádios de realização, que vai desde a escolha adequada da planta matriz até a aclimatização das mudas. O conceito de estádios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro* foi descrito por Murashige (1974). Ele



estabeleceu uma seqüência de três estádios. O estádio I compreende, sob condições assépticas, a seleção, a desinfestação e o cultivo dos explantes em meio nutritivo (fase de estabelecimento); no estádio II, se processa a multiplicação dos propágulos, por meio de sucessivos subcultivos em meio próprio para a multiplicação; e o estádio III é a fase de transferência dos ramos formados na fase anterior, para o meio de enraizamento, visando o transplântio das plântulas obtidas para solo ou substrato. George et al. (2008) descreveram ainda o estádio 0, que corresponde ao tratamento dado à planta-matriz, e o estádio IV, que diz respeito à aclimatização das mudas produzidas.

Os meios nutritivos utilizados na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Grattapaglia e Machado, 1998). Um outro fator fundamental é o uso dos fitorreguladores. O balanço entre auxinas e citocininas em alto/baixo estimula o enraizamento, o balanço inverso promove a formação da parte aérea, e concentrações iguais promovem a produção de calos (Skoog e Miller, 1957). As auxinas são substâncias que controlam o alongamento celular e as citocininas estimulam a divisão celular (Pasqual, 2001; Taiz e Zeiger, 2009).

Na micropropagação do mamoeiro, os fitorreguladores mais utilizados nos trabalhos científicos são as auxinas como o ANA (ácido  $\alpha$ -naftaleno acético), AIB (ácido Indol-3-butírico) e AIA (ácido indol-3-acético), e as citocininas: cinetina (6-furfurilaminopurina) e BAP (6-benzilaminopurina), nos diferentes estádios, em diferentes combinações.

Nos diversos estádios do cultivo *in vitro* do mamoeiro, para se otimizar a produção em larga escala de micropropágulos, têm-se utilizado diferentes metodologias. No entanto, o meio nutritivo MS (Murashige e Skoog, 1962) vem sendo mais utilizado, variando apenas alguns componentes do meio ou as condições do ambiente de cultivo da sala de crescimento (Chan e Teo, 2002; Rohman et al., 2007; Panjaitan, 2007; Schmildt et al., 2010).

#### 2.4.2.1. Fase de estabelecimento *in vitro*

No estabelecimento de uma cultura de mamoeiro *in vitro*, a reatividade dos explantes, que é indicada pela formação da roseta foliar, é de grande importância, pois demonstra haver uma adaptação dos explantes às condições *in vitro* e isenção de contaminantes. Este fato pode propiciar uma maior reatividade destes explantes à aplicação de fitorreguladores na fase seguinte, que é a de multiplicação (Grattapaglia e Machado, 1998). Nesta fase de estabelecimento, Schmidt e Amaral (2002) obtiveram a formação da roseta foliar em 83,42% dos segmentos apicais com a adição de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 5,38 mg L<sup>-1</sup> de Cinetina. Nestas mesmas condições de cultivo, Schmidt et al. (2007a) obtiveram 100% dos segmentos apicais com roseta foliar, com pouca massa de calo, e verificaram que a taxa de multiplicação era influenciada pelos tratamentos com fitorreguladores usados na fase de estabelecimento. Neste experimento, durante cinco subcultivos, os autores obtiveram uma taxa de multiplicação constante de 5,288. Estes valores são superiores aos 40% de culturas reativas encontrados por Rajeevan e Pandey (1986), tanto em explantes de plantas jovens, quanto de plantas adultas. Esta boa reatividade citada nos trabalhos supracitados foi alcançada em explantes provindos de plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação, onde as condições ambientais foram controladas.

Os explantes que são retirados de plantas juvenis tendem a apresentar menor contaminação em laboratório do que os retirados de plantas adultas, porque as células do meristema são mais ativas e de multiplicação mais rápida do que a proliferação bacteriana (Grattapaglia e Machado, 1998). Este fato explica em parte porque os explantes provenientes de mamoeiro cultivados no campo, quando inoculados em meio de cultura de estabelecimento, não se mostraram reativos, mas apresentaram contaminações. Segundo Grattapaglia e Machado (1998) e Agnihotri et al. (2004), estas contaminações são ocasionadas por bactérias endofíticas. De acordo com Litz e Conover (1981) e Vianna et al. (1997), as bactérias que causam as contaminações durante a micropropagação do mamoeiro são as *Pseudomonas* sp. Thomas et al. (2007) identificaram o gênero de bactérias *fastidiosa*. A descontaminação dos explantes provindos de plantas do campo foi feita por Vianna et al. (1997), utilizando rifampicina a 50 mg L<sup>-1</sup>, obtendo 70% de desinfestação. Rohman et al. (2007) conseguiram baixar a

contaminação para 50% quando utilizaram a rifampicina a  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , enquanto que sem a utilização do antibiótico a contaminação foi de 90%. Os resultados obtidos não mostram uma boa eficácia dos antibióticos na desinfestação dos explantes de mamoeiro, e também não tem sido viável economicamente utilizá-los.

#### **2.4.2.2. Fase de multiplicação *in vitro***

A fase de multiplicação começa com as culturas que se apresentam reativas, ou seja, que formaram roseta foliar na fase de estabelecimento. Esta fase tem por objetivo a obtenção do maior número de ramos possíveis, com o mínimo de variação de explante para explante, além da qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas. Isto pode determinar o sucesso na fase de enraizamento (Grattapaglia e Machado, 1998). Litz e Conover (1981) e Schmidt (1994) propuseram um meio com os fitorreguladores BAP a  $0,45 \text{ mg L}^{-1}$  e ANA a  $0,093 \text{ mg L}^{-1}$ , os quais permitiram uma alta proliferação de ramos em tufos, com folhas pequenas e discretas, de crescimento rápido, próprios para o subcultivo a cada 20 a 30 dias. Litz e Conover (1981) mantiveram o material adulto por 13 subcultivos, com taxa de multiplicação constante. Com este meio, Schmidt (1994) obteve uma taxa de multiplicação de 8,4 e 5,4, respectivamente, para o mamoeiro tipo 'Formosa' e 'Solo' no primeiro subcultivo. Porém, ao longo dos subcultivos, a taxa de multiplicação foi inconstante. Rohman et al. (2007) também testaram diferentes concentrações de BAP e ANA para o meio de multiplicação. A utilização de gemas laterais como explantes em meio MS suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, foi mais eficiente, pois nestas combinações a taxa de multiplicação foi maior em todos os seis subcultivos, com médias de 7,9; 12,6; 13,6; 14,4; 16,2 e 11,8.

Na fase de multiplicação, as substâncias como o sulfato de adenina, a caseína hidrolisada e a riboflavina têm sido testadas para melhorar a qualidade dos ramos e aumentar a taxa de multiplicação.

A adição de adenina na forma de sulfato de adenina é muito utilizada em meios de cultura de tecidos vegetais na fase de multiplicação, sendo que seu efeito pode ser comparado ao de uma citocinina fraca, ou ainda haver uma

interação com as próprias citocininas no meio. Schmildt et al. (2007b) utilizaram sulfato de adenina em meio de multiplicação e observaram que a ausência de sulfato de adenina no meio de multiplicação produziu gemas e segmentos nodais reduzidos e compactos, o que em cultura de tecidos não se torna interessante, pois não enraizam bem. O padrão adequado de ramos para o enraizamento foi obtido com a utilização de  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfato de adenina.

Em mamoeiros Co-5', 'Madhur', 'Pusa Dwarf' e 'Washington', Saha et al. (2004) constataram a maior taxa de proliferação dos segmentos nodais, com a adição de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfato de adenina, com  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA. Nestas condições, quando se aumentou o sulfato de adenina para  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , houve queda significativa da taxa de multiplicação. Os resultados encontrados estão em conformidade com Grattapaglia e Machado (1998), que citaram que o excesso de citocinina, pode ser tóxico para as culturas em multiplicação.

Chan e Teo (2002) avaliaram seis clones de mamoeiro cultivar 'Eksoitika', sendo três de sexo hermafrodita e três de sexo feminino, durante 12 semanas. Estes autores, em dois subcultivos, conseguiram obter 38,2 brotos por explante, no tratamento com meio MS, adicionado de BAP a  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , caseína hidrolisada a  $500 \text{ mg L}^{-1}$  e riboflavina a  $0,38 \text{ mg L}^{-1}$ .

Panjaitan et al. (2007), para a proliferação de ramos, cultivaram explantes de *Carica papaya* cv. 'Eksoitika' de mamoeiro hermafroditas em meio MS suplementado de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de caseína hidrolisada, com o solidificante fitagel a  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ , e adotaram a combinação de BAP e ANA como tratamentos. O melhor tratamento para a multiplicação foi obtido com a utilização mais elevada de BAP a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  combinado com  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, em que obtiveram, após 12 semanas de cultivo, 73,3 ramos por explante. As concentrações de BAP até  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  causaram o aumento de ramos por explante. Enquanto que, concentrações de ANA a  $0,1$  e  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  combinado com BAP, ou sozinho, propiciaram a formação de calos na base do explante.

Na maioria das culturas cultivadas *in vitro* a fonte de carbono comumente utilizada é a sacarose, e em mamoeiro a concentração de  $30 \text{ g L}^{-1}$  é mais empregada. Kabir et al. (2007) testaram diferentes fontes de carbono, o açúcar cristal, sacarose e a glicose, todas nas concentrações de  $20$ ,  $30$  e  $40 \text{ g L}^{-1}$ . Os resultados mostraram o que já vinha sendo adotado, em que a sacarose é mesmo a mais eficiente. A adição de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose em meio MS suplementado de

BAP a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  e cinetina a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  proporcionaram 82% de ramos multiplicados, com o número máximo de brotos por ramo de 41,2, em 6 semanas de cultivo. Teixeira e Teixeira (2004) utilizaram uma concentração menor de sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) no meio de multiplicação MS, suplementado com  $7,52 \text{ mg L}^{-1}$  de riboflavina,  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, combinados com  $1,0$  ou  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, e obtiveram somente 53,3% de culturas brotadas.

#### **2.4.2.3. Fase de enraizamento *in vitro***

A última fase *in vitro* na cultura do mamoeiro, requer um meio de cultura específico para o enraizamento, com a utilização de uma auxina. Dentre as auxinas o AIB tem sido o fitorregulador mais utilizado na indução do enraizamento *in vitro* do mamoeiro (Schmildt et al., 1997; Rohman et al., 2007). Resultados satisfatórios em mamoeiro cv. Formosa foram obtidos por Schmildt et al. (1997) com formação de raízes normais nos ramos cultivados *in vitro*, com 45% de enraizamento quando utilizaram  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB.

Panjaitan et al. (2007) utilizaram por uma semana cinco concentrações de AIB para induzir o enraizamento e posteriormente transferiram os ramos para o meio MS com ou sem a presença de vermiculita. A exposição dos ramos por uma semana em meio com AIB a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , seguido da transferência para um meio com vermiculita, estimulou 90% dos ramos a produzir raízes, o que foi relativamente alto quando comparado com os outros tratamentos. O maior número de raízes por ramo foi obtido com a utilização de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB sem vermiculita, sendo estas raízes também de melhor qualidade, finas e sem calos. Com esta mesma concentração de AIB a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  em meio  $\frac{1}{2}$  MS, Rohman et al. (2007) obtiveram somente 50% de enraizamento, tendo em média 5 raízes por ramo, com comprimento médio de 2,1 cm.

Para o enraizamento do mamoeiro, em que geralmente se utiliza AIB, Kabir et al. (2007) conseguiram um resultado diferente, com uma combinação de duas auxinas, o AIB a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  e o ANA a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Nestas condições, os autores obtiveram o resultado expressivo de 92% de enraizamento, e formação de 10,3 raízes por ramo, com comprimento de 7,2 cm. As raízes apresentaram desenvolvimento normal (sem deformidades) e com presença de raízes

secundárias. O resultado encontrado para o enraizamento é apropriado para os ramos serem aclimatizados, conforme Reuveni e Shlesinger (1990), que consideram como ótimo, quantidades superiores de quatro raízes por planta e comprimento mínimo de 1 cm. Estes autores sugeriram que plântulas com raízes muito curtas e com menor número de raízes não desenvolvem bem quando transplantadas, podendo levar a sua morte.

Schildt et al. (2010) trabalharam com explantes de mamoeiro 'Tainung 01', com a utilização de diferentes concentrações de AIB, e verificaram que a presença de AIB no meio de cultivo, propiciou incrementos crescentes lineares de enraizamento à medida que estes eram aumentados. Neste experimento, houve aumento da porcentagem de calo. Segundo os autores, para melhorar a eficiência do sistema e evitar a formação de raízes a partir de calos, o ideal é evitar utilizar concentrações acima de 0,3 de  $\text{mg L}^{-1}$  AIB.

No México, May et al. (2007) comprovaram a viabilidade da micropropagação estabelecendo cinco mil plantas hermafroditas micropropagadas geneticamente homogêneas em condições de campo. Zaidan (2002) utilizou explantes de mamoeiro hermafrodita e feminino na micropropagação, e, em nível de campo, constatou que as mudas provindas do cultivo *in vitro* foram compatíveis com tipo de sexo das plantas matrizes, e verificou também que houve antecipação no florescimento. Nesta condição, a altura de inserção no caule dos primeiros botões florais foi em média de 77 cm, sendo menor do que os mamoeiros plantados por semente. A redução da inserção no caule dos primeiros botões florais torna-se importante, pois a obtenção de plantas com os primeiros frutos mais baixos permite uma melhor colheita durante períodos mais prolongados da cultura (Silva et al., 2010).

#### **2.4.2.4. Condições do ambiente de cultivo**

A micropropagação é uma técnica de multiplicação de plantas, de forma assexuada, que vem se expandindo, devido aos seus benefícios para os produtores em geral. Consiste em formar mudas com características desejáveis dentre as quais se destacam: obtenção de mudas saudáveis, mesmo se provenientes de matrizes infectadas, através de tecidos meristemáticos; produção de um

grande número de mudas em um curto espaço de tempo; maior vigor das mudas; multiplicação de plantas difíceis de serem propagadas por métodos convencionais; auxílio em programas de melhoramento vegetal (Kozai et al., 1997, Grattapaglia e Machado, 1998).

A micropropagação convencional é uma técnica muito importante para a propagação de mudas de muitas espécies, como dito, todavia, em função do ambiente de cultivo, as plântulas produzidas neste sistema apresentaram um metabolismo heterotrófico ou mixotrófico, necessitando assim, em algumas culturas de ajustes no sistema.

De acordo com a capacidade fotossintética, Grout (1988) agrupou as plântulas cultivadas em meio asséptico em duas classes. Na primeira classe, agrupou as plântulas cujas folhas formadas não desenvolvem capacidade fotossintética, caso estas crescessem em meio contendo sacarose (plântulas heterotróficas e mixotróficas). Na segunda classe, encontram-se as plântulas adaptadas para condições autotróficas *in vitro* que, apesar das condições artificiais de cultivo, podem apresentar uma significativa taxa fotossintética.

As plântulas cultivadas *in vitro* podem apresentar um metabolismo heterotrófico caso estas cresçam em condições específicas, como elevadas concentrações de carboidratos, baixa irradiância, limitada troca de gases e alta umidade relativa do ar (Majada et al., 2000, Aragón et al., 2010). Arigita et al. (2002) explicam que na micropropagação convencional, os explantes são cultivados em frascos com alta umidade relativa do ar (aproximadamente 98%), alta concentração de etileno, baixa concentração de CO<sub>2</sub> (que decresce de 3.000 a 9.000 ppm no período escuro, para menos de 100 ppm durante o fotoperíodo), baixa densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, isto é, baixa luminosidade (40 – 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e com sacarose como maior fonte de energia metabólica. Estas condições no ambiente de cultivo *in vitro* afetam a morfogênese dos explantes acarretando, algumas vezes, conseqüências negativas ao crescimento e ao desenvolvimento das culturas, o que pode comprometer a obtenção de taxas de estabelecimento e de multiplicação satisfatórias (Campostrini e Otoni, 1996). Os explantes cultivados neste sistema desenvolvem desordens anatômicas e fisiológicas que não possibilitam que a maquinária fotossintética opere normalmente (Arigita et al., 2002).

Em geral, as plântulas crescidas em ambientes considerados “heterotróficos” apresentam parte aérea muito pequena, menor quantidade de cêra cuticular e epicuticular nas folhas, tecidos com reduzida resistência mecânica (menos colênquima e esclerênquima), maior conteúdo de água, estômatos não-funcionais, folhas finas e pequenas com poucos tricomas e com baixa atividade fotoautotrófica (Ziv et al., 1987; Pospisilová et al., 1992; Kitaya et al., 2005). Quando levadas a condições *ex vitro*, as plântulas cultivadas nestes ambientes podem ser submetidas a estresse acentuado, em função da perda excessiva de água e a necessidade de mudança do metabolismo heterotrófico para o autotrófico (Moreira, 2001). O estresse hídrico é relatado como principal causa de mortalidade das plântulas durante a aclimatização (Barboza, et al., 2006). Ao transferir as plântulas do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro*, esta ação deve ser feita de maneira menos abrupta, de forma que as plântulas cultivadas *in vitro* possam ir se adaptando a uma condição de metabolismo autotrófico. Ao realizar esta passagem lenta do metabolismo heterotrófico, para o metabolismo autotrófico, as plântulas estão menos sujeitas às injúrias profundas, evitando assim a morte das plântulas (Brainerd e Fuchigami, 1981; Silva et al., 1995). A etapa de aclimatização pode chegar a ser um fator limitante no processo de micropropagação (Grattapaglia e Machado, 1998).

#### **2.4.3. Micropropagação em ambiente modificado**

A indução das plântulas ao metabolismo fotoautotrófico é possível com a adoção de estratégias relacionadas à alteração do ambiente de cultivo. Dentre as alterações, cita-se a modificação na qualidade de luz que chega às plântulas. Isto pode ser obtido por meio da utilização da luz vermelha tipo Growlux (Kim et al., 2004; Mothé et al., 2008). Pode-se também elevar o nível de irradiância por meio da elevação do número de lâmpadas na sala de cultivo (Anna et al., 1999; Escalona et al., 2003; Crespo et al., 2007), bem como por meio do emprego de luz natural (Erigh e Schuch, 2005). Ainda, as alterações podem ser feitas modificando as trocas gasosas, como exemplo utilizando biorreatores (Kozai et al., 1990; Etienne e Berthouly, 2002; Grigoriadou e Leventakis, 2003; Aragon et al., 2010). Uma outra forma é a redução ou mesmo a exclusão da sacarose do



meio de cultivo (Langford e Wainwright, 1987; Ledo et al., 2007; Fuentes et al., 2007).

Estas modificações no ambiente *in vitro* poderão até mesmo eliminar por completo a aclimatização tradicional, refletindo em significativos aumentos na taxa de sobrevivência das plântulas após o transplante para o solo, reduzindo os custos das mudas micropropagadas (Campostrini e Otoni, 1996).

#### **2.4.3.1. Carboidratos**

Na micropropagação convencional, as plântulas se desenvolvem como organismos heterotróficos, ou seja, realizam pouca ou nenhuma fotossíntese utilizando a sacarose no meio de cultura como principal fonte de carboidrato (Kozai, 1991; Kitaya et al., 1995).

A micropropagação fotoautotrófica (sem açúcar) apresenta algumas vantagens sob o cultivo heterotrófico (com açúcar). Entre as vantagens cita-se a redução do risco de contaminação microbiana, a melhoria das características fisiológicas da planta e a redução do estresse da planta durante a aclimatização (Zobayed et al., 2000; Afreen et al., 2002).

Quando as plântulas são cultivadas *in vitro* em meio de cultura sem açúcar, existe necessidade de se aumentar a intensidade luminosa e a difusão de CO<sub>2</sub> e da umidade (vapor da água) em torno da planta (Kozai e Nguyen, 2003). Nesta condição torna-se possível promover a fotossíntese, a transpiração e o acúmulo de matéria seca (Kitaya et al., 1997).

Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese dos compostos orgânicos necessários para o crescimento das células, além de atuarem como um componente osmótico do meio de cultura (Torres e Caldas, 1990). Os mesmos autores relatam que a quantidade elevada de carboidrato adicionada ao meio de cultura pode elevar a pressão osmótica do meio e assim reduzir o crescimento das plântulas, por meio de redução na absorção de água e de nutrientes devido à alteração de potencial hídrico entre o meio de cultivo e a plântula desfavorecendo a absorção desses.

Lédo et al. (2007) constataram que o aumento da concentração de sacarose de 60 g L<sup>-1</sup> para 80 g L<sup>-1</sup>, no meio de cultura para o coqueiro-anão,

provavelmente tenha promovido um efeito depressivo no metabolismo das plântulas, o que resultou em maior porcentagem de plântulas anormais. Ribeiro et al. (2008) conseguiram o maior comprimento de brotos em copo-de-leite com sacarose a  $30 \text{ g L}^{-1}$ , havendo redução no tamanho quando elevou a concentração de sacarose. Mosaleeyanon et al. (2004) verificaram no cultivo de *Samanea saman* Merr também uma redução na altura dos ramos, à medida que a concentração de sacarose foi aumentada. Entretanto, o maior comprimento dos ramos (8,8 cm) foi obtido na ausência de sacarose no meio.

Langford e Wainwright (1987) sugeriram que as alterações anatômicas e fisiológicas que podem surgir nos explantes cultivados sob regime heterotrófico não possibilitam que o aparato fotossintético opere normalmente, porque a utilização do dióxido de carbono é reprimida pela presença de sacarose exógena. Grout e Donkin (1987) e Hadider e Desjardins (1994) complementam afirmando que esta repressão ocorre devido ao acúmulo de amido e à inibição da enzima Rubisco. Os autores esclarecem, porém, que em plantas cultivadas *in vitro* sob altas concentrações de sacarose, a síntese reduzida dos açúcares favorece o acúmulo de carboidratos no tecido.

Fuentes et al. (2007) confirmaram em plântulas de coco uma diminuição linear da atividade da enzima Rubisco, quando aumentaram os níveis de sacarose de 0 até  $90 \text{ mg L}^{-1}$ . Rodrigues et al. (2006) comentam que o excesso de sacarose também inibe a síntese de clorofila, reduzindo a capacidade fotossintética das culturas.

Langford e Wainwright (1987) trabalhando com plântulas de rosa (*Rosa sp.*), observaram que a fotossíntese aumentou quando a concentração de sacarose no meio de crescimento foi reduzida. Resultados similares foram também encontrados em plântulas de *Eucalyptus* cultivadas com sacarose, em que se obteve uma taxa fotossintética significativamente menor que aquelas cultivadas na ausência desse carboidrato (Inoue et al., 1988). Da mesma forma, Fuentes (2007) aumentou a taxa fotossintética líquida do coco na ausência, ou redução da sacarose de 90 para 45 ou  $22,5 \text{ g L}^{-1}$ . Mosaleeyanon et al. (2004) obtiveram a maior taxa fotossintética em *Samanea saman* Merr na ausência de sacarose no meio de cultura, e à medida que se aumentou a concentração de sacarose e  $\text{CO}_2$  simultaneamente houve a redução na taxa fotossintética.

Na última fase da cultura *in vitro*, Gribaudo e Fronda (1993) sugeriram adotar a diminuição da concentração de sacarose, com o intuito de promover a fotossíntese e capacitar a planta ao metabolismo autotrófico. Contudo, ainda existem controvérsias. Wainwright e Scrace (1989) e Leite et al. (2000) sugeriram manter a sacarose no nível normalmente utilizado ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) ou, até mesmo, aumentá-lo em uma fase anterior à aclimatização. Esse condicionamento em altas concentrações de sacarose aumentaria as reservas de carboidratos armazenados pelas folhas, aumentando, assim, a energia disponível para as plântulas durante o processo de aclimatização (Skrebsky et al., 2004).

A utilização de sacarose em altas concentrações pode gerar plântulas com metabolismo heterotrófico ou mixotrófico, mesmo assim em algumas espécies, verifica-se que ocorre um aumento na biomassa seca nessas condições. Crespo (2007) e Mothé et al. (2008) constataram em plântulas de cana-de-açúcar o aumento da biomassa seca da parte aérea e da raiz, quando a concentração de sacarose foi aumentada de 0 até  $50 \text{ g L}^{-1}$ . Nicoloso et al. (2003) também verificaram o efeito positivo da sacarose na produção de matéria seca de ginseng brasileiro. Estudos comprovaram que 75 a 85% do aumento da biomassa seca se deve à incorporação de carbono pela adição de sacarose (De Riek et al., 1997). Stancato e Tucci (2010) ressaltaram que a acumulação de massa seca de plântulas está positivamente correlacionada com o alto conteúdo de sacarose no meio de cultura.

#### **2.4.3.2. Trocas gasosas ( $\text{CO}_2$ , $\text{O}_2$ e $\text{H}_2\text{O}$ )**

A suplementação de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) no frasco da cultura de tecidos se dá pelo incremento das trocas gasosas por meio de filtros ou do aumento da concentração do  $\text{CO}_2$  atmosférico no ambiente exterior ao frasco (Kitaya et al., 1995).

O acréscimo da concentração de  $\text{CO}_2$  promove o aumento da fotossíntese, em função do efeito direto do aumento na disponibilidade deste gás nos sítios de carboxilação da enzima Rubisco (Ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase-oxigenase) (Arigita et al., 2002). Na micropropagação fotoautotrófica, em função do fornecimento de  $\text{CO}_2$  e da maior intensidade luminosa, a planta

consegue se desenvolver em um sistema que reduz a evapotranspiração, formando maior quantidade de estômatos (Zobayed et al., 2000).

Uma prática que vem sendo testada para favorecer as trocas gasosas é o uso de diferentes sistemas de vedação dos frascos, utilizando-se materiais mais porosos, tais como algodão ou filtros permeáveis a gases (Kozai e Nguyen, 2003). Outra forma de melhorar as trocas gasosas é utilizar o sistema de biorreatores, que são equipamentos utilizados para o cultivo de células, tecidos, órgãos (como as gemas) ou embriões vegetais em meio de cultura líquido (Etienne e Berthouly, 2002; Teixeira, 2002). Penchel et al. (2007) relataram que os biorreatores são eficazes no processo de cultivo *in vitro*, pois consistem de um sistema com certo grau de automação, possibilitando redução de mão-de-obra e alta produção na multiplicação de plântulas. Por outro lado o uso de biorreatores também apresenta algumas desvantagens devido à falta de experimentos e à complexa interação entre a fisiologia das plântulas cultivadas nestas condições, ao alto investimento na aquisição dos equipamentos, manutenção e treinamento de pessoal e a ocorrência de contaminações, que leva a custos e perda de tempo (Silva, 2006)

Kozai et al. (1990) verificaram que plântulas micropropagadas de *Cymbidium* sp. apresentaram maiores taxas fotossintéticas líquidas e, conseqüentemente, maior crescimento, quando os frascos foram enriquecidos com CO<sub>2</sub>, e cultivados sob intensidade luminosa alta (226  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Esses mesmos autores concluíram que o fornecimento de condições favoráveis à fotossíntese resultou em crescimento autotrófico para o cultivo *in vitro*.

Arigita et al. (2002) trabalharam com plântulas de kiwi e verificaram que o fornecimento de CO<sub>2</sub> a 600 ppm aos frascos de cultura proporcionou uma maior taxa fotossintética, maior conteúdo de clorofilas *a* e *b*, e uma menor taxa transpiratória. Constataram também que a elevação de CO<sub>2</sub> para 2000 ppm ocasionou acréscimos no conteúdo da enzima Rubisco e de proteínas totais.

No cultivo *in vitro* de banana, a utilização de alta concentração de CO<sub>2</sub> (1200 ppm), associada à alta irradiância (150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), aumentou o conteúdo da enzima responsável pela fixação do CO<sub>2</sub>, a PEPCase (fosfoenolpiruvato carboxilase) e também a atividade fotossintética das plântulas, quando comparado com outros tratamentos de menor irradiância e CO<sub>2</sub> (Aragón et al., 2010).

Yang e Yeh (2008) trabalharam com *Calathea orbifolia* em cultivo semi-sólido e com biorreatores, e verificaram que houve aumento de clorênquima, parênquima aquífero, e redução da quantidade de estômatos na epiderme abaxial de folhas quando utilizaram o sistema de biorreatores de imersão temporária. Os autores ainda evidenciaram uma maior taxa fotossintética e rendimento quântico máximo do fotossistema II com os biorreatores.

Crespo (2007) trabalhando com cana-de-açúcar em frascos ventilados observou que a troca gasosa no interior destes promoveu maior ajuste estomático, devido provavelmente à movimentação de ar em torno das plântulas, ocasionando melhor regulação na abertura e fechamento dos estômatos. O mesmo autor cita que a movimentação permite a remoção da camada de ar limítrofe, tornando os estômatos mais responsivos à ação do ar externo às células estomáticas da epiderme das plântulas. Ziv (1995) cita que plântulas micropropagadas em frascos que não permitem as trocas gasosas podem apresentar elevada transpiração cuticular e estomática. Nestas condições de ausência de trocas gasosas, os estômatos estão freqüentemente abertos, o que leva a estresse hídrico na fase *ex vitro*.

A renovação da atmosfera do recipiente de cultivo possibilita a remoção do gás etileno produzido pelas plântulas, o qual pode ter efeito inibidor ao crescimento. Vários autores citam que este gás produzido causa comprometimento na capacidade fotossintética das plântulas (Buddendorf-Joosten e Woltering, 1994; De Proft et al., 1985). É sabido que o etileno causa nas plantas uma resposta tríplice caracterizada pela senescência precoce, engrossamento do caule, alteração na curvatura das plantas (epinastia), abscisão foliar e inibição do crescimento (Taiz e Zeiger, 2009). Em ramos de mamoeiro Drew (1988) verificou que o gás etileno ocasionou a senescência foliar.

#### **2.4.3.3. Relações hídricas**

Geralmente, em condições de micropropagação convencional, a maioria das espécies de plântulas cultivadas *in vitro* tem, geralmente, a cutícula pouco desenvolvida devido à alta umidade relativa (90 a 100%) que ocorre no ambiente *in vitro* (Fraguas, 2003). Cita-se também que nestas condições ocorre uma menor

densidade de estômatos, redução na espessura do mesófilo, com alta proporção de espaços intercelulares (Hazarika, 2006). As folhas das plântulas cultivadas *in vitro* são geralmente finas, tenras e fotossinteticamente pouco ativas (Pierik, 1990). Segundo Louro e Santiago (2000), estas plântulas apresentam estômatos anômalos, e uma grande parte é incapaz de fechar, e que esta anomalia pode ser atribuída à perda de elasticidade das paredes das células guardas, o que impediria o movimento de abertura e fechamento. Nestas condições, quando submetidas à condições de ambiente *ex vitro*, as plântulas produzidas *in vitro* têm baixa capacidade de controlar a perda de água (Sutter et al., 1988; Barboza, et al., 2006). O estresse hídrico é relatado como principal causa de mortalidade das plântulas (Barboza, et al., 2006). A diminuição da umidade relativa, assim como o aumento das trocas gasosas nos frascos de cultivo podem ser feitos por meio da utilização de biorreatores (Etienne, Berthouly, 2002; Mcalister, 2005; Aragón et al., 2010).

Wardle et al. (1983) demonstraram com couve-flor (*Brassica oleracea var botrytis*), que uma diminuição na umidade relativa *in vitro* produziu uma formação de cutícula mais espessa, o que permitiu uma menor transpiração cuticular. Costa et al. (2009), citaram que é provável que a excessiva transpiração das folhas *in vitro* se deve à alta densidade estomática, principalmente na face abaxial. Esta alta densidade pode causar um ineficiente controle de perda de água pelos estômatos, e este não-controle pode ser ainda devido à ausência ou baixa quantidade de cêra epicuticular. A diminuição na taxa de perda de água em cana-de-açúcar foi encontrada por Crespo (2007), utilizando frascos ventilados que permitem as trocas gasosas. Segundo este autor, esta resposta pode estar relacionada com a menor condutância estomática ( $g_s$ ) e menor transpiração ( $E$ ) determinada nas folhas dos explantes cultivados nas condições em que se permitiram as trocas gasosas nos frascos ventilados.

Deng e Donnelly (1993) estudaram a aclimatização de amoreira, e constataram que a redução da umidade relativa *in vitro* propiciou o decréscimo na abertura dos estômatos e no índice estomático das folhas das plântulas, o que promoveu a sobrevivência e o crescimento rápido das mudas transplantadas.

Em cultivo *in vitro*, a utilização do fechamento dos tubos de ensaio e frascos com tampa plástica e filme de PVC, além de restringir as trocas gasosas, favorece a alta umidade dentro dos frascos, podendo ocasionar hiperhidricidade e

estômatos anormais (Kozai et al., 1986). A hiperidricidade é uma desordem morfológica e fisiológica das plântulas propagadas *in vitro*. Além da alta umidade, fatores nutricionais (minerais e carboidratos), altos níveis de fitorreguladores, baixa intensidade luminosa e alta disponibilidade de água no substrato também são fatores que levam a hiperhidratação e, ou desenvolvimento anatômico incipiente nas plântulas cultivadas *in vitro* (Majada et al., 2000).

As hastes e folhas das plântulas que apresentam este distúrbio são freqüentemente grossas, rígidas e facilmente quebradiças (Hazarika, 2006). A hiperidricidade é uma das principais anomalias que tem recebido atenção especial nos últimos anos, tendo sido observada a interação simultânea de diversos fatores, interferindo nas principais vias metabólicas como fotossíntese, respiração e transpiração. A principal característica morfológica das plântulas hiperídricas está associada com excesso de água e deficiência de clorofila (Gribble et al., 1998).

Nos sistemas permanentes de cultivo em meio líquido, ocorre o contato contínuo dos explantes com o meio de cultura. Esta exposição continuada ao meio líquido pode causar distúrbios fisiológicos, como a hiperidricidade. O cultivo em sistemas temporários, em que se permite as trocas gasosas, pode prevenir estas desordens, por meio do contato intermitente do meio de cultura com o material vegetal (Ziv, 1999).

Em sistema de cultivo de imersão temporária, utilizando frascos RITA<sup>®</sup>, Mcalister et al. (2005) obtiveram um maior rendimento de plântulas de *Eucalyptus*, quando comparado ao cultivo em meio semi-sólido. Estes autores conseguiram obter plântulas mais resistentes, com boa aclimatização e melhor enraizamento.

Escalona et al. (1999) observaram que a imersão temporária estimulou a multiplicação e a massa de matéria seca dos brotos de abacaxizeiro. Uma quantidade superior a 5.000 brotações foi obtida em um único frasco, e em relação ao convencional, foram obtidas taxas de multiplicação de 300 a 400%. Com este sistema de imersão temporária, os autores conseguiram redução de 20% nos custos de produção.

#### 2.4.3.4. Fonte de energia luminosa

A luz é um fator fundamental na vida das plantas, exercendo função direta ou indireta na regulação do crescimento e desenvolvimento (Morini e Muleo, 2003). A ação deste fator é devido à importância em relação aos mecanismos da fotossíntese, da fotomorfogênese e do fototropismo (Pyke e Lopes-Juez, 1999; Taiz e Zaiger, 2009).

A quantidade e a qualidade da luz, bem como o fotoperíodo, podem afetar o crescimento e o desenvolvimento de plântulas *in vitro* (Economou e Read, 1987; Vlahos et al., 1992). A intensidade de luz pode ter um efeito pronunciado no desenvolvimento foliar e pode modificar certas características, tais como espessura da folha, diferenciação do mesófilo, desenvolvimento vascular, divisão celular e desenvolvimento dos estômatos (Lee et al., 1988).

Segundo Debergh (1991), a intensidade luminosa nas salas de cultivo está muito abaixo da faixa necessária para ativar as moléculas de clorofila para a síntese de carboidrato, e nessas condições de cultivo *in vitro*, as plântulas micropropagadas não são fotoautotróficas, mas mixotróficas ou heterotróficas. Pasqual (2001) cita que a luminosidade nas salas de cultivo está em torno de 1 a 10% da intensidade luminosa a pleno sol.

Para verificar as condições ideais de fluxo de fótons fotossintéticos (FFF) no crescimento de brotos de explantes de roseiras (cv. Samanta e Landora), Anna et al. (1999) obtiveram um melhor crescimento com a intensidade de  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , quando comparado com a menor intensidade ( $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Este resultado foi tanto em condições fotomixotrófica e fotoautotrófica. Lee et al. (1995) constataram em cana-de-açúcar que na presença de alta intensidade de luz ( $314 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), as plântulas tiveram menor saturação fotossintética do que plântulas crescidas sob intensidade de luz considerada média ( $115 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A diminuição da fotossíntese foi atribuída a danos específicos nos pigmentos receptores de luz ligados ao sistema antena dos fotossistemas.

Santos (2007) trabalhando com videira *in vitro* em intensidades de luz de 12,5 até  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obteve o maior conteúdo de carotenóides em níveis crescentes de irradiância.

Deccetti (2004) trabalhou com plântulas de *Annona glabra* enraizadas *in vitro* sob irradiância de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e constatou aumentos significativos na



espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso. De acordo com o autor, a pronunciada diferenciação dos parênquimas pode ser determinante na otimização do processo de fotossíntese e promover benefício na sobrevivência *ex vitro* das plântulas.

Todavia, dependendo da cultura, um FFF muito alto pode acarretar danos nas plântulas. Alto FFF de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  nas concentrações de sacarose de 30 e  $45 \text{ g L}^{-1}$  provocou efeitos negativos nas folhas das plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas, ocasionando alta respiração (Crespo, 2007). O cultivo de abacaxi *in vitro* com biorreatores de imersão temporária sob alto FFF ( $225 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ocasionou baixo rendimento quântico do fotossistema II e baixa capacidade fotossintética, devido a possíveis danos fotoinibitórios, ou presença de sacarose no meio de cultivo (Escalona et al., 2003). Viña et al. (2001) constataram que o aumento da irradiância acarretou redução no conteúdo de clorofilas *a* e carotenóides nas folhas de brotações de abacateiro. Estes resultados estão de acordo com Kramer e Kozlowski (1979), que citam que, a clorofila é constantemente sintetizada e destruída (foto-oxidação) em presença de luz, mas sob intensidades luminosas muito altas, a velocidade de decomposição é maior, sendo o equilíbrio estabelecido a uma concentração mais baixa.

A fonte luminosa geralmente utilizada na sala de crescimento é a lâmpada fluorescente do tipo branca-fria. Segundo Kodym e Zapata-Arias (1999), ela é citada em 90% dos trabalhos científicos. Entretanto, melhores resultados têm sido alcançados em cultivos sob lâmpadas fluorescentes grow lux (vermelhas) (Norton et al., 1988; Morini e Muleo, 2003; Mothé et al., 2008). Contudo, o emprego de luz natural é uma forma de aumentar a irradiância no ambiente de cultivo *in vitro*. Em relação à micropropagação tradicional, maiores valores de irradiância no ambiente de cultivo permitem otimizar a divisão celular, diferenciação do mesófilo e desenvolvimento de estômatos na lâmina foliar (Erig e Schuch, 2005). As plântulas crescidas neste sistema podem apresentar melhor desenvolvimento do sistema radicular, maior diferenciação do parênquima paliçádico, cutículas mais espessas, redução na densidade de estômatos e melhor funcionamento destas estruturas responsáveis pelas trocas gasosas (Nelson e Sage, 2008). Em relação ao método convencional de micropropagação, estas melhorias anatômicas da plântula propiciam algumas vantagens da micropropagação fotoautotrófica, quando esta é feita sob luz natural. Estas melhorias incluem aumento do

crescimento das plântulas, redução do risco de contaminação microbiana (em virtude da remoção da sacarose do meio de cultura), melhoria das características fisiológicas da planta (devido às condições ambientais de cultivo serem mais naturais), e redução do estresse da planta durante a aclimatização. Tais melhorias aumentam a percentagem de sobrevivência das mudas (Afreen et al., 2002; Kozai e Nguyen, 2003).

Na micropropagação, a luz pode influenciar a taxa de multiplicação e o crescimento *in vitro*. Os componentes, comprimento de onda e densidade de fluxo luminoso podem ter efeitos positivos e/ou negativos no cultivo *in vitro* (Kozai et al., 1991). Segundo Felipe (1986) e Morini e Muleo (2003), as respostas morfofisiológicas das plantas não dependem apenas da presença, atenuação ou ausência da luz, mas também da variação em qualidade de luz. A qualidade espectral afeta estruturalmente a anatomia das folhas, parecendo exercer maiores efeitos durante a expansão foliar, exibindo alto grau de plasticidade tanto anatômico como fisiológico (Saebo et al., 1995; Schuerger et al., 1997; Dousseau, et al. 2008), como germinação, inibição de alongamento do hipocótilo, expansão dos cotilédones e das folhas, enverdecimento e biossíntese de pigmentos, alongamento do caule (Saitou et al., 2004; Taiz e Zeiger, 2009). A resposta da influência da luz nas plantas se deve ao grande impacto do acúmulo de pigmentos, formação de clorofilas, diferenciação de cloroplastos e anatomia da folha (Desjardins et al., 1995). A clorofila *a* tem absorção máxima na faixa do azul e vermelho, onde está o espectro de ação para a fotossíntese (Taiz e Zeiger, 2009). A predominância na emissão de fótons neste espectro pode estimular a indução de calos e ainda estimular a indução de brotos, porém, nesta região do espectro, pode ter inibição na indução de raízes (Chamovitz e Deng, 1996; Barrueto Cid, 2001).

A luz vermelha, em comparação à luz branca, incrementou o número de brotos axilares em culturas *in vitro* de *Rhododendron*, *Potentilla* e *Spiraea* (Norton et al., 1988) e em porta-enxerto de *Prunus* GF 677, proporcionou aumento do comprimento dos entrenós (Morini e Muleo, 2003).

No cultivo *in vitro*, uma outra alternativa para se trabalhar com a qualidade da luz é por meio da utilização de Light Emitting Diodes (LED`s). De acordo com Yeh e Chung (2009), os LED`s se destacam das demais fontes de luz por possuírem alta eficiência no processo de geração de luz com baixa produção de

calor, por longos períodos, pelo comprimento de onda específico e pelo pequeno tamanho. Chang et al. (2003) verificaram que os LED's vermelhos e azuis utilizados em copo-de-leite, mostraram respostas diferentes entre espécies, no entanto, houve uma superioridade dos LED's vermelhos, os quais estimularam o maior comprimento dos brotos e massa fresca da parte aérea. Kim et al. (2004) verificaram alongamento dos entrenós de crisântemos cultivados sob LED's na faixa do vermelho e vermelho-longo. Rocha et al. (2010), evidenciaram uma maior quantidade de clorofilas *a* e *b*, assim como de carotenóides em morangueiro durante a fase de multiplicação *in vitro*, quando utilizaram LED's vermelhos, em comparação às outras fontes de luz empregadas (LED's azuis, LED's verdes, lâmpadas fluorescentes brancas ou fluorescentes Growlux).

#### **2.4.4. Enxertia**

A finalidade da propagação por enxertia, assim como por estaquia e micropropagação, é a manutenção dos caracteres desejáveis. Para a realização da enxertia, utiliza-se os brotos laterais com cerca de 15 cm, eliminando-se todas as folhas, os quais servirão como copa (enxerto). Quanto ao porta-enxertos, geralmente utiliza-se mamoeiro com diâmetro de 5 cm, abrindo no caule deste, uma fenda na qual é introduzido o enxerto, que por sua vez, é cortado em sua base no formato de cunha (Costa et al., 2003). Após este procedimento, a região da união do enxerto é coberta, para evitar a perda de água e favorecer a soldadura, conseguindo-se assim, cerca de 50% de pegamento (Toda Fruta, 2004).

Ramkhelawan et al. (1999) conduziram estudos para desenvolver métodos simples de propagação de mamoeiro por enxertia. O material de enxertia e os porta-enxertos provieram de plantas com 75 dias de idade. O método de cunha terminal foi claramente superior à borbulhia e a garfagem lateral, com índices de pegamento de 100%, 85% e 75% respectivamente, com boa performance de crescimento no campo.

Araújo e Yamanishi (2003) trabalharam com mamoeiro utilizando a enxertia, e obtiveram uma taxa de pegamento de 70 e 100%, quando utilizaram o método de garfagem fenda cheia, sem o ápice, e com o diâmetro do garfo de 0,7

e 0,99 cm, respectivamente. Os autores citaram que as plantas enxertadas apresentaram alto potencial genético, maior precocidade na produção, menor altura de inserção da primeira florada, alta produtividade e uniformidade do fruto. Eles ressaltaram que a grande contribuição da enxertia é permitir o uso de porta-enxerto tolerante a *Phytophthora palmivora*, que é o principal obstáculo para a elevação na produtividade da cultura, como também, a não-dependência da importação de Taiwan da semente do híbrido 'Tainung 01'. Segundo os autores os trabalhos de pesquisa com propagação vegetativa do mamoeiro via enxertia são bastante recentes, tanto no Brasil como em todo o mundo, portanto, há ainda escassez de informação acerca do assunto. Segundo Yamanishi (2009), este método reduz em até 60% os custos operacionais ao privilegiar o plantio de mudas de plantas selecionadas, ao invés de usar sementes. O método consiste em extrair brotos de plantas hermafroditas, as quais produzem frutos alongados, e enxertá-los em outra planta obtida de semente. Esta técnica de enxertia para a cultura do mamoeiro vem sendo empregada comercialmente na China.

Plantas obtidas pelo procedimento de enxertia permanecem produtivas por 10 a 15 anos, sob condições subtropicais, com produções de 25 a 30 t/ha (Toda Fruta, 2004).

### 3. TRABALHOS

#### 3.1. EFEITO DAS CONDIÇÕES DO AMBIENTE DE CULTIVO *IN VITRO* NA MULTIPLICAÇÃO DE MAMOEIRO 'GOLDEN'

##### RESUMO

O mamoeiro é propagado via seminífera e o cultivo desta espécie apresenta problemas de disseminação de doenças e de variabilidade genética, decorrentes da polinização livre. A micropropagação surge como alternativa para a produção de mudas com características agronômicas desejáveis. O trabalho teve por objetivo avaliar os aspectos ecofisiológicos da multiplicação *in vitro* do mamoeiro 'Golden', relacionados à fotossíntese, fluorescência, relações hídricas, aos teores de macronutrientes, índice SPAD e ao crescimento, em resposta a utilização de diferentes qualidades de luz, tipos de sistema e concentrações de sacarose. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, em um esquema de parcelas subsubdivididas constituídas de qualidades de luz (branca e vermelha com FFF de  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), tipos de sistema (fechado e ventilado) e concentrações de sacarose no meio de cultivo (10; 20; 30 e  $40 \text{ g L}^{-1}$ ). A unidade experimental foi constituída com um frasco de vidro grande (2,2 L), e, neste frasco, foram colocados quatro frascos tipo 'baby food'. O frasco menor, com volume de 30 mL, tinha individualmente, o meio de

cultura com uma das quatro diferentes concentrações de sacarose e três plântulas cada. Nos frascos ventilados o fluxo de ar injetado foi de  $15 \text{ mL min}^{-1}$ , a uma concentração de  $\text{CO}_2$  em torno de 370 ppm, umidade relativa de  $77 \pm 3\%$ . Para ambos os sistemas de cultivo a temperatura foi de  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 16 horas. O experimento foi instalado no quinto e sexto subcultivos e as avaliações foram efetuadas após 21 dias do sexto subcultivo. O cultivo *in vitro* sob luz vermelha promoveu maior crescimento das plântulas. A menor taxa de perda de água das plântulas foi obtida no sistema ventilado, podendo relatar que tais plântulas podem ter melhor adaptação para estas condições, quando forem cultivadas sob condição *ex vitro*. A eficiência fotoquímica das plântulas nas condições de cultivo foi baixa. Em novos experimentos, sugere-se desta forma usar a concentração de sacarose a  $10 \text{ g L}^{-1}$ , e aumentar o nível de irradiância (luz vermelha) da sala de cultivo, na tentativa de estimular o metabolismo autotrófico. Nas condições deste experimento, o incremento na produção de biomassa seca do mamoeiro foi devido exclusivamente à fonte exógena de carbono, por meio da adição de sacarose no meio de cultivo, uma vez que não houve assimilação fotossintética do carbono. Nestas condições, essa baixa assimilação fotossintética foi devido ao comprometimento na capacidade fotoquímica, causada pelo baixo FFF na sala de cultivo.

**Palavras-chave** – *Carica papaya* L., ecofisiologia, qualidade da luz, sacarose, sistema ventilado

## **EFFECT OF ENVIRONMENT CONDITIONS OF *IN VITRO* CULTIVATION ON MULTIPLICATION OF PAPAYA TREE 'GOLDEN'**

### **ABSTRACT**

The papaya tree is spread in a seminiferous way and the cultivation of this species presents problems of spread of diseases and of genetic variability, current of the free pollination. The micropropagation appears as an alternative for the production of seedlings with desirable agronomic characteristics. The work had for objective to evaluate the ecophysiological aspects of the *in vitro* multiplication of the papaya

tree 'Golden', related to the photosynthesis, fluorescence, hydric relations, to the macronutrients contents, SPAD index and to the growth, in response to use of different light qualities, system types and sucrose concentrations. The treatments were disposed in randomized complete block design, with four repetitions, in portions sub plots split constituted of light qualities (white and red with FFF of  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), system types (closed and ventilated) and sucrose concentrations in the middle of cultivation (10; 20; 30 and  $40 \text{ g L}^{-1}$ ). The experimental unit was constituted with a flask of big glass (2,2 L), and, in this flask, were put four flasks type 'baby food'. The smaller flask, with volume of 30 mL, had individually, the middle of culture with one of the four different sucrose concentrations and three seedlings each. In the ventilated flasks the flow of air injected was of  $15 \text{ mL min}^{-1}$ , at a concentration of  $\text{CO}_2$  around 370 ppm, relative humidity of  $77 \pm 3\%$ . For both cultivation systems the temperature was of  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  with photoperiod of 16 hours. The experiment was installed in the fifth and sixth subcultivation and the evaluations were made after 21 days of the sixth subcultivation. The cultivation *in vitro* under red light promoted larger growth of the seedlings. The smallest tax of loss of water of the seedlings was obtained in the ventilated system, and such seedlings can have better adaptation for these conditions, when they are cultivated under condition *ex vitro*. The photochemical efficiency of the seedlings in the cultivation conditions was low. In new experiments, is suggested to use the sucrose concentration at  $10 \text{ g L}^{-1}$ , and to increase the irradiance level (red light) of the cultivation room, in the attempt of stimulating the autotrophic metabolism. In the conditions of this experiment, the increment in the production of dry biomass of the papaya tree was due exclusively to the hexogen source of carbon, through the sucrose addition in the middle of cultivation, once there was no photosynthetic assimilation of the carbon. In these conditions, that lowers photosynthetic assimilation was due to the compromising in the photochemical capacity, caused by low FFF in the cultivation room.

**Key-Words** - *Carica papaya* L., ecophysiology, light quality, sucrose, ventilated system

## INTRODUÇÃO

O mamoeiro é uma espécie propagada comercialmente via seminífera. Entretanto, o custo da aquisição das sementes é relativamente alto, e desta forma, vários produtores optam por produzirem suas próprias sementes. Este fato faz com que estes produtores formem lavouras com materiais de baixo padrão de qualidade genética, permanecendo no campo cultivares sem expressão econômica, com risco de disseminação de doenças de grande severidade para a cultura (Alves et al., 2003). Outro aspecto importante da cultura é o fato de que o mercado consumidor prefere o fruto proveniente de planta hermafrodita, com isto o produtor tem que plantar três mudas por cova para a futura sexagem, para se obter maior quantidade destas. Na ocasião do florescimento, o produtor mantém apenas uma planta hermafrodita por cova. Estas condições contribuem para a elevação dos custos das lavouras, aumentando assim o preço final dos frutos aos consumidores (Simão, 1998; Arango et al., 2008).

Uma alternativa a este tipo de propagação é a utilização da micropropagação, no entanto, para o mamoeiro esta técnica ainda não é comercialmente usada, principalmente devido aos contaminantes endógenos, que são provenientes de explantes retirados de plantas matrizes cultivadas no campo. Todavia, May et al. (2007) comprovaram a viabilidade da técnica, conseguindo por meio da micropropagação, obter em nível de campo, 5.000 plantas de mamoeiro hermafroditas, geneticamente homogêneas.

No cultivo *in vitro* a micropropagação convencional é a forma de propagação mais comumente utilizada comercialmente em algumas culturas, como plantas ornamentais, batata, morango, banana e abacaxi (Brscan, 2009), assim como nos trabalhos de pesquisas com o mamoeiro (Schmidt e Amaral, 2002; May et al, 2007; Schmidt et al, 2010). Com esta técnica se obtêm várias características desejáveis dentre as quais se destacam, a obtenção de mudas saudáveis, mesmo se provenientes de matrizes infetadas, através de tecidos meristemáticos; produção de um grande número de mudas em um curto espaço de tempo; maior vigor das mudas; multiplicação de plantas difíceis de serem propagadas por métodos convencionais; auxílio em programas de melhoramento vegetal (Kozai et al., 1997, Grattapaglia e Machado, 1998). A micropropagação convencional é uma técnica muito importante para a propagação de mudas de



muitas espécies, como dito, todavia, em função do ambiente de cultivo, as plântulas produzidas neste sistema apresentaram um metabolismo heterotrófico ou mixotrófico, necessitando assim, em algumas culturas de ajustes no sistema.

Na micropropagação convencional, os explantes são cultivados em frascos sem que ocorra as trocas gasosas, com alta umidade relativa do ar (aproximadamente 98%), alta concentração de etileno, baixa concentração de CO<sub>2</sub> (que decresce de 3.000 a 9.000  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  no período escuro para menos de 100  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  durante o fotoperíodo), baixa densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, isto é, baixa luminosidade (40 - 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e com sacarose como maior fonte de energia metabólica (Arigita et al., 2002). Os autores ainda citam que os explantes crescidos neste sistema desenvolvem desordens anatômicas e fisiológicas que não possibilitam que a maquinária fotossintética opere normalmente. As plântulas formadas no sistema heterotrófico possuem elevado conteúdo de água com grande risco de desidratação e morte durante a aclimatização (Kubota e Kozai, 1992).

A indução das plântulas ao metabolismo fotoautotrófico pode ser feita por meio da alteração do ambiente de cultivo, com a redução de carboidrato do meio de cultura, a elevação da concentração de CO<sub>2</sub>, o aumento da intensidade luminosa (Arigita et al, 2002; Mosaleeyanon et al., 2004; Aragón et al., 2010), e melhoria na qualidade espectral de luz (Chang et al, 2003; Mothé et al., 2008; Rocha et al, 2010). Segundo Erig e Schuch (2005), o desenvolvimento de ambiente fotoautotrófico surge como possibilidade potencial para aumentar a eficiência da micropropagação e auxiliar na redução de seus custos, viabilizando-a comercialmente.

Sendo assim, este trabalho objetivou avaliar os aspectos ecofisiológicos da multiplicação *in vitro* do mamoeiro 'Golden', relacionados à fotossíntese, fluorescência, relações hídricas, teores de macronutrientes, índice SPAD e ao crescimento, em resposta a utilização de diferentes qualidades de luz, tipos de sistema e concentrações de sacarose.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em Campos dos Goytacazes-RJ, na Unidade de Pesquisa em Fotossíntese de Plântulas *in vitro*, situada no setor de Fisiologia Vegetal do LMGV/CCTA/UENF.

As plantas matrizes foram obtidas a partir da semeadura de mamoeiro *Carica papaya* L. cv 'Golden' e cultivadas em casa de vegetação, com cerca de 50% de interceptação da energia luminosa, em vasos de 2 litros. O substrato de cultivo foi constituído de terriço, areia e esterco bovino na proporção de 3:1:1, respectivamente. Ainda no substrato houve a adição de 0,2 kg de sulfato de amônio, 0,2 kg de cloreto de potássio e 0,6 kg de superfosfato simples. Após um período de 70 dias da semeadura, as plantas matrizes juvenis atingiram a altura entre 40 a 60 cm. Nesta época, foram retirados os explantes (segmentos apicais de brotações laterais) de aproximadamente 0,5 cm de comprimento. No laboratório, em câmara de fluxo laminar horizontal foi efetuada a desinfestação dos explantes, primeiro com álcool 70% por 30 segundos, e depois com hipoclorito de sódio a 1% por 15 minutos. Em seguida, os explantes foram enxaguados três vezes com água desionizada autoclavada.

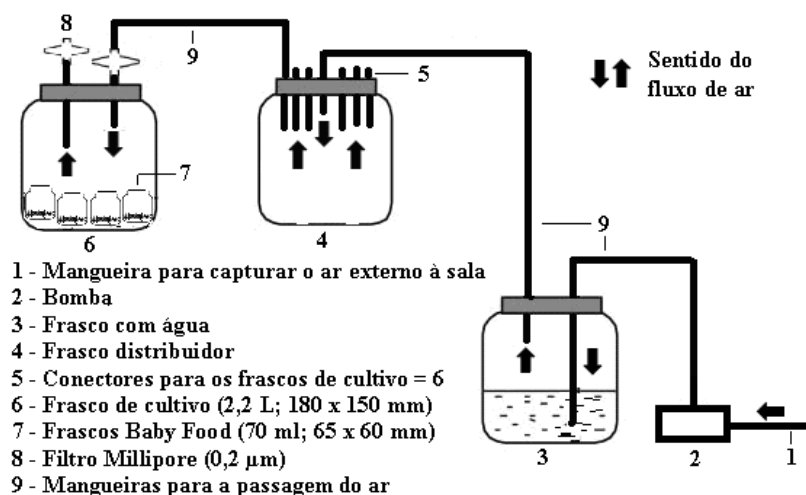
Os segmentos apicais foram inoculados individualmente em frascos de cultivo do tipo 'baby food', contendo 15 ml de meio de cultura de estabelecimento. Este meio foi composto de sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962), e suplementado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 8,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (Vetec®), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e dos fitorreguladores ANA (ácido  $\alpha$ -naftaleno acético) a 0,093 mg L<sup>-1</sup> e Cinetina (6-furfurilaminopurina) a 5,38 mg L<sup>-1</sup> conforme proposto por Schmildt et al. (2007a). No preparo do meio, o pH foi ajustado para 5,7 antes da adição do ágar e, posteriormente, foi autoclavado a 121° C, 1,5 atm por 20 minutos. Os frascos com os explantes foram mantidos na sala de crescimento com temperatura de 27  $\pm$  2° C e fotoperíodo de 16 horas, sob fluxo de fótons fotossintéticos de 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obtido por lâmpadas fluorescentes brancas-frias durante 21 dias. Os explantes reativos foram então recultivados em meio de multiplicação, semelhante ao meio anterior. Nesta condição, foi adicionado ao meio de cultivo 30 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina e substituição da cinetina pelo BAP (6 – Benzilaminopurina) a 0,45 mg L<sup>-1</sup>. Os explantes tiveram também as mesmas condições de ambiente de cultivo utilizadas na fase de estabelecimento.

Os explantes foram subcultivados em frascos de cultivo (55 x 100 mm) contendo 30 ml de meio, em intervalos de 30 dias, por quatro vezes.

Os explantes produzidos no quarto subcultivo foram submetidos aos tratamentos no quinto e sexto subcultivos. Estes dois subcultivos foram feitos em intervalos de 21 dias, e os meios de cultura para tanto foram os mesmos utilizados nos subcultivos anteriores, exceto para a sacarose que passou a compor tratamentos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, segundo um esquema de parcelas sub subdivididas, tendo nas parcelas dois tipos de luz (lâmpadas fluorescentes brancas e lâmpadas vermelhas tipo Growlux, ambas com  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), nas subparcelas, dois tipos de sistemas de ventilação (fechado e ventilado) e nas subsubparcelas, quatro concentrações de sacarose (10; 20; 30 e  $40 \text{ g L}^{-1}$ ). A unidade experimental foi constituída com um frasco de vidro grande (2,2 L), e, neste frasco, foram colocados quatro frascos tipo 'baby food'. O frasco menor, com volume de 30 mL, tinha individualmente, o meio de cultura com uma das quatro diferentes concentrações de sacarose e três plântulas cada.

O sistema ventilado adotado foi proposto por Campostrini et al. (1999) (Figura 1). Neste sistema ocorrem as trocas gasosas entre o ambiente de cultivo e o meio externo. A entrada e saída de ar nos frascos se dão pela passagem por filtros esterilizadores Millipore de  $0,2 \mu\text{m}$ , localizados na tampa. No experimento instalado, o fluxo de ar injetado no frasco ventilado de cultura foi de  $15 \text{ mL min}^{-1}$ , a uma concentração de  $\text{CO}_2$  em torno de 370 ppm e umidade relativa de  $77 \pm 3\%$ . Em ambos os sistemas de cultivo a temperatura foi de  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 16 horas. No sistema fechado, os frascos menores foram distribuídos da mesma forma nos frascos maiores, porém estes maiores foram hermeticamente fechados. Para ambos os sistemas de cultivos (ventilado e fechado), o meio de cultura utilizado foi o semisólido.



**Figura 1** – Esquema de funcionamento do sistema de circulação forçada de ar (sistema ventilado) para o cultivo de plântulas *in vitro*.

Aos 21 dias após o início dos tratamentos (DAT), avaliaram-se as características morfológicas nas plântulas: altura da plântula, número de folhas, massa fresca de parte aérea e de calo, e massa seca da parte aérea.

A altura da plântula foi determinada, medindo-se a base do colo até a última gema apical do ramo principal, com o auxílio de régua milimetrada. O número de folhas foi determinado mediante a contagem total de folhas por plântula. A massa fresca da parte aérea foi determinada por meio da pesagem individual da plântula em balança analítica. A massa fresca de calo foi mensurada por meio da pesagem individual da massa dos calos de cada plântula, também em balança analítica. Para a massa seca da parte aérea efetuou-se a secagem da massa fresca das plântulas em estufa a 70 °C até atingido peso constante e após a secagem procedeu-se à determinação em balança analítica por meio da pesagem individual da plântula seca.

Nesta época (21 DAT), a taxa de perda de água da folha foi determinada segundo metodologia proposta por Eliasson et al. (1994), em que a massa fresca (MF) de cada folha foi pesada em uma balança analítica, em intervalos de 30 minutos, até que a massa se estabilizasse. As medidas procederam na bancada do laboratório em temperatura de 25,2° C e 78% de umidade relativa. Finalizadas as determinações da massa fresca das folhas, estas foram colocadas em estufa a 70° C por 48 h para determinação da massa seca (MS). A taxa de perda de água foi calculada segundo a equação:  $TPA = (((M_F - M_X) / (M_F - M_S))^{-1}) \cdot 100$ . Em que  $M_F$

corresponde à massa fresca inicial,  $M_x$  corresponde à massa fresca a cada trinta minutos entre as medições, e  $M_s$  corresponde à massa seca.

Também após 21 DAT, os nutrientes, nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K) e cálcio (Ca) foram determinados a partir da matéria seca total das plântulas. As plântulas foram secas em estufa a 72 °C por 24 horas, e então foram pesados 100 mg de cada amostra, que foi constituída da mistura de três plântulas, provenientes de cada frasco 'baby food'. Após procedeu-se a digestão sulfúrica. O N e o P foram mensurados pelo método colorimétrico e o K e Ca foram quantificados por espectrofotometria de chama.

Foram feitas avaliações relacionadas à eficiência fotoquímica e as relacionadas às trocas gasosas. O rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_{Máx}$ ) foi determinado após a adaptação da folha mais expandida ao escuro por 30 minutos com o auxílio de pinças, por meio do fluorímetro modulado MINI-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, GmbH, Alemanha).

A fotossíntese real ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e a transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) foram determinadas na plântula inteira. Para tanto, esta plântula foi colocada na câmara de 250 mL do medidor portátil de trocas gasosas LI-6200 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Antes de colocar as plântulas na câmara, estas foram rapidamente pesadas para que a unidade de  $\text{CO}_2$  assimilada ou liberada fosse expressa em unidades de massa fresca. As medições foram feitas em condições de laboratório, utilizando luz artificial por meio de LED's vermelhos de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

A fotossíntese potencial ( $A_{\text{pot}}$ ,  $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) foi determinada utilizando-se o eletrodo de oxigênio do tipo Clark (Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, Norfolk, Inglaterra). Para realizar estas avaliações, uma área de limbo foliar foi medida e colocada no equipamento, e a  $A_{\text{pot}}$  foi expressa por unidade de área. Por meio do eletrodo e uma fonte externa de luz variável, foi possível traçar curvas entre a fotossíntese potencial (taxa de liberação ou consumo de oxigênio) e o fluxo de fótons fotossintéticos (FFF) incidentes sobre a parte da folha da plântula. No traçado da curva foram utilizados uma fonte luminosa com LED's vermelhos, com seis intensidades FFF, com os valores de 0; 117; 233; 350; 467, 563 e 700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Em cada intensidade de FFF, o tempo de medição da  $A_{\text{pot}}$ , foi de 3 minutos.

A estimativa de intensidade de cor verde foi avaliada por meio do medidor portátil de clorofila SPAD-502 Chlorophyll Meter (Minolta, Japão). Uma média de cinco leituras em cada folha foi utilizada.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias referentes à qualidade de luz e aos tipos de sistema foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para o fator concentração de sacarose, foi efetuada a análise de regressão. As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa Genes (Cruz, 2006).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Apresenta-se na Tabela 1 o resumo da análise de variância (ANOVA) das análises realizadas em plântulas de mamoeiro 'Golden' cultivadas *in vitro* em meio MS de multiplicação. As medidas foram feitas após 21 dias do sexto subcultivo. Observa-se que não houve diferenças significativas para nenhuma das interações.

**Tabela 1** – Resumo da análise de variância dos fatores: luz ( $F_L$ ), sistema ( $F_{SI}$ ) e sacarose ( $F_{SA}$ ) com suas interações, para as variáveis fotossíntese (A), transpiração (E), rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_{máx}$ ), Índice SPAD, nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), Calcio (Ca), altura da plântula (AP), número de folhas (NF), massa fresca da parte aérea (MFPA) e de calo (MFC) e massa seca da parte aérea (MSPA) de mamoeiro ‘Golden’ avaliadas aos 21 dias no sexto subcultivo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio			
		A ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	E ( $\text{mmol kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$F_v/F_{máx}$	Índice SPAD
$F_L$	1	19,5696 <sup>ns</sup>	15,751**	120,3135 <sup>ns</sup>	0,2352 <sup>ns</sup>
Resíduo a	6	6,8613	0,7864	402,32	29,3030
$F_{SI}$	1	27,0010 <sup>ns</sup>	21,9609 <sup>ns</sup>	3759,9891**	0,0977 <sup>ns</sup>
$F_L \times F_{SI}$	1	0,1881 <sup>ns</sup>	1,7656 <sup>ns</sup>	809,0469 <sup>ns</sup>	0,1351 <sup>ns</sup>
Resíduo b	6	6,8658	4,1454	226,11	2,3623
$F_{SA}$	3	8,3444**	1,633 <sup>ns</sup>	110,8808 <sup>ns</sup>	4,7009 <sup>ns</sup>
$F_L \times F_{SA}$	3	3,0257 <sup>ns</sup>	1,3702 <sup>ns</sup>	128,9355 <sup>ns</sup>	0,5905 <sup>ns</sup>
$F_{SI} \times F_{SA}$	3	1,0249 <sup>ns</sup>	1,7135 <sup>ns</sup>	360,5361 <sup>ns</sup>	3,416 <sup>ns</sup>
$F_L \times F_{SI} \times F_{SA}$	3	0,6719 <sup>ns</sup>	0,4818 <sup>ns</sup>	158,0814 <sup>ns</sup>	4,5962 <sup>ns</sup>
Resíduo c	36	1,2726	0,7436	116,5659	8,4738
CV (%) Luz		102,71	39,68	36,27	35,49
CV (%) Sistema		102,75	91,09	27,19	10,08
CV (%) Sacarose		44,24	38,58	19,52	19,08

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio			
		N ( $\text{mg g}^{-1}$ )	P ( $\text{mg g}^{-1}$ )	K ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Ca ( $\text{mg g}^{-1}$ )
$F_L$	1	24,5149 <sup>ns</sup>	0,2233 <sup>ns</sup>	10,9727 <sup>ns</sup>	5,2498 <sup>ns</sup>
Resíduo a	6	53,6618	0,2847	53,6922	1,0485
$F_{SI}$	1	511,495*	5,9414 <sup>ns</sup>	61,8189 <sup>ns</sup>	4,4997 <sup>ns</sup>
$F_L \times F_{SI}$	1	92,5685 <sup>ns</sup>	0,1278 <sup>ns</sup>	0,8464 <sup>ns</sup>	1,648 <sup>ns</sup>
Resíduo b	6	71,0337	1,0512	84,1084	1,0845
$F_{SA}$	3	5,1007 <sup>ns</sup>	8,4**	190,421**	0,7089 <sup>ns</sup>
$F_L \times F_{SA}$	3	48,8815 <sup>ns</sup>	0,1431 <sup>ns</sup>	20,6769 <sup>ns</sup>	0,3498 <sup>ns</sup>
$F_{SI} \times F_{SA}$	3	54,6165 <sup>ns</sup>	0,1314 <sup>ns</sup>	9,9721 <sup>ns</sup>	0,1216 <sup>ns</sup>
$F_L \times F_{SI} \times F_{SA}$	3	28,6886 <sup>ns</sup>	0,3538 <sup>ns</sup>	27,8704 <sup>ns</sup>	0,2647 <sup>ns</sup>
Resíduo c	36	43,5998	0,2863	32,9272	0,3373
CV (%) Luz		11,06	12,75	17,8	20,78
CV (%) Sistema		12,72	24,5	22,28	21,14
CV (%) Sacarose		9,97	12,79	13,94	11,78

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio				
		AP (mm)	NF	MFPA (mg)	MFC (mg)	MSPA (mg)
$F_L$	1	249,64**	1105,396**	648853,771*	410897,0412 <sup>ns</sup>	2,9757 <sup>ns</sup>
Resíduo a	6	13,9982	63,3116	103904,97	159058,6667	434,05
$F_{SI}$	1	11,0556 <sup>ns</sup>	171,1518 <sup>ns</sup>	360998,221 <sup>ns</sup>	1240346,261*	1645,655 <sup>ns</sup>
$F_L \times F_{SI}$	1	0,0025 <sup>ns</sup>	187,9641 <sup>ns</sup>	0,2957 <sup>ns</sup>	3830,5779 <sup>ns</sup>	314,469 <sup>ns</sup>
Resíduo b	6	28,0853	103,2932	145350,88	187139,3333	818,32
$F_{SA}$	3	103,336**	89,1054 <sup>ns</sup>	166639,256 <sup>ns</sup>	176494,7007*	1353,521**
$F_L \times F_{SA}$	3	0,4221 <sup>ns</sup>	5,0409 <sup>ns</sup>	26722,4024 <sup>ns</sup>	117051,4297 <sup>ns</sup>	17,4587 <sup>ns</sup>
$F_{SI} \times F_{SA}$	3	17,0285 <sup>ns</sup>	10,0302 <sup>ns</sup>	3391,5258 <sup>ns</sup>	38253,5562 <sup>ns</sup>	81,5926 <sup>ns</sup>
$F_L \times F_{SI} \times F_{SA}$	3	3,3387 <sup>ns</sup>	27,2588 <sup>ns</sup>	86079,9147 <sup>ns</sup>	38093,6792 <sup>ns</sup>	275,4576 <sup>ns</sup>
Resíduo c	36	14,2376	35,0485	66053,4639	50307,1027	211,1645
CV (%) Luz		16,68	33,5	42,09	78,57	41,32
CV (%) Sistema		23,64	42,78	49,78	85,22	56,74
CV (%) Sacarose		16,82	24,92	33,56	44,19	28,52

<sup>ns</sup> Não significativo. \*\* ; \* Significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente  
CV (%) – Coeficiente de Variação.

Nos resultados da ANOVA, verifica-se que o tipo de luz, relacionada à qualidade de fluxo de fótons fotossintéticos (FFF), em que as plântulas foram submetidas apresentou diferença estatística para algumas variáveis. As plântulas de mamoeiro 'Golden' foram influenciadas no crescimento quando cultivadas na presença da luz vermelha e apresentaram-se mais altas, com número maior de folhas e com maior massa fresca da parte aérea (Tabela 2). Os resultados encontrados estão em conformidade com Felipe (1986) e Morini e Muleo (2003), que citaram que as respostas morfofisiológicas das plantas não dependem apenas da presença, atenuação ou ausência da luz, mas também da variação em qualidade de luz. A qualidade espectral afeta estruturalmente a anatomia das folhas, parecendo exercer maiores efeitos durante a expansão foliar, exibindo alto grau de plasticidade tanto anatômico como fisiológico (Saebo et al., 1995; Schuerger et al., 1997; Dousseau, et al. 2008), como germinação, inibição de alongamento do hipocótilo, expansão dos cotilédones e das folhas, enverdecimento e biossíntese de pigmentos, alongamento do caule (Saitou et al., 2004; Taiz e Zaiger, 2009).

No que se refere à qualidade de luz Chang et al. (2003) evidenciaram no cultivo *in vitro* de copo-de-leite, que a luz vermelha em relação à luz branca proporcionou maior crescimento para o comprimento dos brotos e massa fresca da parte aérea, e Morini e Muleo (2003) em porta-enxerto de *Prunus GF 677* observaram o aumento no comprimento dos entrenós. Norton et al. (1988) verificaram incremento no número de brotos axilares em *Rhododendron*, *Potentilla* e *Spiraea*, em cultivo sob luz vermelha. Ribeiro et al. (2009) trabalharam com copo-de-leite em diferentes tipos de luz e não verificaram diferença no crescimento do comprimento dos brotos e massa fresca da parte aérea nos espectros luminoso azul, verde, vermelho e branco.

**Tabela 2** – Altura da plântula (AP), número de folhas (NF) e massa fresca da parte aérea (MFPA) de mamoeiro 'Golden', submetidos a diferentes tipos de luz na fase de multiplicação *in vitro*

Tipo de Luz	AP (mm)	NF	MFPA (mg)
Branca	20,45 b	19,60 b	665,16 b
Vermelha	24,40 a	27,91 a	866,49 a

Médias seguidas por letras diferentes, nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.



De acordo com Torres-Netto et al. (2002), os valores elevados do índice SPAD indicam uma ótima disponibilidade de N no tecido foliar, bem como excelente quantidade de pigmentos fotossintéticos. Neste trabalho não houve diferença significativa entre os tratamentos para a estimativa de cor verde das folhas. Este fato evidencia que não ocorreu ganho no conteúdo de clorofila total com a utilização dos diferentes tipos de luz, conforme mostra o índice SPAD (Tabela 3) devido provavelmente à baixa irradiância. O valor médio da leitura do SPAD foi de 15,25. Diferentemente Rocha et al. (2010) evidenciaram uma maior quantidade de clorofilas *a* (2,70 mg g<sup>-1</sup>) e *b* (0,87 mg g<sup>-1</sup>), assim como de carotenóides (1,33 mg L<sup>-1</sup> g) em morangueiro durante a fase multiplicação *in vitro*, quando utilizaram LED's vermelhos, em comparação às outras fontes de luz empregadas (LED's azuis, LED's verdes, lâmpadas fluorescentes brancas ou fluorescentes Growlux). Nhut et al. (2003) também observaram efeito positivo da iluminação proporcionada por LEDs vermelhos, sendo obtida maior quantidade de clorofila em brotações de morangueiro da cultivar 'Akihime' cultivadas sob 70% de LEDs vermelhos e 30% de LEDs azuis. Os resultados encontrados por estes autores para a luz vermelha estão condizentes com a literatura, visto que a clorofila *a* tem absorção máxima na faixa do azul e vermelho, onde está o espectro de ação para a fotossíntese (Taiz e Zaiger, 2009). De acordo com Soave e Silva (1993), a luz azul e vermelha são referidas como as principais indutoras do maior acúmulo de clorofilas.

Ainda, em presença de luz vermelha, foi notada uma redução na taxa transpiratória das plântulas (Tabela 3). Segundo Costa et al. (2009), é provável que a excessiva transpiração das folhas *in vitro* se deva à alta densidade estomática, principalmente na face abaxial, ao ineficiente controle de perda de água pelos estômatos e à ausência ou baixa quantidade de cera epicuticular. De acordo com Nelson e Sage (2008), o cultivo *in vitro* de plântulas com luz natural pode propiciar maior diferenciação do parênquima paliçádico, cutículas mais espessas, redução na densidade de estômatos e melhor funcionamento destas estruturas responsáveis pelas trocas gasosas. Isto justifica em parte a menor transpiração nas plântulas de mamoeiro quando cultivadas na luz vermelha.

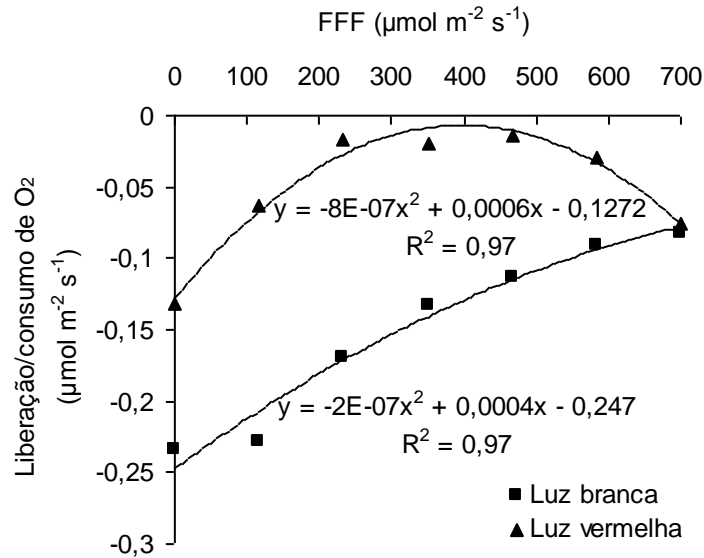
**Tabela 3** – Índice SPAD e Transpiração (E) de mamoeiro 'Golden', submetidos a diferentes tipos de luz na fase de multiplicação *in vitro*

Tipo de Luz	Índice SPAD	E (mmol kg <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> massa fresca)
Branca	15,31 a	2,73 a
Vermelha	15,19 a	1,74 b

Médias seguidas por letras diferentes, nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Um dos principais fatores que causam grande influência na fotossíntese, na fotomorfogênese e fototropismo de plântulas cultivadas *in vitro* é a luz (Pyke e Lopez-Juez, 1999; Taiz e Zaiger, 2009). A quantidade e a qualidade da luz, bem como o fotoperíodo, podem afetar o crescimento e o desenvolvimento de plântulas *in vitro* (Economou e Read, 1987; Vlahos et al., 1992). Esta influência se deve ao grande impacto sobre o acúmulo de pigmentos, formação de clorofila, diferenciação de cloroplastos e anatomia da folha (Desjardins et al., 1995).

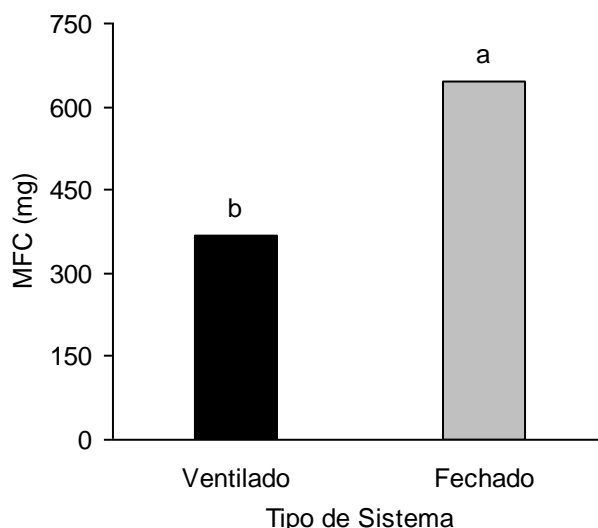
Na Figura 2, observa-se que as plântulas não apresentaram liberação de oxigênio. Ou seja, nas condições de cultivo deste experimento, as plântulas consumiram este gás por meio do processo respiratório. Entretanto, em relação à qualidade de luz utilizada, houve respostas diferenciadas na taxa respiratória, com menor respiração nas plântulas que foram cultivadas na luz vermelha. Isto mostra que a não ocorrência de fotossíntese se deve ao fato de que a quantidade de luz ( $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em que as plântulas foram submetidas não foi suficiente para promovê-las, visto que a qualidade interferiu, embora não tenha ocorrido a fotossíntese. Segundo Debergh (1991), a intensidade luminosa nas salas de cultivo está muito abaixo da faixa necessária para ativar as moléculas de clorofila para a síntese de carboidrato, e nessas condições de cultivo *in vitro*, as plântulas micropropagadas não são fotoautotróficas, mas mixotróficas ou heterotróficas. Pasqual (2001) cita que a luminosidade nas salas de cultivo está em torno de 1 a 10% da intensidade luminosa a pleno sol.



**Figura 2** – Liberação/consumo de oxigênio de mamoeiro ‘Golden’, submetidos a diferentes tipos de luz na fase de multiplicação *in vitro*.

Pela Tabela 1, pode-se observar nos resultados da ANOVA, diferença estatística nos diferentes tipos de sistema de cultivo para as variáveis, massa fresca de calo, nitrogênio e rendimento quântico máximo do fotossistema II.

Neste trabalho de micropropagação do mamoeiro, foi utilizado o sistema de circulação forçada de ar proposto por Campostrini et al. (1999). Este sistema tem por objetivo tentar melhorar as trocas gasosas, e reduzir a umidade relativa nos frascos de cultivo. Nesta condição, houve redução da massa fresca de calo (Figura 3). Esta redução pode estar associada à maior perda de água nos calos cultivados na condição de ventilação dos frascos de cultivo. Calo é uma massa de células não-organizadas, em crescimento desordenado e irregularmente diferenciadas. A presença de calo na base dos ramos pode prejudicar a rizogênese (George et al., 2008) ou a sobrevivência das plântulas (Agnihotri et al., 2004; Rohman et al., 2007). Entretanto, quando se objetiva a micropropagação por embriogênese somática, ou organogênese indireta, esse incremento pode ser interessante, por esses processos estarem relacionados diretamente com a produção de calos.



**Figura 3** – Massa fresca de calo (MFC) de mamoeiro ‘Golden’, cultivado *in vitro* em diferentes tipos de sistema na fase de multiplicação. Médias seguidas por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

O teor de nitrogênio (N) foi maior no sistema ventilado (Tabela 4). O aumento na disponibilidade de N normalmente traz como consequência efeitos positivos sobre a taxa de assimilação de carbono, já que esse nutriente faz parte dos principais componentes do sistema fotossintético, tais como clorofilas, enzimas Rubisco (ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxigenase) e PEPcase (fosfoenolpiruvato carboxilase) (Correia et al., 2005). Neste trabalho com mamoeiro ‘Golden’ não houve benefícios sobre a assimilação fotossintética do carbono, embora tenham ocorrido diferenças na concentração do nutriente nitrogênio nos tecidos vegetais entre os tratamentos ventilados e frascos fechados.

A absorção e distribuição do Cálcio (Ca) através da plântula são dependentes do fluxo de massa, e podem ser limitadas pela baixa transpiração dos propágulos acondicionados em frascos sob elevada umidade relativa, por ser um nutriente que possui baixa mobilidade na planta (Sha et al., 1985; Williams, 1993). A utilização do Ca pelas plântulas *in vitro* pode ser influenciada pelo tipo de tampa do frasco. Quando os frascos são fechados com parafilme, ou tampas opacas, mantêm alta umidade, o que pode dificultar o fluxo de Ca para a parte aérea (Sha et al., 1985). Com base nestas explicações esperava-se neste trabalho com mamoeiro que no sistema ventilado a absorção do Ca fosse maior

em relação ao sistema fechado, no entanto os sistemas não influenciaram na absorção deste nutriente pelas plântulas (Tabela 4). A baixa absorção de Ca condiciona a planta regenerada a desenvolver uma estrutura morfológica deficiente das folhas, ou seja reduzida formação de cera cuticular e epicuticular (Ziv et al., 1987; Cassels e Walsh, 1994; Kitaya et al., 2005) e um difícil sistema de abertura e fechamento dos estômatos (Cassels e Walsh, 1994).

**Tabela 4** – Nitrogênio (N) e Cálcio (Ca) de mamoeiro ‘Golden’, cultivados *in vitro* em diferentes tipos de sistema na fase de multiplicação

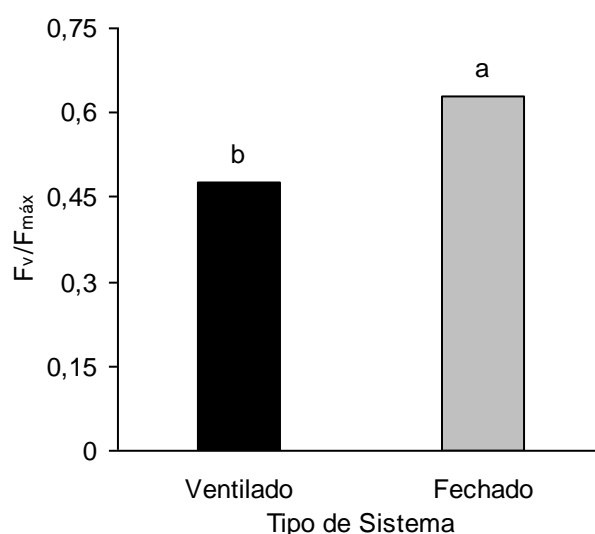
Tipo de sistema	N (mg g <sup>-1</sup> )	Ca (mg g <sup>-1</sup> )
Ventilado	69,09 a	4,66 a
Fechado	63,44 b	5,19 a

Médias seguidas por letras diferentes, nas colunas, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A fase fotoquímica é a primeira fase do processo fotossintético, na qual os pigmentos cloroplásticos desempenham um papel fundamental na captação de luz (Taiz e Zeiger, 2009). O rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_{máx}$ ) é uma importante forma de medida para avaliar a eficiência fotoquímica das plantas. Por meio dos resultados deste trabalho verifica-se que o  $F_v/F_{máx}$  foi menor no sistema ventilado (Figura 4), mas para ambos os tratamentos, os valores (0,48 ventilado e 0,63 fechado) estão abaixo da faixa considerada ótima (0,75 a 0,85) em plantas não submetidas a estresses (Bolhàr-Nordenkamph et al., 1989).

Os resultados referentes ao  $F_v/F_{máx}$  (Figura 4), em comparação aos resultados obtidos da fotossíntese potencial (Figura 2), evidenciaram que a maquinaria fotoquímica, nas condições deste experimento com mamoeiro cultivado *in vitro*, apresentou comprometimentos ou não desenvolvimento. Ou seja, ao que tudo indica, nas plântulas de mamão cultivado *in vitro*, a atividade do fotossistema II ainda não estava em perfeito funcionamento devido ao metabolismo heterotrófico e/ou mixotrófico das plântulas. Esse heterotrofismo e/ou mixotrofismo pode estar associado à reduzida quantidade de luz utilizada no sistema de cultivo ( $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), uma vez que houve trocas gasosas nos frascos de cultivos ventilados.

Tichá et al. (1998) constataram em plântulas de *Nicotiana tabacum*, que a elevação da intensidade luminosa de 60 para 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em cultivos com 3% de sacarose, aumentou significativamente a taxa fotossintética potencial. Em sistemas de biorreatores de imersão temporária. Yang e Yeh (2008), ao trabalharem com plântulas de *Calathea orbifolia*, obtiveram uma maior taxa fotossintética e  $F_v/F_{m\acute{a}x}$ , quando comparado ao sistema convencional em meio semi-sólido.

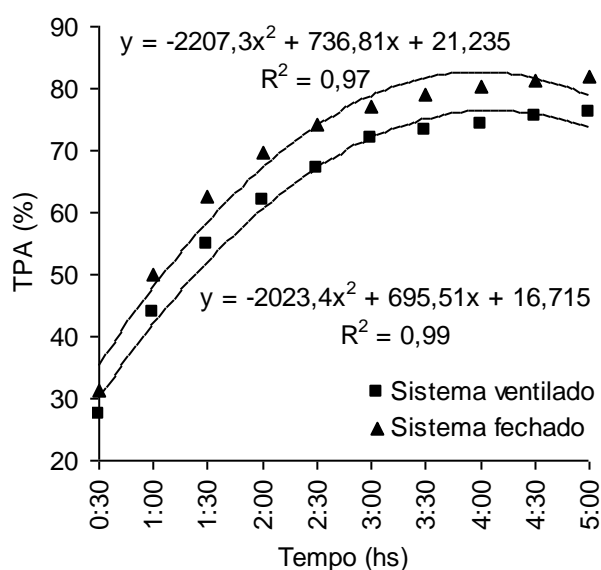


**Figura 4** – Rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_{m\acute{a}x}$ ) de mamoeiro 'Golden', cultivados *in vitro* em diferentes tipos de sistema na fase de multiplicação. Médias seguidas por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A menor taxa de perda de água de 76,13% das folhas de mamoeiro foi conseguida com a utilização do sistema ventilado (Figura 5). A alta umidade relativa (próximo de 100%) e a baixa irradiância são os principais fatores que provocam alterações na estrutura e funcionamento dos tecidos, causando a baixa capacidade das mudas *in vitro* em controlar a perda de água, quando submetidas em condições de ambiente natural. Este estresse hídrico é relatado como principal causa de mortalidade das plântulas (Barboza et al., 2006). A baixa regulação da perda de água é decorrente, principalmente da limitada ou pouca funcionalidade dos estômatos (Cassels e Walsh, 1994) e da deficiente formação de cera epicuticular (Ziv et al., 1987; Cassels e Walsh, 1994; Kitaya et al., 2005), além de reduzido desenvolvimento do mesofilo foliar (Romano e Martins-Loução,

2003). Sugere-se que a menor perda de água das plântulas de mamão cultivadas no sistema ventilado se deva à redução da umidade relativa do ambiente de cultivo para 76%, devido à melhor circulação de ar nos frascos de cultivo, o que gera melhor funcionamento dos estômatos. Igualmente, Crespo (2007) que trabalhou com cana-de-açúcar *in vitro*, em cultivo com sistema ventilado constatou também uma redução na taxa de perda de água e cita que esta redução pode estar relacionada com a menor condutância estomática e transpiração das folhas.

No sistema ventilado, a movimentação de ar em torno das folhas dos explantes pode contribuir para que os estômatos tornem-se mais responsivos aos efeitos da umidade do ar. Desta maneira, sob condição *ex vitro*, em comparação aos estômatos das folhas das plântulas cultivadas nos frascos fechados, esses estômatos das plântulas cultivadas nos frascos ventilados podem apresentar eficiente controle de abertura e fechamento, o que impediria a saída de água das folhas, quando estas são expostas a diferentes umidades do ar.

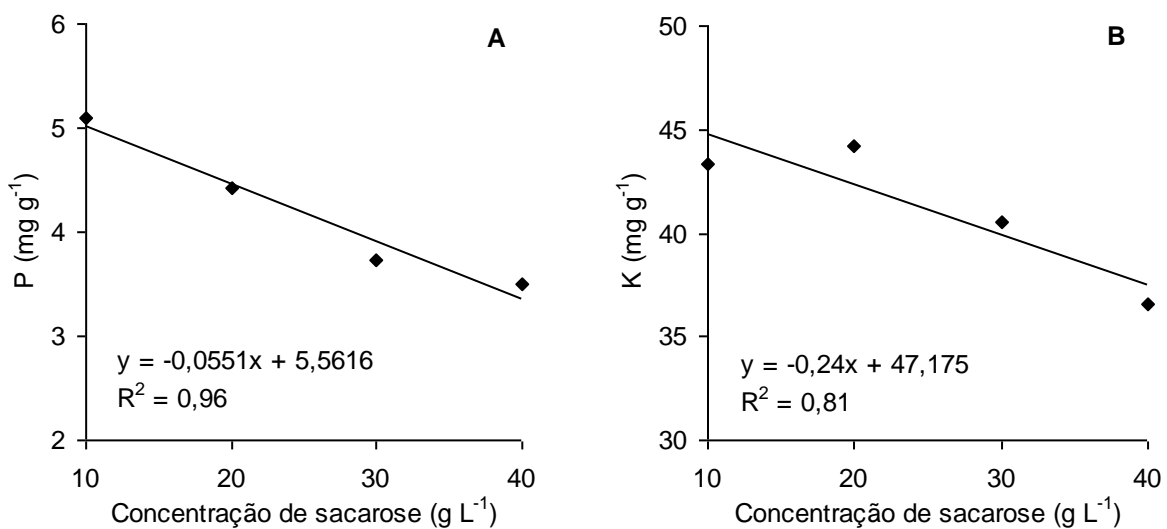


**Figura 5** – Taxa de perda de água (TPA) de mamoeiro ‘Golden’, cultivados *in vitro* em diferentes tipos de sistema na fase de multiplicação.

Os resultados obtidos por meio da ANOVA, demonstram que, a adição de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura, apresenta diferença estatística para as variáveis, fósforo, potássio, altura da plântula, massa seca da parte aérea, massa freca de calo e fotossíntese.

No cultivo *in vitro* convencional, as plântulas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de uma fonte exógena de carboidratos (Desjardins et al, 1995; Nicoloso et al., 2003). Os carboidratos atuam nas plantas suprindo as necessidades metabólicas, participando na geração de energia ou como fonte de esqueletos carbônicos para vários processos biossintéticos implicados na diferenciação e crescimento celular (Torres e Caldas, 1990). Embora a sacarose seja fundamental para as plântulas, o excesso deste composto químico no meio de cultura pode ser prejudicial à plântula.

Nos resultados obtidos, verifica-se um decréscimo linear no teor dos nutrientes P e K (Figura 6), quando foi elevada a concentração de sacarose. Os resultados encontrados corroboram com Fráguas et al. (2003), onde verificaram que o aumento da concentração osmótica do meio de cultura, causado pelo incremento nas concentrações de sacarose, dificultou a absorção de água e nutrientes em orquídeas.



**Figura 6** – (A) - Fósforo (P) e (B) - potássio (K) de mamoeiro 'Golden', cultivados *in vitro* em meio MS de multiplicação contendo diferentes concentrações de sacarose.

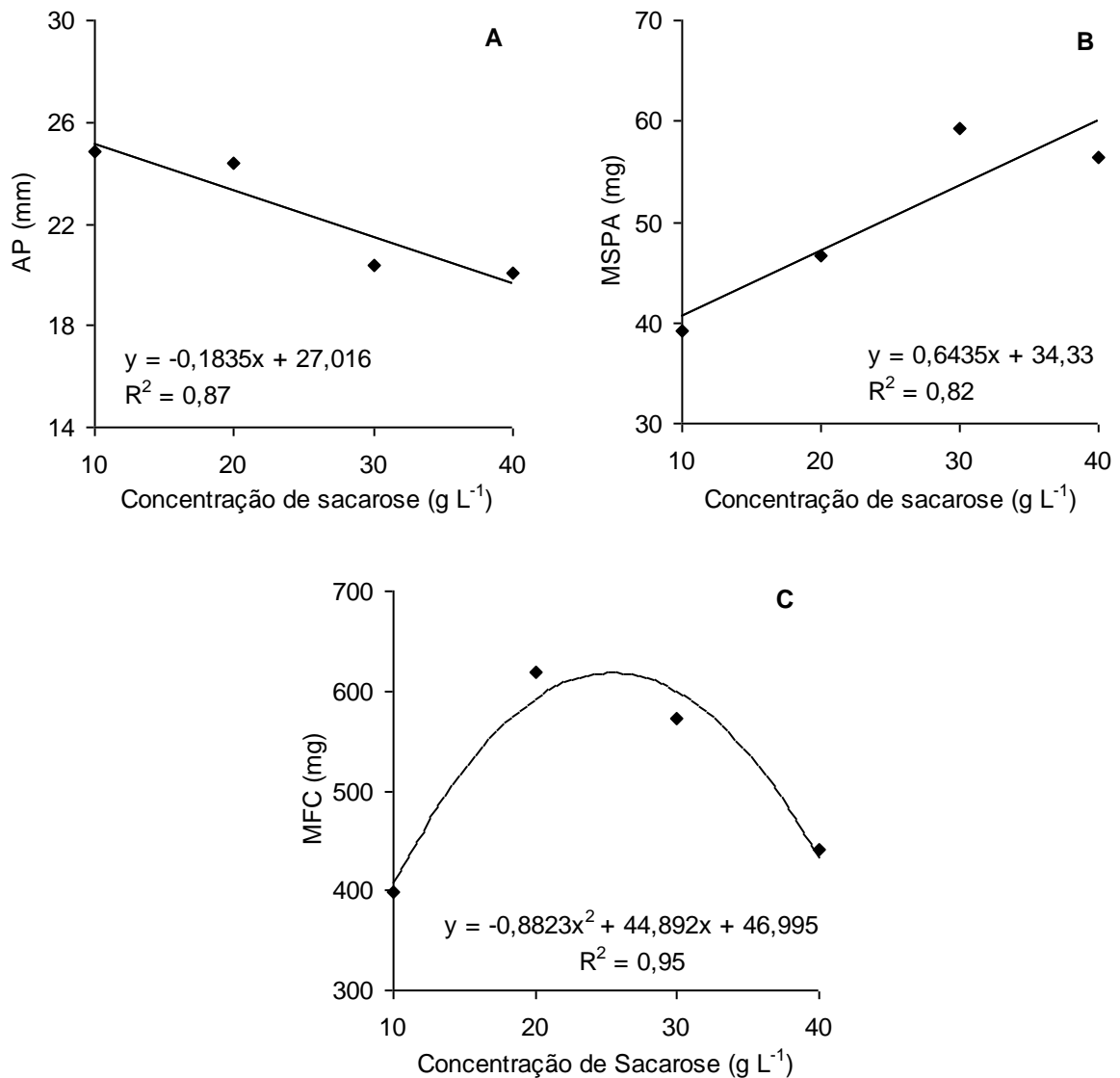
As plântulas apresentaram menor crescimento à medida que a concentração de sacarose foi aumentada (Figura 7A). Mosaleeyanon et al. (2004) trabalharam com *Samanea saman* Merr *in vitro* e constataram redução na altura dos brotos, à medida que a concentração de sacarose foi aumentada. Entretanto, o maior comprimento dos brotos (8,8 cm), foi encontrado com ausência de sacarose no meio. Ribeiro et al. (2008) conseguiram o maior comprimento de



brotos (3,4 cm) em copo-de-leite com sacarose a 30 g L<sup>-1</sup>, havendo redução no tamanho quando elevou a concentração de sacarose. Torres e Caldas (1990) citam que uma quantidade elevada de sacarose no meio de cultura pode elevar a pressão osmótica do meio e assim reduzir o crescimento das plântulas, por meio de redução na absorção de água e de nutrientes devido à alteração de potencial hídrico entre o meio de cultivo e a plântula, desfavorecendo assim a absorção desses.

As concentrações crescentes de sacarose promoveram incrementos na massa seca da parte aérea (Figura 7B). Resultados similares foram obtidos por Mothé et al. (2008) em plântulas de cana-de-açúcar, havendo o aumento da biomassa seca, quando a concentração de sacarose foi aumentada de 0 até 50 g L<sup>-1</sup>. Nicoloso et al.(2003) também verificaram o efeito positivo da sacarose na produção de matéria seca de ginseng brasileiro. Estudos comprovaram que 75 a 85% do aumento da biomassa seca se deve à incorporação de carbono pela adição de sacarose (De Riek et al., 1997). Stancato e Tucci (2010) ressaltaram que a acumulação de massa seca de plântulas está positivamente correlacionada com o alto conteúdo de sacarose no meio de cultura.

Ao observar a Figura 7C, verifica-se que para as concentrações de sacarose utilizadas no meio de cultura não houve uma relação direta na produção de calo. Contudo, salienta-se menores valores de massa fresca de calo para as concentrações de sacarose a 10 e 40 g L<sup>-1</sup>.



**Figura 7** – (A) - Altura da plântula (AP), (B) - massa seca da parte aérea (MSPA) e (C) - massa fresca de calo (MFC) de mamoeiro ‘Golden’, cultivados *in vitro* em meio MS de multiplicação contendo diferentes concentrações de sacarose.

As plântulas de mamão não apresentaram assimilação fotossintética do carbono (Figura 8), mas apresentaram uma liberação deste  $\text{CO}_2$  caracterizada por uma taxa respiratória. Ao se observar esta figura, verifica-se um aumento da taxa respiratória em uma concentração acima de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Tal resposta pode ser devido a uma maior disponibilidade de substrato para a respiração.

A Figura 9 mostra que de fato, quando se aumentou a concentração de sacarose até a concentração de 30 e  $40 \text{ g L}^{-1}$ , houve um incremento na taxa respiratória avaliada pelo consumo de  $\text{O}_2$ . Novamente, este incremento na taxa

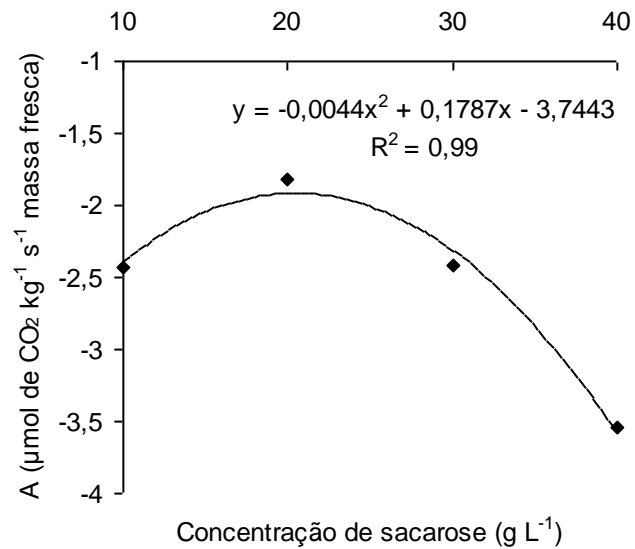
respiratória pode ser devido ao aumento na disponibilidade de substrato para este processo metabólico.

Khan et al. (2002) avaliaram a taxa fotossintética líquida do eucalipto após 7; 14; 21 e 28 dias, e verificaram que, em todas as medições, e em condições fotomixotróficas (sacarose a 30 g L<sup>-1</sup>), uma taxa fotossintética líquida negativa foi obtida. Quando não se adicionou sacarose ao meio de cultivo, e em associação ao enriquecimento de CO<sub>2</sub> (1400-1500 ppm), houve em todos os períodos, uma assimilação fotossintética do carbono. Nesse trabalho houve um crescimento desta assimilação até 21 dias, e após esta fase, houve uma queda deste processo metabólico. Mosaleeyanon et al. (2004) observaram a mesma resposta em plântulas de *Samanea saman* Merr. Em condição de cultivo na ausência de sacarose, houve a maior assimilação fotossintética de carbono, e à medida que houve incremento simultâneo de sacarose e de CO<sub>2</sub>, foi ocorrendo redução na taxa fotossintética. A baixa atividade fotossintética de plântulas cultivadas *in vitro* pode ser devida às altas concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura, que ocasionaram o acúmulo de amido ou a inibição da enzima Rubisco (Hdider e Desjardins, 1994), ou devido à redução da síntese de clorofila (Rodrigues et al., 2006).

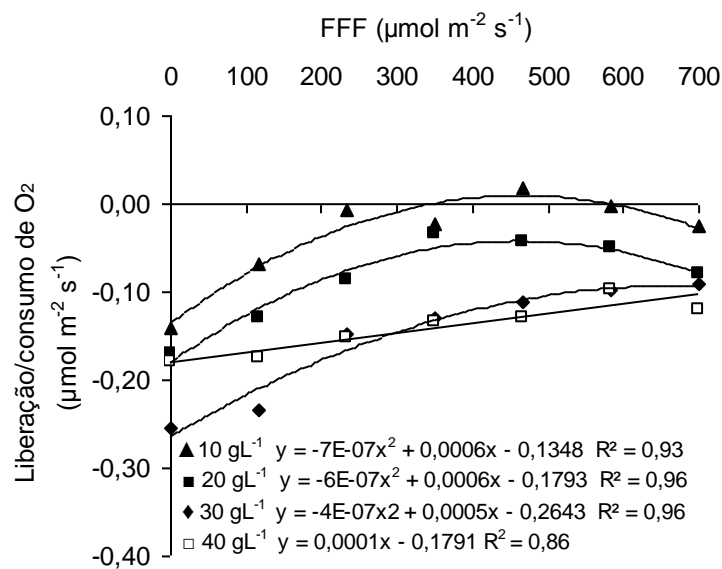
No caso específico deste experimento com mamoeiro *in vitro*, a ausência da assimilação fotossintética do carbono pode ser devido à reduzida competência fotoquímica dos explantes, uma vez que mesmo em baixas concentrações de sacarose (10 g L<sup>-1</sup>) não houve assimilação fotossintética do carbono. A reduzida competência fotoquímica pode ser devido à baixa intensidade luminosa na sala de cultivo. Obviamente, ao se considerar 90 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> como uma baixa intensidade luminosa para que haja a completa formação da maquinaria fotoquímica, pode-se também especular que esse baixo valor de FFF pode ter causado uma alteração anatômica foliar, como reduzida massa foliar específica, caracterizada pelo reduzido parênquima paliçádico, responsável pela formação da maquinaria fotossintética.

Ao se observar a Figura 7B, em relação às Figuras 2, 8 e 9, verifica-se que o incremento de bioamassa nos tecidos do mamoeiro 'Golden' cultivado *in vitro*, foi devido exclusivamente à fonte externa de carbono, uma vez que não foi detectada nenhuma assimilação fotossintética do carbono. Analizando a Figura 7B, a concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> foi a que apresentou a menor massa seca da

parte aérea, logo pode prejudicar o desenvolvimento *ex vitro* das plântulas, por possuir menor quantidade de reserva inicial.



**Figura 8** – Fotossíntese (A) de mamoeiro ‘Golden’, cultivados *in vitro* em meio MS de multiplicação contendo diferentes concentrações de sacarose.



**Figura 9** – Liberação/consumo de oxigênio de mamoeiro ‘Golden’, cultivados *in vitro* em meio MS de multiplicação contendo diferentes concentrações de sacarose.

## CONCLUSÕES

- O cultivo *in vitro* sob luz vermelha promoveu maior crescimento das plântulas;
- A menor taxa de perda de água das plântulas foi obtida no sistema ventilado, podendo relatar que tais plântulas podem ter melhor adaptação para estas condições, quando forem cultivadas sob condição *ex vitro*;
- A eficiência fotoquímica das plântulas nas condições de cultivo foi baixa. Sugere-se desta forma em novos experimentos usar a concentração de sacarose a 10 g L<sup>-1</sup> e aumentar o nível de irradiância (luz vermelha) da sala de cultivo para estimular o metabolismo autotrófico;
- Nas condições deste experimento, o incremento na produção de biomassa seca do mamoeiro foi devido exclusivamente à fonte exógena de carbono por meio da adição de sacarose no meio de cultivo, uma vez que não houve assimilação fotossintética do carbono. A baixa assimilação fotossintética do carbono foi devido ao comprometimento na capacidade fotoquímica, causada pelo baixo FFF na sala de cultivo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agnihotri, S., Singh, S.K., Jain, M., Sharma, M., Sharma, A.K., Chaturvedi, H.C. (2004) *In vitro* cloning of female and male *Carica papaya* through tips of shoots and inflorescences. *Indian Journal of Biotechnology*, 3: 235-240.
- Alves, F.L., Pacova, B.E.V., Galvaes, P.A.O. (2003) Seleção de plantas matrizes de mamão, grupo Solo, para produção de sementes. *In: Martins, D.S., Costa, A.F.S. (eds.) A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção*. Vitória: Incaper, p. 103-114.
- Aragón, C.E., Escalona, M., Rodriguez, R., Cañal, M.J., Capote, I., Pina, D., González-Olmedo, J. (2010) Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46: 89-94.

- Arango, L.V., Rezende, C.R., Carvalho, S.P. (2008) Identificação antecipada do sexo do mamoeiro pelos caracteres físicos das sementes e padrões isoenzimáticos das mudas. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuária*, 9 (1): 22-29.
- Arigita, L., González, A., Tamés, R.S. (2002) Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 115 : 166-173.
- Barboza, S.B.S.C., Ribeiro, D.G., Teixeira, J.B., Portes, T.A., Souza, L.A.C. (2006) Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41 (2): 185-194.
- Bolhàr-Nordenkamph, H.R. Long, S.P., Baker, N.R., Öquist, G., Schreiber, U., Lechner, E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*, 3 (4): 497-514.
- Brscan, I.N. (2009) Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais. Disponível em: [http://www.florestropicais.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=96&catid=4:noticias-flores&Itemid=20](http://www.florestropicais.net/index.php?option=com_content&view=article&id=96&catid=4:noticias-flores&Itemid=20), em 28/11/10, página mantida pela Flores Tropicais.
- Campostrini, E., Teixeira, J.B., Cruz, A.R.R., Yamanishi, O.K. (1999) Efeito da concentração de CO<sub>2</sub> e do teor de sacarose no crescimento de plântulas de abacaxi (*Ananas comosus* [L.] Merrill) cultivadas *in vitro*. *Anais do Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal*, 7, Brasília: SBFV, v. 11, p. 33-33.
- Cassells, A.C., Walsh, C. (1994) The influence of gas permeability of the culture lid on calcium uptake and stomatal function in *Dianthus* microplants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37: 171-178.
- Chang, H.S., Chakrabarty, D., Hahn, E.J, Paek, K.Y. (2003) Micropropagation of Calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39: 129-134.
- Correia, C.M., Pereira, J.M.M., Coutinho, J.F., Bjorn, L.O., Torres-Pereira, J.M.G. (2005) Ultraviolet-B radiation and nitrogen affect the photosynthesis of maize: a Mediterranean field study. *European Journal of Agronomy*, 22 (3) 337-347.
- Costa, F.H.S., Pereira, J.E.S., Pasqual, M., Castro, E.M., Santos, A.M. (2009) Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. *Ciência Rural*, 39 (3): 742-748.
- Crespo, L.E.C. (2007) *Cultivo in vitro de cana-de-açúcar (saccharum spp.) em ambientes que favorecem condições heterotróficas e mixotróficas: um estudo relacionado à fotossíntese, à eficiência fotoquímica e às relações hídricas*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 49p.
- Cruz, C.D. (2006) *Programa GENES: biometria*. Viçosa: Editora UFV, 382p.

- Debergh, P.C. (1991) Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 289: 291-300.
- De Riek J, Piqueras A., Debergh P.C (1997) Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 269–278
- Desjardins, Y., Hdider, C., de Rieck, J. (1995) Carbon nutrition *in vitro*. Regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In: Aitken-Christie, J., Kozai, T., Smith, M.A.L. (eds.) *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 441-471.
- Dousseau, S., Alvarenga, A.A., Castro, E.M., Soares, R.P., Emrich, E.B., Melo, L.A. (2008) Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. *Ciência e Agrotecnologia*, 32 (6): 1694-1700.
- Economou, A.S., Read, P.E. (1987) Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. *HortiScience*, 22 (5): 751-754.
- Eliasson, M.K., Beyl, C.A., Barker, P. (1994) *In vitro* responses and acclimatization of *Prunus serotina* with paclobutrazol. *Journal Plant Growth Regulation*, 13: 137-142.
- Erig, A.C., Schuch, M.W. (2005) Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rural*, 35 (4): 961-965.
- Felippe, G.M. (1986) Fotomorfogênese. In: Ferri, M.G. (ed) *Fisiologia Vegetal*. 2. ed. São Paulo: EPU, p. 231-280.
- Fráguas, C.B., Villa, F., Souza, A.V., Pasqual, M., Dutra, L.F. (2003) Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. *Revista Ceres*, 50 (292): 719-726.
- George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. (2008) *Plant propagation by Tissue Culture*. 3. ed. Dordrecht: Springer, 501p.
- Grattapaglia, D., Machado, M.A. (1998) Micropropagação. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, p. 183-260.
- Hdider, C., Desjardins, Y. (1994) Effects of sucrose on Photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36 (1) : 27-33.
- Khan, P.S.S.V., Kozai, T., Nguyen, Q. T., Kubota, C., Dhawan, V. (2002) Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 141-146.

- Kitaya, Y., Ohmura Y., Kubota, C. and Kozai, T. (2005) Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on plantlets photosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83: 251-257.
- Kozai, T., Kubota, C., Jeong, B.R. (1997) Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51: 49-56.
- Kubota, C., Kozai, T. (1992) Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum in vitro* under forced and natural ventilation. *HortScience*, 27: 1312-1314.
- May, C.T., Gil, F.E., Contreras, F., Santamaría, J.M. (2007) Field Performance of 100% Hermaphrodite Micropropagated Papaya Plants. *Acta Horticulturae*, 748: 219-222.
- Morini, S., Muleo, R. (2003) Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: Jain, S.M., Ishii, K. *Micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 3-35.
- Mosaleeyanon, K., Cha-Um, S., Kirdmanee, C. (2004) Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO<sub>2</sub>-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. *Scientia Horticulturae*, 103: 51-63.
- Mothé, G.P.B., Torres Netto, A., Crespo, L.E.C., Campostrini, E. (2008) Eficiência fotoquímica e características de crescimento da cana-de-açúcar (*saccharum officinarum* L.) cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e qualidade de luz. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 4 (2): 84-91.
- Murashige, T., Skoog, F.A. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3): 473-497.
- Nelson, E.A., Sage, R.F. (2008) Functional constraints of CAM leaf anatomy: tight cell packing is associated with increased CAM function across a gradient of CAM expression. *Journal of Experimental Botany*, 59: 1841-1850.
- Nhut, D.T., Takamura T., Watanabe H., Okamoto K., Tanaka, M. (2003) Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73: 43-52.
- Nicoloso, F.T., Erig, A.C., Russowski, D., Martins, C.F. (2003) Efeitos de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, 27 (1): 84-90.
- Norton, C.R., Norton, M.E., Herrington, T., Phillips, D. (1988) Light quality and light pipe in the micropropagation of woody ornamental plants. *Acta Horticulturae*, The Hague, 226: 413-416.



- Pasqual, M. (2001) *Textos acadêmicos: meios de cultura*. Lavras: FAEPE/UFLA, 127p.
- Pyke, K., López-Juez, E. (1999) Cellular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18 (4): 527-546.
- Ribeiro, M.N.O., Pasqual, M., Silva, A.B., Rodrigues, V.A. (2008) Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-de-leite). *Revista Ciência Agronômica*, 39 (1): 101-106.
- Ribeiro, M.N.O., Pasqual, M., Silva, A.B., Rodrigues, V.A. (2009) Multiplicação *in vitro* de copo-de-leite: espectros de luz e sacarose. *Ciência Rural*, 39 (8): 2388-2393.
- Rocha, P.S.G., Oliveira, R.P., Scivittaro, W.B., Santos, U.L. (2010) Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. *Ciência Rural*, 40 (9): 1922-1928.
- Rodrigues, M.M., Melo, M.D., Aloufa, M.A.I. (2006) Propagação vegetativa *in vitro* e análise estrutural de macieira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41 (1): 171-173.
- Rohman, M.M., Islam, M.N., Alam, M.S., Ahmad, M.R., Paul, T.K. (2007) Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya*) for clonal propagation. *Biotechnology*, 6 (3): 339-343.
- Romano, A., Martins-Loução, M.A. (2003) Water loss and morphological modifications in leaves during acclimatization of Cork Oak micropropagated plantlets. *Acta Horticulturae*, 616: 439-442.
- Saebo, A., Krekling, T., Appelgren, M. (1995) Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41 (2) 177-185.
- Saitou, T., Hashidume, A., Tokutomi, S., Kamada, H. (2004) Reduction of phytochrome level and light-induced formation of adventitious shoots by introduction of antisense genes for phytochrome A in horseradish hairy roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 45-51.
- Sha, L., McCown, B.H., Lloyd, A.P. (1985) Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110 (5): 631-634.
- Silva, A.B., Pasqual, M., Teixeira, J.B., Araújo, A.G. (2007) Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42 (9): 1257-1260.
- Simão, S. (1998) Mamão. In: Simão, S. *Tratado de Fruticultura*. Piracicaba: Fealq, p. 541-575.

- Schmildt, E.R., Amaral, J.A.T. (2002) Contaminação e reação morfogênica *in vitro* de explantes de mamoeiro. *Revista Ceres*, 49 (281): 63-70.
- Schmildt, E.R., Amaral, J.A.T., Schmildt, O., Coelho, R.I., Rabello, W.S., Martins Filho, S. (2010) Níveis de ácido indol butírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro 'Tainung 01'. *Acta Scientiarum Agronomy*, 32 (1): 125-129.
- Schmildt, O., Schmildt, E.R., Amaral, J.A.T. (2007a) Cinetina e ANA na multiplicação *in vitro* de mamoeiro 'tainung 01'. *Scientia Agraria*, 8 (1): 55-60.
- Schuerger, A.C., Brown, C., Stryjewski, E.C. (1997) Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) growth under red light emitting diodes supplemented with blue or far-red light. *Annals of Botany*, 79 (3): 273-282.
- Soave, R.C.F., Silva, O.A. (1993) Aspectos fenológicos e variação dos conteúdos das clorofilas *a* e *b* em *Caryocar brasiliense* CAMB. *Arq. Biologia e Tecnologia*, 36 (1): 57-69.
- Stancato, G.C., Tucci, M.L.S.A. (2010) Monitoring the end of the *in vitro* phase of *Anthurium andreanum* Lindl. Plantlets. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22 (1): 61-68.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2009) *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 848p.
- Tichá, I., Cap, F., Pacovska, D., Hofman, P., Haisel, D., Capkova, V., Schäfer, C. (1998) Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 102: 155-162.
- Torres, A.C., Caldas, L.S. (1990) *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: Embrapa-CNPQ, 433p.
- Torres Netto, A., Campostrini, E., Oliveira, J.G., Yamanishi, O.K. (2002) Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 14 (3): 203-210.
- Vlahos, J.C., Martakis, G.F.P., Heuvelink, E. (1992) Daylength, light quality, and temperature influence growth and development of *Achimenes*. *HortScience*, 27: 1269-1271.
- Williams, R.R. (1993) Mineral nutrition *in vitro* – a mechanistic approach. *Australian Journal of Botany*, 41: 237-251.
- Yang, S.H., Yeh, D.M. (2008) *In vitro* leaf anatomy, *ex vitro* photosynthetic behaviors and growth of *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy plants obtained from semi-solid medium and temporary immersion systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93: 201–207.

Ziv, M., Schwartz, A., Fleminger, D. (1987) Malfunctioning stomata *in vitro* leaves of carnation (*Sianthus caryopphyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. *Plant Sciense*, 52: 127-134.

### **3.2. PROPAGAÇÃO DE MAMOEIRO ‘GOLDEN’ E ‘UENF/CALIMAN 01’ VIA ESTAQUIA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB**

#### **RESUMO**

Este trabalho teve por objetivo avaliar a fotossíntese, fluorescência, índice SPAD e o crescimento de estacas de mamoeiro ‘Golden’ e ‘UENF/Caliman 01’ em resposta a aplicação de AIB na indução do enraizamento, bem como avaliar as características morfológicas das plantas em campo. As estacas foram preparadas, sendo tratadas inicialmente com fungicida Captan a  $4,5 \text{ g L}^{-1}$ , por 20 minutos e posteriormente, conforme os tratamentos, submetidas à imersão em diferentes concentrações de AIB, durante 20 segundos. Em casa de vegetação as plantas foram cultivadas com nebulização intermitente. O experimento inicial foi montado em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial  $2 \times 5$ , sendo duas cultivares (‘Golden’ e ‘UENF/Caliman 01’) e cinco concentrações de AIB (0; 500; 1000; 1500 e  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ) com três repetições e oito estacas por repetição. De acordo com os tratamentos, as estacas de mamoeiro ‘UENF/Caliman 01’ tratadas com AIB proporcionaram melhor enraizamento, destacando-se a concentração de  $1500 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo por tanto, estas mudas transplantadas no campo, as quais foram comparadas morfológicamente com as plantas propagadas via seminífera de mesma idade, no plantio e após 4,5 meses do plantio. Ainda foi montado outro experimento de estaquia com as cultivares ‘UENF/Caliman 01’ e ‘Golden’, nas mesmas condições experimentais e de cultivo do experimento anterior, sendo agora aumentada as concentrações de AIB (0;

750; 1500; 2250 e 3000 mg L<sup>-1</sup>) na tentativa de melhorar o enraizamento, principalmente do mamoeiro 'Golden'. As avaliações relacionadas à fotossíntese, fluorescência da clorofila *a*, índice SPAD, e ao crescimento foram feitas após 70 dias de cultivo. Em estacas de mamoeiro 'Golden', em novos estudos, e para a indução de enraizamento, indica-se aumentar a concentração de AIB acima de 3000 mg L<sup>-1</sup>. Estacas de mamoeiro 'Uenf/Caliman 01' enraizaram 65%, quando tratadas com AIB a 1500 mg L<sup>-1</sup>. Poucas raízes nas estacas do mamoeiro são suficientes para manter um bom estado hídrico, uma boa taxa fotossintética, uma significativa quantidade de clorofilas nas folhas e com boa eficiência na utilização de energia luminosa. Plantas de mamoeiro propagadas por estaquia, quando cultivadas no campo apresentaram iniciação precoce de flores, menor altura de inserção dos primeiros frutos e baixa estatura, o que antecipa e facilita a colheita.

**Palavras-chave** – ácido indol-3-butírico, *Carica papaya* L., enraizamento, propagação vegetativa

## **PROPAGATION OF THE PAPAYA TREE 'GOLDEN' AND 'UENF/CALIMAN 01' THROUGH CUTTING IN FUNCTION OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF IBA**

### **ABSTRACT**

This work had for objective to evaluate the photosynthesis, fluorescence, SPAD index and the growth of papaya tree cuttings 'Golden' and 'UENF/Caliman 01' in response to application of IBA in the induction of the rooting act, as well as to evaluate the morphologic characteristics of the plants in field. The cuttings were prepared, being treated initially with fungicide Captan<sup>®</sup> at 4,5 g L<sup>-1</sup>, for 20 minutes and later, according to the treatments, submitted to the immersion in different concentrations of IBA, for 20 seconds. In green house the plants were cultivated with intermittent nebulization. The initial experiment was set up in a randomized complete block design factorial 2x5, being two cultivars ('Golden' and 'UENF/Caliman 01') and five concentrations of IBA (0; 500; 1000; 1500 and 2000 mg L<sup>-1</sup>) with three repetitions and eight cuttings for repetition. In agreement with

the treatments, the papaya tree cuttings 'UENF/Caliman 01' treated with IBA provided better rooting, standing out the concentration of 1500 mg L<sup>-1</sup>, being these seedlings transplanted in the field, which were compared morphologically with the plants spread in a seminiferous way of same age, in the planting and after 4,5 months of the planting. Still other cutting experiment was set up with cultivars 'UENF/Caliman 01' and 'Golden', in the same experimental conditions and of cultivation of the previous experiment, being now increased the concentrations of IBA (0; 750; 1500; 2250 and 3000 mg L<sup>-1</sup>) in the attempt of improving the rooting act, mainly of the papaya tree 'Golden'. The evaluations related to the photosynthesis, fluorescence of the chlorophyll a, SPAD index, and to the growth were done after 70 days of cultivation. In papaya tree cuttings 'Golden', in new studies, and for the rooting induction, it is indicated to increase the concentration of IBA above 3000 mg L<sup>-1</sup>. Papaya tree cuttings 'Uenf/Caliman 01' rooted 65%, when treated with IBA at 1500 mg L<sup>-1</sup>. Few roots in the cuttings of the papaya tree are enough to maintain a good hydric state, a good photosynthetic rates, a significant amount of chlorophylls in the leaves and with good efficiency in the use of luminous energy. Papaya tree plants spread by cutting, when cultivated in the field presented precocious initiation of flowers, smaller height of insert of the first fruits and low stature, what anticipate and facilitates the crop.

**Key-words** – indole-3-butyric acid, *Carica papaya* L., rooting, vegetative propagation

## INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de mamão e em 2008 produziu 1,89 milhões de toneladas de frutos, em uma área colhida de 36,65 mil hectares, sendo a terceira fruta mais produzida no país (Agrianual, 2009).

O mamoeiro em plantios comerciais é propagado essencialmente via seminífera. As sementes do grupo Solo utilizadas, na sua maioria, são obtidas de plantas hermafroditas selecionadas em lavouras comerciais, produzindo na geração seguinte, uma proporção de 67% de plantas hermafroditas e 33% de plantas femininas. No caso dos híbridos do grupo Formosa, as sementes

produzem na nova geração 50% de plantas femininas e 50% de plantas hermafroditas (Arango et al., 2008).

No entanto, a utilização de sementes ocasiona alguns problemas genéticos. A maioria das sementes dos cultivares utilizada nas regiões produtoras de mamão é proveniente de frutos de polinização livre, sem controle efetivo da polinização. Desse modo, as cultivares sofrem variações na sua descendência, causando descaracterização dos genótipos, comprometendo a qualidade das lavouras (Drew, 1987; Costa e Pacova, 2003), resultando em perda de vigor e segregação para o formato do fruto (Marin et al., 2001). A segregação das plantas proveniente do uso de sementes exige que se faça a eliminação das plantas femininas em plantios comerciais, por ocasião do início do florescimento (3 a 5 meses após o plantio). Como não se conhece o sexo das plantas no início do plantio, os agricultores plantam pelo menos três mudas por cova, o que aumenta os custos de produção (Simão, 1998; Arango et al., 2008), além de afetar o desenvolvimento inicial das plantas hermafroditas em razão da competição por água, luz e nutrientes minerais (Simão, 1998).

As desvantagens atribuídas à utilização de sementes demonstram a necessidade de se buscar alternativas à propagação seminífera. A propagação vegetativa por estaquia pode ser utilizada, entretanto não vem sendo realizada devido à dominância apical que o mamoeiro apresenta, e também em função do baixo rendimento de enraizamento das estacas (Grana Jr, 2000). Segundo Barros et al. (2009), a quebra da dominância apical para indução de novas brotações laterais no mamoeiro pode ser feita com a poda do caule a 2 m de altura.

A propagação de várias espécies frutíferas tem sido feita pela estaquia, porém os resultados são variáveis de acordo com um grande número de fatores internos. Destacam-se, como fatores internos, a condição fisiológica da planta-matriz, a idade da planta, o tipo de estaca, a época do ano para coleta, a sanidade do material e o balanço hormonal, a espécie e cultivar (Fachinello et al., 2005).

O enraizamento de estacas de espécies de difícil enraizamento pode ser conseguido se forem fornecidos fatores adequados para o enraizamento das mesmas. A busca de técnicas auxiliares, como o uso de fitorreguladores, tem sido utilizada com frequência a fim de proporcionar melhoria do enraizamento (Biasi, 1996). As auxinas são os fitorreguladores mais utilizados para o enraizamento de

estacas de várias espécies, e dentre estes se destaca o ácido indol-3-butírico (AIB), por se tratar de uma substância fotoestável, de ação localizada, e menos sensível à degradação biológica, em comparação com as demais auxinas sintéticas (Hoffmann et al., 1996; Fachinello et al., 2005). As auxinas aplicadas à estaca proporcionam maior porcentagem, velocidade, qualidade e uniformidade de enraizamento (Xavier e Comercio, 1996; Hartmann et al., 2011).

Segundo Allan (1990), as estacas de mamoeiro podem ser enraizadas por meio da utilização de AIB, sob nebulização intermitente e temperatura mínima em torno de 30 °C no substrato de areia, com leito aquecido. Entretanto, a grande desvantagem encontrada neste sistema descrito por Allan está no fato de que para manter a temperatura na base estacas em torno de 30 °C é necessária a utilização de instalações mais sofisticadas, como o leito de areia aquecido, o que acaba por final encarecendo o processo de produção de mudas. Nestas condições experimentais, Allan (1964) trabalhando com F<sub>1</sub> de 'Hortus Gold', na África do Sul, utilizando AIB a 1000 mg L<sup>-1</sup> obteve 87% de enraizamento usando estacas de 2,5 cm de diâmetro e tamanho entre 12,7 e 30,5 cm colhidas no outono. O autor enfatiza a importância destas medidas para bom enraizamento. Desta forma, quando usou estacas com apenas 1,25 cm de diâmetro e menores que 12,7 cm, também colhidas no outono, obteve apenas 6% de enraizamento.

A propagação do mamoeiro por estaquia, apesar de ainda não ser utilizada em escala comercial, em alguns trabalhos de pesquisas em nível de campo foi possível demonstrar que as plantas apresentam algumas vantagens, como possuírem as mesmas características genéticas das plantas matrizes hermafroditas; além de ter o início da floração precoce, o que antecipa a produção de frutos; e plantas de menor altura de inserção do primeiro fruto, e porte mais baixo (Allan, 1964; Allan 1967; Ramkhelawan et al., 1999), o que facilita a colheita dos frutos em plantas de ciclo mais avançado de produção que têm um porte mais alto (Silva et al, 2010).

Uma vez que a capacidade de enraizamento por meio da ação dos fitorreguladores é extremamente dependente do metabolismo do genótipo, torna-se de grande importância estudar a resposta ao enraizamento de cada genótipo a ação destes fitorreguladores. Desta maneira, este trabalho objetivou avaliar a fotossíntese, fluorescência da clorofila *a*, índice SPAD e o crescimento de estacas de mamoeiro 'Golden' e 'UENF/Caliman 01' em resposta a aplicação de AIB na



indução do enraizamento, bem como avaliar as características morfológicas das plantas em campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na fazenda Santa Terezinha, da empresa Caliman Agrícola S.A., localizada no município de Linhares, Espírito Santo (latitude 19°11'13"S, longitude 40°05'39"W e altitude 29 m), entre os dias 13 de janeiro e 21 de agosto de 2009.

Foram instalados dois experimentos em casa de vegetação para induzir o enraizamento em estacas de mamoeiro 'Golden' e 'UENF/Caliman 01'. A indução foi feita com a aplicação de AIB (ácido indol-3-butírico) na base das estacas. No primeiro experimento as plantas que apresentaram melhor tratamento para o enraizamento foram transplantadas no campo e foram comparadas morfológicamente com plantas propagadas via seminífera, no plantio e após 4,5 meses. No segundo experimento foram feitas as avaliações das características morfológicas e fisiológicas relacionadas à indução do enraizamento nas estacas. Abaixo segue a descrição de ambos os experimentos.

### Experimento 1

As estacas utilizadas para indução do enraizamento foram obtidas de brotações laterais de mamoeiro 'Golden' e 'UENF/Caliman 01' de sexo hermafrodita. As plantas não sofreram podas para indução das brotações laterais. Estacas de tamanho entre 15 e 25 cm de comprimento, com diâmetro de  $2 \pm 0,5$  cm foram retiradas das plantas matrizes de 30 meses de idade. As estacas foram retiradas (13 janeiro de 2009) das plantas matrizes no período da manhã, com cortes bem rentes à base, e colocadas em baldes com água. Em seguida foram preparadas em viveiro. Foram mantidas duas folhas por estaca, sendo retirados os limbos foliares das demais folhas basais, mantendo-se 3 cm de pecíolo. A manutenção de uma parte do pecíolo teve como função evitar a entrada de patógenos no caule.

As estacas foram devidamente tratadas no viveiro à sombra, sob imersão com solução fungicida (Captan: 4,5 g L<sup>-1</sup>), por um período de 20 minutos. Em seguida, de acordo com cada tratamento, as bases destas foram submetidas à imersão em diferentes concentrações de AIB (0; 500; 1000; 1500 e 2000 mg L<sup>-1</sup>) durante 20 segundos.

Para o cultivo das estacas do mamoeiro foram usadas bandejas brancas de capacidade de 16 L como recipientes, com 10 furos por 100 cm<sup>2</sup> e como substrato para o plantio, a areia branca. Após um período de 15 dias em viveiro, foi feita a primeira aplicação de nutrientes via substrato, com solução de Hoagland e Arnon (1950), repetindo-se por mais seis aplicações com intervalos semanais. Quinzenalmente foram feitas pulverizações com fungicida Captan a 2 g L<sup>-1</sup> em todas as estacas.

Após 50 dias de cultivo nas bandejas, as estacas enraizadas foram transferidas para sacos de polietileno com capacidade de 750 ml contendo o substrato Bioplant®, conforme utiliza a Caliman Agrícola S/A para o preparo de mudas. Nestas condições de cultivo nas sacolas as plantas permaneceram no viveiro por mais 20 dias.

As condições ambientais do viveiro foram controladas pelo sistema de nebulização intermitente, que era acionado sempre que a temperatura atingisse 31 °C. Durante os 70 dias do experimento em viveiro, no período do dia, a temperatura do substrato, do ar, o fluxo de fótons fotossintéticos (máximo) e a umidade relativa do ar foram 27,5 ± 2 °C; 28,1 ± 2 °C; 1675,4 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 73,2 ± 6%, respectivamente, monitoradas pelo sensor WatchDog Datalogger, em intervalos de uma hora.

Após os 70 dias de viveiro, as plantas foram transferidas para o ambiente externo ao viveiro para aclimatização, permanecendo por 20 dias, recebendo os mesmos tratos dados às mudas obtidas via seminífera, com a rega sendo feita duas vezes ao dia.

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5, sendo duas cultivares ('Golden' e 'UENF/Caliman 01') e cinco concentrações de AIB (0; 500; 1000; 1500 e 2000 mg L<sup>-1</sup>) com três repetições e oito estacas por repetição.

Ao final de 50 dias de cultivo em bandejas na casa de vegetação, procedeu-se a avaliação da porcentagem de enraizamento, por meio da contagem

de plantas enraizadas. O cálculo da porcentagem de enraizamento foi feito em relação ao número inicial de estacas utilizadas no experimento. Neste experimento as plantas de 'UENF/Caliman 01', apresentaram melhor enraizamento em relação ao mamoeiro 'Golden'. Dentre as plantas de 'UENF/Caliman 01' aquelas tratadas com AIB a  $1500 \text{ mg L}^{-1}$  foram transplantadas no campo, por terem sobressaído melhor em relação às demais, no que se refere ao enraizamento. No total, 15 plantas de 'UENF/Caliman 01' foram levadas a campo. Foi colocada uma muda hermafrodita por cova, em um espaçamento de 1,5 m entre plantas em única fileira, em meio à área de plantio de mudas via seminífera (três mudas por cova) em um espaçamento de 3,5 m entre fileiras. As plantas propagadas via seminífera sofreram sexagem assim que detectava-se o primeiro botão floral. Após 136 dias (4,5 meses) foram feitas avaliações em comparação com plantas obtidas via seminífera, de mesma idade.

As características morfológicas avaliadas nas plantas no campo foram: diâmetro do caule, diâmetro da copa, altura das plantas, altura de inserção do primeiro fruto, tamanho do painel, número de folhas, número de flores e frutos. Avaliou-se também o número de dias para início de florescimento.

A determinação do diâmetro do caule foi feita a 10 cm de altura em relação ao solo, com a utilização de um paquímetro (Eletromir Digital Caliper). O diâmetro da copa foi medido com uma trena graduada de 2 m, na porção de maior extremidade da copa da planta. A altura da planta foi determinada medindo-se a distância entre o ápice da planta e a base do colo, com o auxílio de uma trena. A altura de inserção do primeiro fruto foi feita com uma trena, medindo-se a distância entre a base do colo e o início da inserção do primeiro fruto, considerando-se o fruto da parte inferior da planta. O tamanho do painel, que refere-se à altura de carga produtiva do mamoeiro foi determinada com o auxílio de uma trena. O número de folhas, de flores e frutos foi determinado a partir da contagem total por planta. O número de dias para o florescimento foi obtido por meio da observação do início dos primeiros botões florais.

As análises de variância e regressão foram aplicadas aos dados de enraizamento e feitas com auxílio de programa Genes (Cruz, 2006). As avaliações morfológicas de campo foram feitas usando o teste t de Student, no programa BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007).

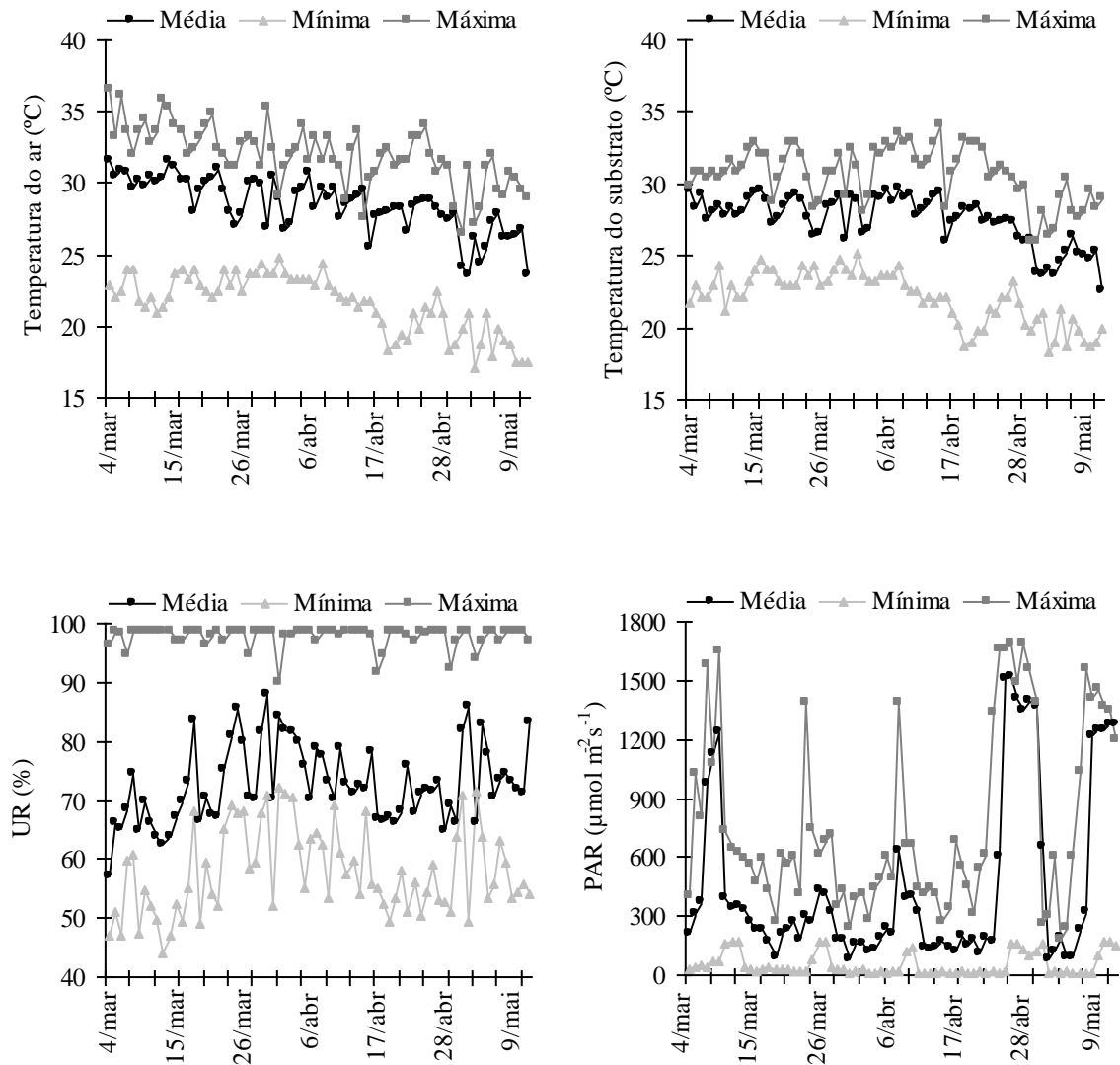
## Experimento 2

No segundo experimento foi efetuada a poda no caule do mamoeiro a 2 m de altura para quebrar a dominância apical, e assim induzir a formação das brotações laterais, conforme Barros et al. (2009). Neste trabalho foram utilizadas plantas matrizes de 36 meses de idade. As estacas foram retiradas das plantas matrizes no dia 04 de março de 2009, após 30 dias da poda. O tamanho das estacas retiradas das plantas matrizes foi de 12,5 a 30 cm de comprimento, com diâmetro de  $1,7 \pm 0,5$ , sendo diferentes do experimento 1, devido à forma que estas plantas matrizes foram conduzidas, ou seja, com podas no caule, enquanto que as plantas do experimento 1 não receberam podas, resultando assim em tamanho e diâmetro diferentes. Semelhante ao primeiro experimento manteve-se duas folhas por estaca, retirando-se os limbos foliares das demais folhas basais, permanecendo 3 cm de pecíolo.

As estacas foram retiradas das plantas matrizes no período da manhã, com cortes bem rentes à base e colocadas em balde com água. Estas estacas foram tratadas no viveiro, à sombra, tendo as suas bases imersas em solução fungicida (Captan:  $4,5 \text{ g L}^{-1}$ ), por um período de 20 minutos. Em seguida, de acordo com cada tratamento, as bases destas foram submetidas à imersão em diferentes concentrações de AIB, durante 20 segundos.

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial  $2 \times 5$ , sendo duas cultivares ('Golden' e 'UENF/Caliman 01') e cinco concentrações de AIB (0; 750; 1500; 2250 e  $3000 \text{ mg L}^{-1}$ ), com três repetições e oito estacas por repetição. Essas concentrações foram diferentes do primeiro experimento em função do baixo enraizamento verificado em estacas de mamoeiro 'Golden' tratadas com AIB até  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ .

As estacas, em um total de 240, foram cultivadas no viveiro, em bandejas brancas com capacidade de 16 L, com 10 furos por  $100 \text{ cm}^2$  no substrato areia, aonde permaneceram por 70 dias. Todos os demais procedimentos relacionados à aplicação de fungicida e soução de Hoagland e Arnon (1950) foram semelhantes aos adotados no primeiro experimento. Durante este período, a temperatura do ar, do substrato, a radiação fotossinteticamente ativa e a umidade relativa do ar foram monitoradas pelo sensor WatchDog Datalogger (Figura 1).



**Figura 1** – Temperatura do ar e do substrato, umidade relativa (UR) e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) mensuradas diariamente pelo sensor WatchDog Datalogger, durante o período de 70 dias de cultivo das plantas em bandejas na casa de vegetação da empresa Caliman Agrícola S/A, no ano de 2009.

As mudas foram avaliadas após 70 dias de cultivo no substrato, sendo a porcentagem de enraizamento determinada em relação ao número inicial de estacas utilizadas no experimento. As outras variáveis morfológicas analisadas, em todas as estacas foram: altura das plantas, diâmetro do caule, número de folhas, volume de raiz. As medidas fisiológicas avaliadas foram: Índice SPAD, rendimento quântico máximo do fotossistema II e taxa fotossintética líquida. Todas as medições foram feitas em dois dias, no período da manhã entre 8:00 e 12:00 horas.

Na determinação da altura das mudas, utilizou-se uma régua graduada em centímetro, tomando como referência a distância do colo ao ápice da muda. O diâmetro do caule foi determinado a 3 cm de altura, próximo à região do coleto com o uso de um paquímetro (Eletromir Digital Caliper). O número de folhas foi determinado pela contagem destas. O volume de raiz foi determinado colocando-se as raízes em proveta graduada, contendo um volume conhecido de água, e pela diferença, obteve-se a resposta direta do volume de raízes, em que cada 1 ml corresponde a 1 cm<sup>3</sup>.

A estimativa de intensidade de cor verde foi avaliada com o medidor portátil de clorofila SPAD-502 Chlorophyll Meter (Minolta, Japão) por meio da média de cinco leituras na 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> folhas contadas a partir do ápice.

O rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_{Máx}$ ) foi determinado após a adaptação da 2<sup>a</sup> ou 3<sup>a</sup> folha a partir do ápice ao escuro por 30 minutos com o auxílio de pinças, por meio do fluorímetro modulado MINI-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, GmbH, Alemanha).

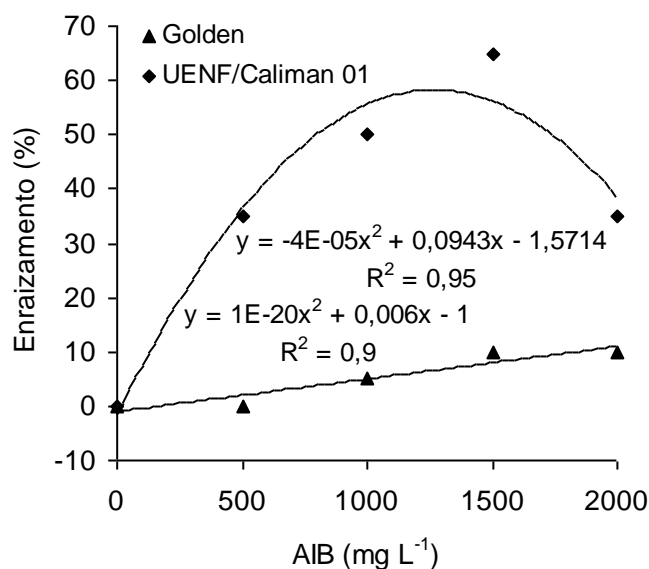
A taxa fotossintética líquida (A) foi determinada na 2<sup>a</sup> ou 3<sup>a</sup> folha contadas a partir do ápice, com o sistema portátil de medição das trocas gasosas modelo LI-6200 (LI-COR, Lincoln, NE, USA) utilizando luz artificial de 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Para as variáveis procedeu-se a análise de variância e posterior teste de média de Tukey a 5% para cultivares e análise de regressão para concentrações de AIB.

Médias de associação foram feitas pela correlação de Pearson entre as variáveis morfológicas e as fisiológicas. As análises estatísticas foram feitas usando o programa Genes (Cruz, 2006).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos diferentes experimentos, a porcentagem de plantas enraizadas foi calculada em função da quantidade total de estacas utilizadas. Com relação ao primeiro experimento o enraizamento das estacas foi abaixo de 10% para o genótipo 'Golden'. A maior porcentagem de enraizamento para o genótipo 'UENF/Caliman 01' foi alcançada com o tratamento das estacas com o AIB a 1500 mg L<sup>-1</sup>, correspondendo a 65% (Figura 2).

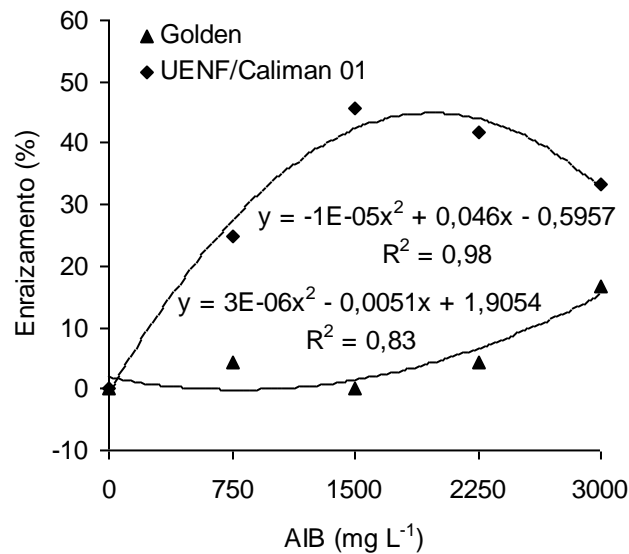


**Figura 2** – Porcentagem de enraizamento de estacas de mamoeiro ‘UENF/Caliman 01’ e ‘Golden’, após 70 dias de cultivo em casa de vegetação com diferentes concentrações de AIB.

No segundo experimento, a maior porcentagem de enraizamento para o genótipo ‘UENF/Caliman 01’ foi de 45,83% no tratamento com o AIB a 1500 mg L<sup>-1</sup>. Para o mamoeiro ‘Golden’ o maior percentual de enraizamento foi de 16,67% com o AIB a 3000 mg L<sup>-1</sup> (Figura 3). Costa e Costa (2003) induziram o enraizamento em estacas de mamoeiro dos genótipos ‘Sunrise Solo’ e ‘Tainung 01’ com a aplicação de uma concentração de AIB a 4000 mg L<sup>-1</sup>, e obtiveram 83% e 85% de enraizamento, respectivamente. Neste caso eles deixaram duas folhas por estaca, e eliminaram os limbos foliares basais, deixando o pecíolo com aproximadamente 10 cm de comprimento. Já quando eles fizeram a eliminação total das folhas basais (limbos foliares + pecíolo) o enraizamento foi de 55% no ‘Sunrise Solo’ e 59% no ‘Tainung 01’. Rankhelawan et al. (1999) obtiveram 83,3% de enraizamento quando trataram as estacas de mamoeiro (*Carica papaya* L.) com AIB a 3000 mg L<sup>-1</sup>.

Relacionando os dois experimentos verifica-se que o tratamento das estacas de mamoeiro ‘UENF/Caliman 01’ com o AIB a 1500 mg L<sup>-1</sup> é o mais apropriado para a indução do enraizamento. Para o ‘Golden’ a concentração máxima de 3000 mg L<sup>-1</sup> utilizada não foi suficiente para promover um bom

enraizamento, desta forma sugere-se em novos experimentos, aumentar a concentração de AIB.



**Figura 3** – Porcentagem de enraizamento de estacas de mamoeiro ‘Golden’ e ‘UENF/Caliman 01’, após 70 dias de cultivo em casa de vegetação com diferentes concentrações de AIB.

As informações a seguir referem-se ao experimento 2:

As condições de ambiente de cultivo das estacas em casa de vegetação foram monitoradas pelo sensor WatchDog Datalogger (Figura 1). A umidade relativa do ar elevada na casa de vegetação foi conseguida com o sistema automático de nebulização intermitente. De acordo com Paiva e Gomes (2001), o uso de um sistema de nebulização é importante para manter a umidade elevada ao redor das estacas, o que diminui a temperatura e reduz a transpiração e a respiração das mesmas, favorecendo o enraizamento, evitando assim a morte por desidratação. A temperatura do substrato nos primeiros 10 dias de cultivo ficou próxima a 30 °C, o que pode ter favorecido o enraizamento, visto que neste período já haviam estacas enraizadas. Os resultados encontrados estão de acordo com Allan (1990), que sugeriram a aplicação de AIB nas estacas, sob nebulização intermitente e com temperatura em torno de 30 °C no substrato.

Ao final de 70 dias de cultivo das estacas em bandejas, foi efetuada a avaliação para a porcentagem de plantas mortas (Tabela 1). Os percentuais de sobrevivência obtidos para ‘Uenf/Caliman 01’ foram superiores ao obtidos no

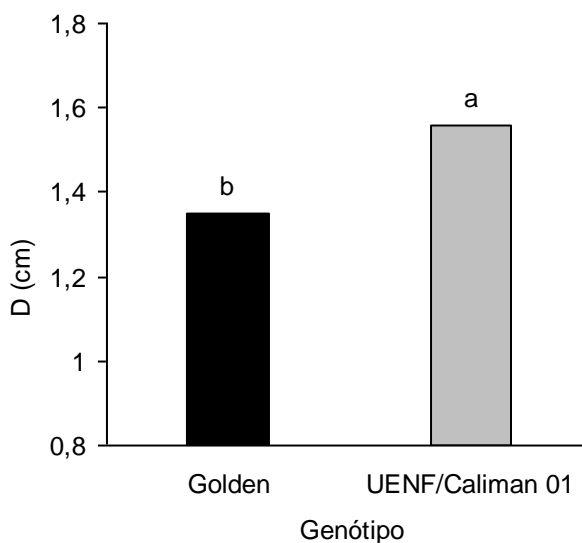


mamoeiro 'Golden'. As perdas de estacas aconteceram em função principalmente do apodrecimento das mesmas em decorrência de contaminações bacterianas e fungicas. Allan (1964, 1990) registrou sobrevivência de 57 a 90% das mudas obtidas para a cultivar 'Hortus Gold', dependendo da época do ano em que as estacas eram colhidas. Allan et al. (2010) reforçaram que um dos maiores problemas à adoção de técnicas de propagação vegetativa por estaquia ou por enxertia continuam sendo os contaminantes, principalmente os bacterianos, que têm levado a perda de muitas mudas.

**Tabela 1** – Porcentagem de estacas mortas de mamoeiro 'Golden' e 'UENF/Caliman 01', após 70 dias de cultivo em casa de vegetação com diferentes concentrações de AIB. Para o cultivo foram utilizadas 24 estacas por tratamento

		% de estacas mortas									
		Golden					UENF/Caliman 01				
AIB mgL <sup>-1</sup>		0	750	1500	2250	3000	0	750	1500	2250	3000
Total		14	13	14	15	14	6	4	5	5	9
%		58,33	54,17	58,33	62,5	58,33	25	16,67	20,83	20,83	37,5

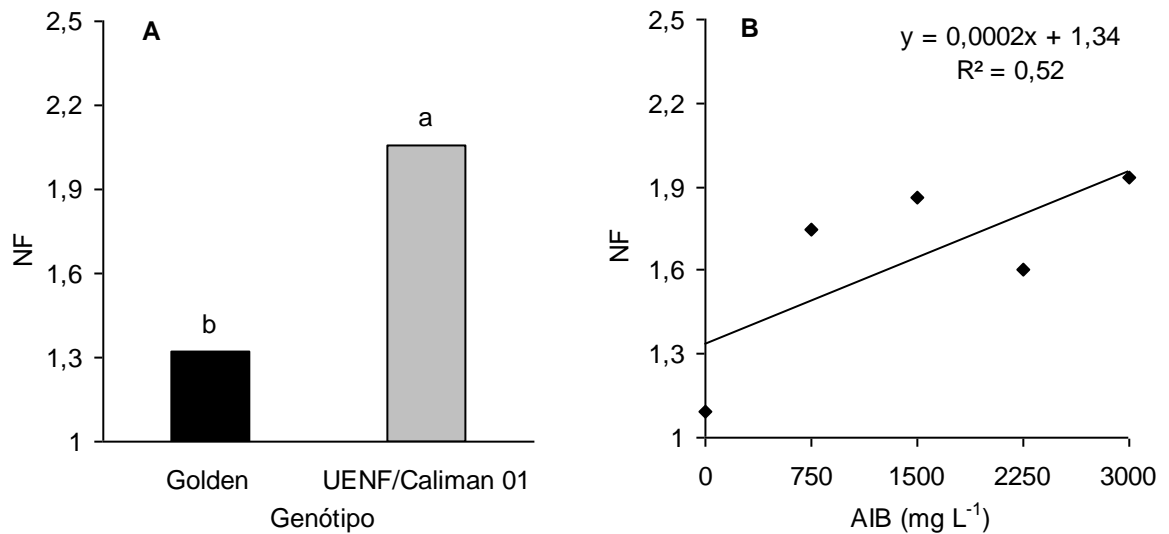
O diâmetro do caule após 70 dias de cultivo apresentou diferença em relação ao tipo de genótipo utilizado, com valores médios de 1,35 cm para o 'Golden' e 1,56 cm para o 'UENF/Caliman 01' (Figura 4). Allan (1964) citou que estacas de mamoeiro enraizam bem com o diâmetro em torno de 2,5 cm. Nestas condições citadas por Allan, não foi possível neste trabalho encontrar brotações laterais (estacas) em mamoeiro podado que atingisse este diâmetro.



**Figura 4** – Diâmetro (D) das estacas de mamoeiro ‘Golden’ e ‘UENF/Caliman 01’, após 70 dias de cultivo em casa de vegetação com diferentes concentrações de AIB. Médias seguidas por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

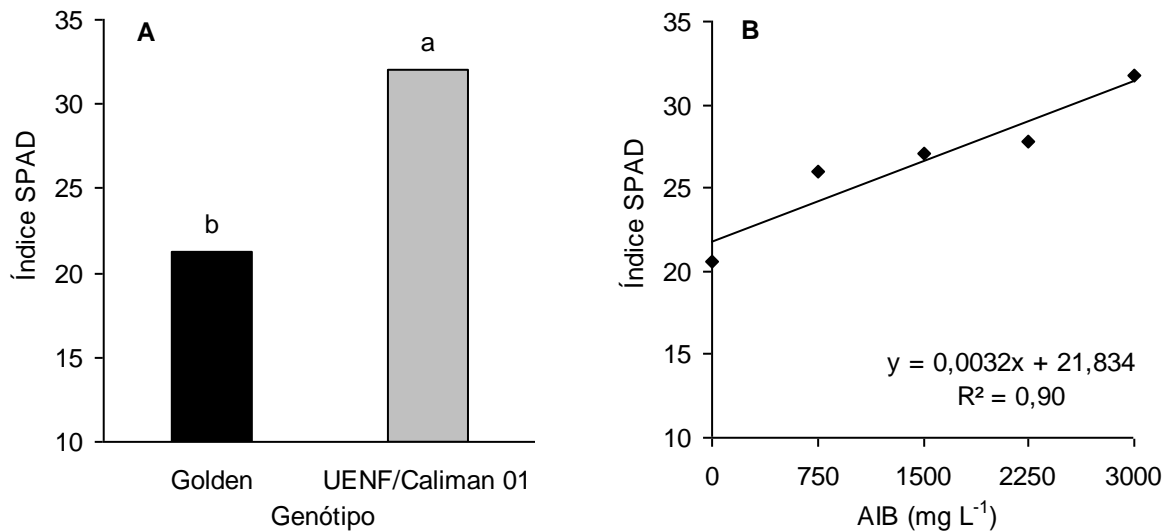
Durante o período de cultivo das plantas ocorreu a queda das folhas expandidas que estavam presentes na etapa inicial de enraizamento, e foram assim surgindo novas folhas conforme os tratamentos. As médias para o número de folhas foram obtidas com base nas estacas sobreviventes. Houve maior formação de folhas em mamoeiro ‘UENF/Caliman 01’ (Figura 5A), o que favorece ao enraizamento. Constatou-se também acréscimo na formação de folhas à medida que eram aumentados os níveis de AIB (Figura 5B). As estacas sem folhas não apresentaram formação de raízes, tendo como consequência a não sobrevivência das mesmas.

O efeito benéfico da presença das folhas em estacas para o enraizamento é atribuído à produção de auxinas e co-fatores, que são transportados para a base das estacas e pelo processo da fotossíntese, responsável pela síntese de carboidratos necessários como fonte de energia para formação e crescimento das raízes (Davis, 1988). Souza et al. (1992) citaram que a emissão foliar é um excelente indício da capacidade de enraizamento da estaca, o que contribuiu para o aumento do número de raízes adventícias em estacas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) tratadas com 500 mg L<sup>-1</sup> de AIB.



**Figura 5** – Número de folhas (NF) em função dos genótipos ‘Golden’ e ‘UENF/Caliman 01’ (A) e em função das diferentes concentrações de AIB (B), após 70 dias de cultivo em casa de vegetação. Médias seguidas por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

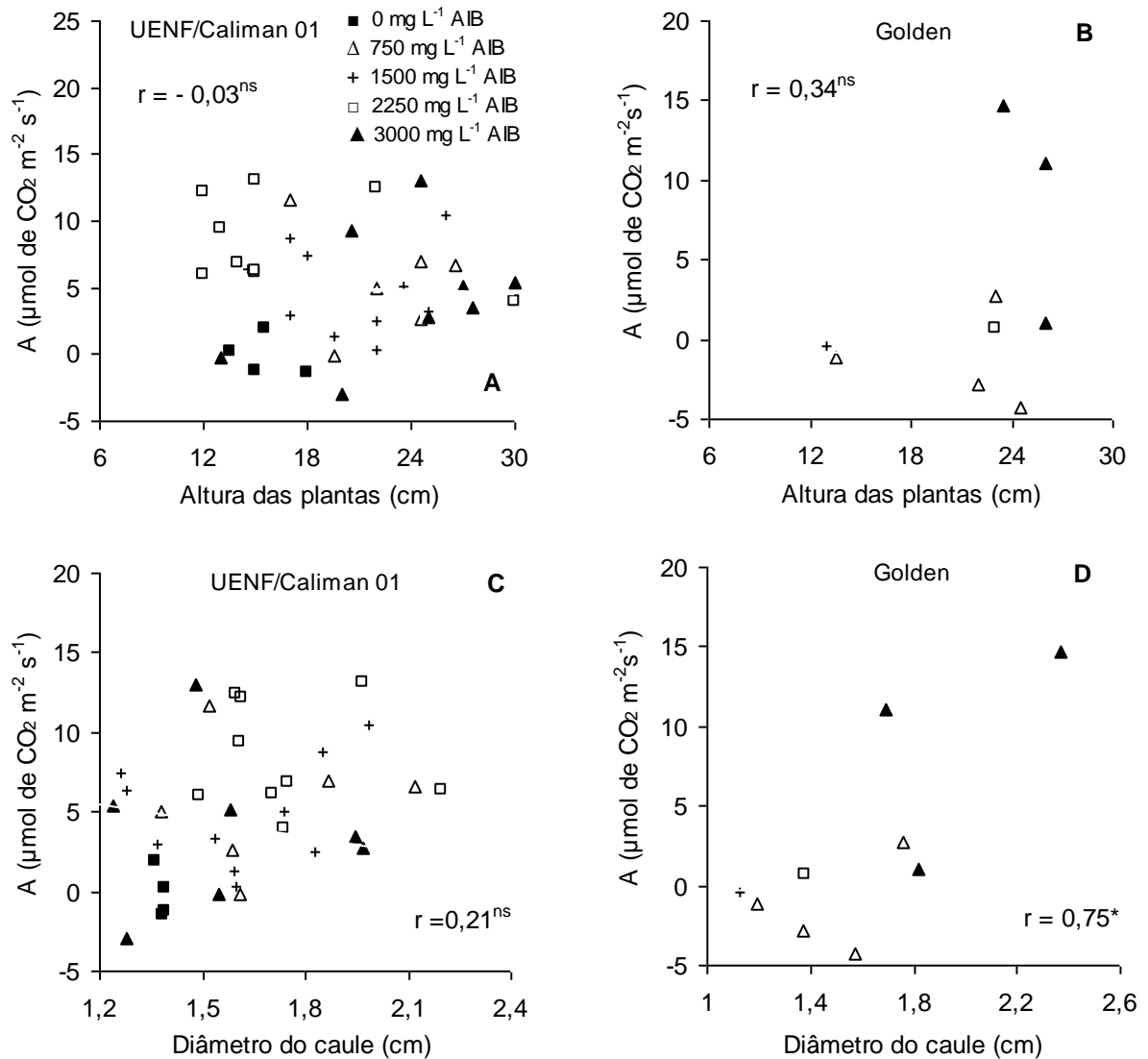
Na Figura 6A, os resultados demonstraram que os valores do índice SPAD foram maiores em mamoeiro ‘UENF/Caliman 01’ do que no mamoeiro ‘Golden’, isso é uma característica própria desse genótipo que surgiu de uma mutação do genótipo ‘Solo’, apresentando uma coloração verde-amarelada das folhas que deram origem ao seu nome. O aumento da concentração de AIB aplicada nas estacas favoreceu a um maior valor de índice SPAD para o mamoeiro, não havendo distinção entre os genótipos (Figura 6B). Segundo Torres-Netto et al. (2002), os valores elevados do índice SPAD indicam uma ótima disponibilidade de N no tecido foliar, bem como excelente quantidade de pigmentos fotossintéticos. De acordo com Correia et al., (2005), o aumento na disponibilidade de nitrogênio normalmente traz como consequência efeitos positivos sobre a taxa de assimilação de carbono, já que esse nutriente faz parte dos principais componentes do sistema fotossintético, tais como clorofilas, Rubisco (ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxigenase) e PEPcase (fosfoenolpiruvato carboxilase).



**Figura 6** – Estimativa do índice SPAD em função dos genótipos ‘Golden’ e ‘UENF/Caliman 01’ (A), e em função das diferentes concentrações de AIB (B), após 70 dias de cultivo em casa de vegetação. Médias seguidas por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observa-se na Figura 7, que não houve correlação entre fotossíntese líquida e a altura das plantas, tanto em mamoeiro ‘UENF/Caliman 01’ (Figura 7A), quanto em mamoeiro ‘Golden’ (Figura 7B), mostrando que as estacas de tamanho entre 12,5 a 30 cm não influenciaram no enraizamento, ou seja, promoveram a fotossíntese independentemente do tamanho. Os resultados encontrados estão em conformidade com Allan (1964), que citou que estacas de mamoeiro enraízam bem com tamanho entre 12,7 e 30,5 cm. Entretanto, estes resultados não estão de acordo com Hartmann et al. (2011), onde citaram que o comprimento das estacas é um fator de grande importância no desenvolvimento do sistema radicular adventício, sendo que estacas maiores apresentam quantidades maiores de reservas nutritivas, as quais podem ser translocadas para a base da estaca e auxiliar na formação das raízes. Nicoloso et al (2001) reforçaram a tese que a resposta em relação ao tamanho da estaca no enraizamento e desenvolvimento da muda é dependente da espécie vegetal. Estes autores concluíram que o tamanho variado das estacas de Ginseng brasileiro não afetou a porcentagem de enraizamento. Isto explica os resultados encontrados neste trabalho para o enraizamento das estacas de mamoeiro. O diâmetro do caule influenciou na taxa

fotossintética para o mamoeiro ‘Golden’ havendo uma correlação positiva (Figura 7D), já para o mamoeiro ‘UENF/Caliman 01’ a correlação foi negativa.

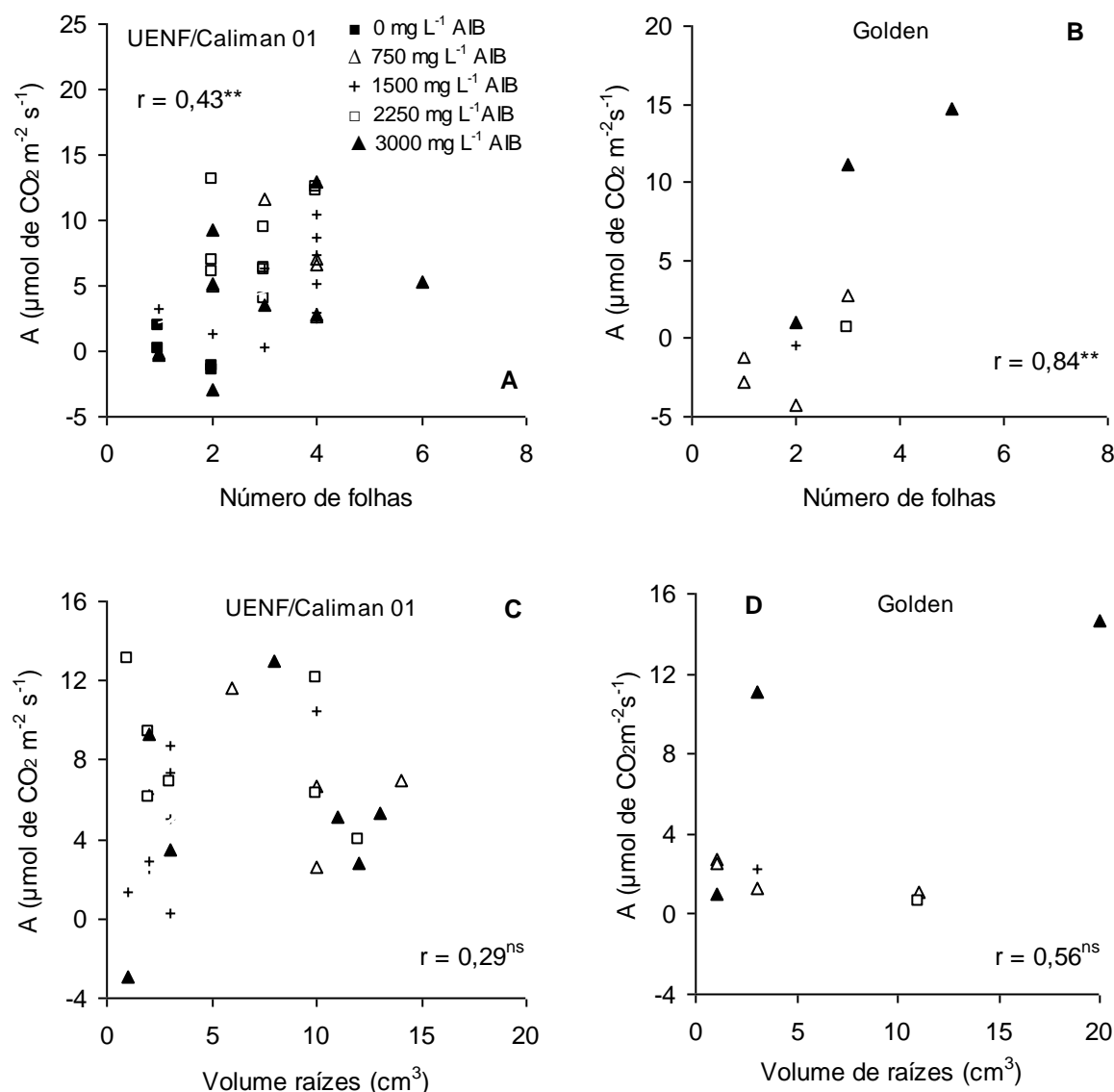


**Figura 7** – Correlação da fotossíntese líquida (A) e a altura das plantas de mamoeiro ‘UENF/Caliman 01’ (A) e ‘Golden’ (B), e correlação da (A) e o diâmetro do caule de mamoeiro ‘UENF/Caliman 01’ (C) e ‘Golden’ (D), após 70 dias de cultivo em casa de vegetação.

A taxa fotossintética líquida não se mostrou relacionada com o volume da raiz (Figura 8C e D). Este fato mostra que uma pequena quantidade de raízes formadas nas estacas do mamoeiro foi suficiente para manter um estado hídrico adequado, e desta maneira manter os estômatos abertos para um melhor acesso do CO<sub>2</sub> aos sítios de carboxilação da Rubisco. Estas condições favoráveis do

sistema radicular em comparação com a fotossíntese são consideradas boas, o que permitirá no transplântio o maior pegamento das mudas.

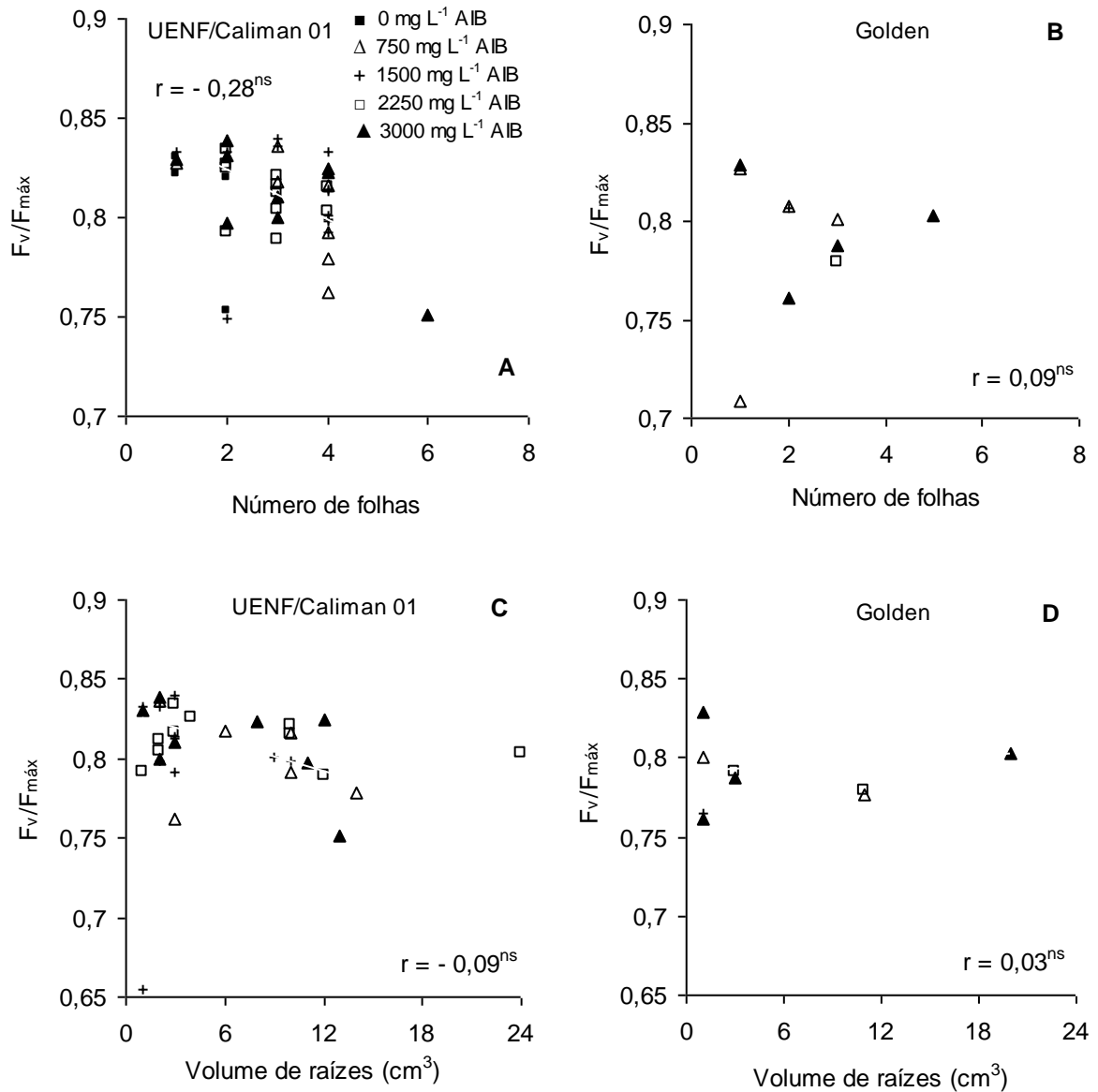
Analisando o número de folhas verifica-se que houve uma correlação positiva com a fotossíntese líquida para os genótipos 'UENF/Caliman 01' (Figura 8A) e 'Golden' (Figura 8B). Os resultados mostram que a quantidade de folhas influenciou a fotossíntese líquida. Assim sendo, a taxa fotossintética é mais elevada nas estacas com número maior de folhas, o que reflete na resposta rizogênica. O efeito das folhas é explicado pela continuidade da fotossíntese na estaca, fornecendo carboidratos, fitorreguladores e outras substâncias necessárias para o estímulo e crescimento das raízes adventícias (Hartmann et al., 2011). As folhas são o principal órgão fotossintético (Taiz e Zeiger, 2009). Dessa forma, para aumentar a absorção de luz e maximizar o ganho total de carbono, as folhas sofrem alterações morfológicas e fisiológicas (Osunkoya et al., 1994). Como por exemplo, a área foliar (folhas mais finas e maiores), a alocação de biomassa nas folhas (Poorter, 1999).



**Figura 8** – Correlação da fotossíntese líquida (A) e o número de folhas de mamoeiro ‘UENF/Caliman 01’ (A) e ‘Golden’ (B) e correlação da (A) e o volume de raízes de mamoeiro ‘UENF/Caliman 01’ (C) e ‘Golden’ (D), após 70 dias de cultivo em casa de vegetação.

Para o rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_{m\acute{a}x}$ ) verifica-se que não houve relação direta com o número de folhas (Figura 9A e B) e com o volume de raiz (Figura 9C e D). Segundo Bolhàr-Nordenkampf et al. (1989), uma relação entre 0,75 a 0,85 é considerada ótima, indicando que a planta não está sob estresse. Neste trabalho verifica-se que independente da quantidade de folhas e o volume de raiz, houve uma eficiência boa na utilização de energia luminosa, pois quase todas as plantas apresentaram o  $F_v/F_{m\acute{a}x}$  entre 0,75 e 0,85. De acordo com Critchley (1998), em folhas de pleno sol estes valores estão próximos a 0,8, e em folhas de sombra estão sempre entre 0,83 e 0,85. O autor

relata que, em valores abaixo de 0,725, as folhas foram certamente submetidas a danos fotoinibitórios. Reis e Campostrini (2008) ao estudarem o mamoeiro adulto do grupo formosa cultivado em condições de campo, em pleno sol, encontraram valores da relação  $F_v/F_{m\acute{a}x}$  entre 0,78 e 0,83.



**Figura 9** – Correlação do rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_{m\acute{a}x}$ ) e o número de folhas de mamoeiro ‘UENF/Caliman 01’ (A) e ‘Golden’ (B) e correlação do ( $F_v/F_{m\acute{a}x}$ ) e o volume de raízes de mamoeiro ‘UENF Caliman 01’ (C) e ‘Golden’ (D), após 70 dias de cultivo em casa de vegetação.



As informações a seguir referem-se ao experimento 1:

Plantas enraizadas do primeiro experimento que foram levadas a campo em comparação com plantas obtidas via seminífera apresentaram, após 4,5 meses, características conforme Tabelas 2 e 3. Todas as avaliações foram feitas considerando 15 plantas por cada tipo de propagação.

Apesar das mudas de estaquia apresentarem maior tamanho ao serem levadas a campo, estas apresentaram menor altura após 4,5 meses no campo (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com encontrados por Allan (1964, 1967) para plantas obtidas por estaquia e por vários outros autores por microestaquia (Drew, 1987; Chan e Teo, 2002; May et al., 2007; May et al., 2009).

O diâmetro das plantas obtidas por estaquia foi menor em relação às plantas propagadas via seminífera aos 4,5 meses (Tabela 2). Apesar disto, o diâmetro da copa das plantas foi semelhante para os dois tipos de propagação (Tabela 2), a semelhança do verificado por Katoh e Ooishi (2003) para a variedade 'Taino 02'. Esta situação de menor diâmetro de caule e mesmo diâmetro da copa a princípio indica maior fragilidade das plantas por estaquia, no que se refere à sustentação do seu próprio peso. No entanto, esta aparente desvantagem pode ser compensada pela menor altura de inserção dos primeiros frutos e menor tamanho do painel (Tabela 2). Desta forma, o peso dos frutos tende a ficar melhor distribuído próximo ao solo, gerando mais estabilidade às plantas.

**Tabela 2** – Comparativo das características morfológicas entre as formas de propagação por estaquia e seminífera de mamoeiro 'UENF Caliman 01', em nível de campo. Altura de plantas (AP) no plantio e depois de 4,5 meses de campo. Diâmetro (D) do caule e da copa, altura de inserção do primeiro fruto (AIPF) e altura do painel (ADP), após 4,5 meses de campo

Formas de propagação	AP (cm)		D (cm)		AIPF <sup>1/</sup> (cm)	ADP <sup>1/</sup> (cm)
	Plantio <sup>1/</sup>	4,5 meses <sup>1/</sup>	Caule <sup>1/</sup>	Copa <sup>1/</sup>		
Estaquia	21,3 ± 0,91	67,2 ± 2,75	6,62 ± 0,25	187,33 ± 9,91	25,6 ± 2,25	41,6 ± 3,12
Seminífera	9,27 ± 0,28	126,8 ± 2,2	8,33 ± 0,29	179,47 ± 3,75	68,13 ± 1,39	58,67 ± 2,59
p valor <sup>2/</sup>	< 0,0001	< 0,0001	0,0001	0,4677	< 0,0001	0,0002

<sup>1/</sup> Média ± erro padrão da média (n = 15 plantas); <sup>2/</sup> Significância do teste t de Student.

Nos trabalhos de estaquia realizados por Allan (1964, 1990) e por Katoh e Ooishi (2003) e nos de microestaquia realizados por vários autores (Chan e Teo, 2002; Zaidan, 2002; May et al., 2007; May et al., 2009) também se verificou menor altura de inserção do primeiro fruto das plantas por estaquia em relação ao processo seminífero. Isto aliado ao fato das plantas por estaquia apresentarem menor tempo para florescimento (Tabela 3) (Allan, 1964; Allan 1967), trazem ao processo, precocidade na produção.

Cabe ressaltar que todas as plantas provindas de estaquia já estavam com flores ao serem transplantadas no campo, e à medida que estas cresciam, novas flores eram emitidas. A altura média de inserção do primeiro fruto foi de 25,6 cm nas plantas por estaquia e 68,13 cm no processo por via seminífera. A redução da inserção no caule dos primeiros botões florais torna-se importante, pois a obtenção de plantas com os primeiros frutos mais baixos permite uma melhor colheita durante períodos mais prolongados da cultura (Silva et al., 2010).

A produção de folhas, flores e frutos por planta foi ligeiramente menor nas plantas por estaquia (Tabela 3), o que concorda com resultados encontrados por Katoh e Ooishi (2003). Isto poderá resultar em menor produtividade das plantas por propagação vegetativa em relação às plantas por via seminífera (Katoh e Ooishi, 2003; May et al., 2007). May et al. (2009), ao contrário, não verificaram diferença de produtividade em relação aos dois processos e Allan (1990) verificou maior produtividade em plantas por estaquia.

É importante visualizar que as plantas por estaquia apresentaram bom vigor no desenvolvimento a campo, e que pelo fato de se usar apenas uma planta por cova (hermafrodita) pode trazer ganhos substanciais na propagação da cultura. No entanto, um outro fator determinante no processo de estaquia são os problemas com vírus do mosaico do mamoeiro (Allan et al., 2010), o que é muito real para as condições de cultivo no estado do Espírito Santo. Portanto, um cuidado especial deve ser tomado ao se preparar as mudas.

**Tabela 3** – Comparativo das características morfológicas entre as formas de propagação por estaquia e seminífera de mamoeiro ‘UENF Caliman 01’, em nível de campo. Tempo de iniciação do florescimento (TIF). Número de folhas (NFo), número de flores (NFI) e número frutos (NFr), após 4,5 meses de campo

Formas de propagação	TIF <sup>1/</sup> (dias)	NFo <sup>1/</sup>	NFI <sup>1/</sup>	NFr <sup>1/</sup>
Estaquia	0 ± 0	21,33 ± 0,99	12,33 ± 0,42	9,67 ± 0,46
Seminífera	90,6 ± 1,23	25,2 ± 0,57	15,4 ± 0,45	12,8 ± 0,77
p valor <sup>2/</sup>	< 0,0001	0,0027	< 0,0001	< 0,0001

<sup>1/</sup> Média ± erro padrão da média (n = 15 plantas); <sup>2/</sup> Significância do teste t de Student.

## CONCLUSÕES

- Em estacas de mamoeiro ‘Golden’, em novos estudos, e para a indução de enraizamento, indica-se aumentar a concentração de AIB acima de 3000 mg L<sup>-1</sup>;
- Estacas de mamoeiro ‘Uenf/Caliman 01’ enraizaram 65% quando tratadas com AIB a 1500 mg L<sup>-1</sup>;
- Poucas raízes nas estacas do mamoeiro são suficientes para manter um bom estado hídrico, uma boa taxa fotossintética, uma significativa quantidade de clorofilas nas folhas e com boa eficiência na utilização de energia luminosa;
- Plantas de mamoeiro propagadas por estaquia, quando cultivadas no campo apresentaram iniciação precoce de flores, menor altura de inserção dos primeiros frutos e baixa estatura, o que antecipa e facilita a colheita.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agriannual (2009) *Anuário da agricultura brasileira*. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 496p.
- Allan, P. (1964) Papaws grown from cuttings. *Farming in South Africa*, 39 (11): 35-40.
- Allan, P. (1967) Papaws research at Pietermaritzburg: production from cuttings. *Farming in South Africa*, 42 (11): 5-21.

- Allan, P. (1990) Vegetative propagation and production of 'Honey Gold' papayas. *Acta Horticulturae*, 269: 105-111.
- Allan, P., Clark, C., Laing, M. (2010) Grafting papayas (*carica papaya* L.). *Acta Horticulturae*, 851: 253-258.
- Arango, L.V., Rezende, C.R., Carvalho, S.P. (2008) Identificação antecipada do sexo do mamoeiro pelos caracteres físicos das sementes e padrões isoenzimáticos das mudas. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuária*, 9 (1): 22-29.
- Ayres, M., Ayres Júnior, M., Ayres, D.L., Santos, A.A.S. (2007) *Bioestat 5.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biomédicas*. 5. ed. Belém: Ong Mamirauá, 324p.
- Barros, F.L.S., Schmildt, E.R., Amaral, J.A.T., Coelho, R.I. (2009) Influência da poda em diferentes alturas do mamoeiro 'Golden'. *Revista Ciência Agronômica*, 40 (4): 596-601.
- Biasi, L.A. (1996) Emprego do estiolamento na propagação de plantas. *Ciência Rural*, 26 (2): 309-315.
- Bolhàr-Nordenkamph, H.R. Long, S.P., Baker, N.R., Öquist, G., Schreiber, U., Lechner, E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*, 3 (4): 497-514.
- Chan, L.K., Teo, C.K.H. (2002) Micropropagation of Eksotika, a malaysian papaya cultivar, and the field performance of the tissue culture derived clones. *Acta Horticulturae*, 575: 99-105.
- Correia, C.M., Pereira, J.M.M., Coutinho, J.F., Bjorn, L.O., Torres-Pereira, J.M.G. (2005) Ultraviolet-B radiation and nitrogen affect the photosynthesis of maize: a Mediterranean field study. *European Journal of Agronomy*, 22 (3) 337-347.
- Costa, A.F.S., Costa, A.N. (2003) Produção de mudas clonais de mamoeiro. *Anais do papaya Brasil: Qualidade do mamão para o mercado interno*, 1, Vitória: Incaper, p. 317-320.
- Costa, A.F.S., Pacova, B.E.V. (2003) Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. In: Martins, D.S., Costa, A.F.S. (eds.) *A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção*. Vitória: Incaper, p. 59-102.
- Critchley, C. (1998) Photoinhibition. In: Raghavendra, A.S. (ed.) *Photosynthesis: A comprehensive treatise*. Cambridge: Cambridge University Press, p.264-272.
- Cruz, C.D. (2006) *Programa GENES: biometria*. Viçosa: Editora UFV, 382p.

- Davis, T.D. (1988) Photosynthesis during adventitious rooting. *In*: Davis, T.D., Haissig, B.E., Sankhla, N. (eds.) *Adventitious root formation in cuttings*. Portland: Dioscorides Press, p. 214-234.
- Drew, R.A. (1987) The effects of medium composition and conditions on *in vitro* initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Horticultural Science*, 62 (4): 551-556.
- Fachinello, J.C., Hoffmann, A., Nachtigal, J.C., Kersten, E. (2005) Propagação vegetativa por estaqueia. *In*: Fachinello, J.C., Hoffmann A., Nachtigal J. C. (eds.). *Propagação de plantas frutíferas de clima temperado*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 69-109.
- Grana Jr., J.F. (2000) *Fitorreguladores na quebra da dominância apical e no enraizamento das brotações laterais em mamoeiro (Carica papaya L.)*. Tese (Mestrado em Horticultura) - Botucatu - SP, Universidade Estadual Paulista - UNESP, 68p.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies Jr, F.T., Geneve, R.L. (2011) *Hartmann & Kester's Plant propagation: principles and practices*. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall, 928p.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. (1950) *The water culture method for growing plants without soil*. England: California Agricultural Experiment Station, 32p.
- Hoffmann, A., Chalfun, N.N.J., Antunes, L.E.C., Ramos, J.D., Pasqual, M., Rezende, E., Silva, C.R. (1996) *Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas*. Lavras: UFLA/FAEPE, 319p.
- Kato, F., Oishi, A. (2003) A study on juvenility and nodal aging of papaya by vegetative propagation. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 72 (2): 93-98.
- Marin, S.L.D. (2001) *Melhoramento genético do mamoeiro (Carica papaya L.): habilidade combinatória de genótipos dos grupos 'Solo' e 'Formosa'*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 117p.
- May, C.T., Espadas, F.G., Contreras, G.F.M., Santamaría, J.M. (2009) Acclimatization, rooting and field establishment of micropropagated papaya plants. *Acta Horticulturae*, 812: 373-378.
- May, C.T., Gil, F.E., Contreras, F., Santamaría, J.M. (2007) Field performance of 100% hermaphrodite micropropagated papaya plants. *Acta Horticulturae*, 748: 219-222.
- Nicoloso, F.T., Cassol, L.F., Fortunato, R.P. (2001) Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). *Ciência Rural*, 31 (1): 57-60.

- Osunkoya, O.O., Ash, J.E., Hopkins, M.S., Graham, A.W. (1994) Influence of seed size and seedling ecological attributes on shade-tolerance in northern Queensland. *Journal of Ecology*, 82: 149-163.
- Paiva, H.N., Gomes, J.M. (2001) *Propagação vegetativa de espécies florestais*. Viçosa: UFV, 46p.
- Poorter, L. (1999) Growth responses of 15 rain-forest tree species to a light gradient : the relative importance of morphological and physiological traits. *Functional Ecology*, 13: 396-410.
- Ramkhelawan, E., Baksh, N., Lauckner, B. (1999) Propagation of papaya (*Carica papaya* L.) by *in vivo* methods in Trinidad. *Tropical Agriculture*, 76 (2): 126-130.
- Reis, F.O., Campostrini, E. (2008) Trocas gasosas e eficiência fotoquímica potencial em mamoeiro do grupo 'Formosa' cultivado em condições de campo. *Bragantia*, 67 (4): 815-822.
- Silva, M.M., Broetto S.G., Valbão, S.C., Costa, A.F.S., Silva D.M. (2010) Características vegetativas e de frutos de mamoeiros obtidos por seleção massal. *Semina: Ciências Agrárias*, 31 (1): 29-38.
- Simão, S. (1998) Mamão. In: Simão, S. *Tratado de Fruticultura*. Piracicaba: Fealq, p. 541-575.
- Souza, F.X., Almeida, F.C.G., Correa, M.P.F., Almeida, F.A.G. (1992) Enraizamento de estacas de caule juvenil de cajueiro 'Anão-precoce' (*Anacardium occidentale* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 14 (3): 59-65.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2009) *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 848p.
- Torres Netto, A., Campostrini, E., Oliveira, J.G., Yamanishi, O.K. (2002) Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 14 (3): 203-210.
- Xavier, A., Comércio, J. (1996) Microestaquia: uma maximização de Eucaliptos. *Revista Árvore*, 20 (1): 9-16.
- Zaidan, H.A. (2002) *Micropropagação e uso de marcadores moleculares na determinação do sexo do mamoeiro*. Tese (Doutorado em Agronomia) - Jaboticabal - SP, Universidade Estadual de São Paulo - UESP, 154p.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho buscou-se o aprimoramento das técnicas de produção de mudas do mamoeiro, e para isto foram realizados dois experimentos distintos, por micropropagação e estaquia. No primeiro experimento referente à micropropagação, o objetivo foi avaliar os aspectos ecofisiológicos da multiplicação *in vitro* do mamoeiro 'Golden', relacionados à fotossíntese, fluorescência, relações hídricas, aos teores de macronutrientes, índice SPAD e ao crescimento, em resposta a utilização de diferentes qualidades de luz, tipos de sistema e concentrações de sacarose. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, e três plantas por repetição em um esquema de parcelas subdivididas constituídas de qualidades de luz (branca e vermelha com FFF de  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), tipos de sistema (fechado e ventilado) e concentrações de sacarose no meio de cultivo (10; 20; 30 e  $40 \text{ g L}^{-1}$ ). As avaliações foram efetuadas ao final de 21 dias do sexto subcultivo. No segundo método de propagação, o de estaquia, objetivou-se avaliar a fotossíntese, fluorescência, índice SPAD e o crescimento de estacas de mamoeiro 'Golden' e 'UENF/Caliman 01' em resposta a aplicação de AIB na indução do enraizamento, bem como avaliar as características morfológicas das plantas em campo. O experimento inicial foi montado em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5, sendo duas cultivares ('Golden' e 'UENF/Caliman 01') e cinco concentrações de AIB (0; 500; 1000; 1500 e  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ) com três repetições e oito estacas por repetição. De acordo com

os tratamentos, as estacas de mamoeiro 'UENF/Caliman 01' tratadas com AIB proporcionaram melhor enraizamento, destacando-se a concentração de 1500 mg L<sup>-1</sup>, sendo portanto, estas mudas transplantadas no campo, as quais foram comparadas morfológicamente com as plantas propagadas via semínifera de mesma idade, no plantio e após 4,5 meses do plantio. Ainda foi montado outro experimento de estaquia com as cultivares 'UENF/Caliman 01' e 'Golden', nas mesmas condições experimentais e de cultivo do experimento anterior, sendo agora aumentadas as concentrações de AIB (0; 750; 1500; 2250 e 3000 mg L<sup>-1</sup>) na tentativa de melhorar o enraizamento, principalmente do mamoeiro 'Golden'. As avaliações relacionadas à fotossíntese, fluorescência da clorofila a, índice SPAD, e ao crescimento foram feitas após 70 dias de cultivo.

De acordo com as avaliações conclui-se que:

- O cultivo *in vitro* sob luz vermelha promoveu maior crescimento das plântulas;
- A menor taxa de perda de água das plântulas foi obtida no sistema ventilado, podendo relatar que tais plântulas podem ter melhor adaptação para estas condições, quando forem cultivadas sob condição *ex vitro*;
- A eficiência fotoquímica das plântulas nas condições de cultivo foi baixa. Sugere-se desta forma em novos experimentos usar a concentração de sacarose a 10 g L<sup>-1</sup> e aumentar o nível de irradiância (luz vermelha) da sala de cultivo para estimular o metabolismo autotrófico;
- Nas condições deste experimento, o incremento na produção de biomassa seca do mamoeiro foi devido exclusivamente à fonte exógena de carbono por meio da adição de sacarose no meio de cultivo, uma vez que não houve assimilação fotossintética do carbono. A baixa assimilação fotossintética do carbono foi devido ao comprometimento na capacidade fotoquímica, causado pelo baixo FFF na sala de cultivo;
- Em estacas de mamoeiro 'Golden', em novos estudos, e para a indução de enraizamento, indica-se aumentar a concentração de AIB acima de 3000 mg L<sup>-1</sup>;
- Estacas de mamoeiro 'Uenf/Caliman 01' enraizaram 65%, quando tratadas com AIB a 1500 mg L<sup>-1</sup>;



- Poucas raízes nas estacas do mamoeiro são suficientes para manter um bom estado hídrico, uma boa taxa fotossintética, uma significativa quantidade de clorofilas nas folhas e com boa eficiência na utilização de energia luminosa;
- Plantas de mamoeiro propagadas por estaquia, quando cultivadas no campo apresentaram iniciação precoce de flores, menor altura de inserção dos primeiros frutos e baixa estatura, o que antecipa e facilita a colheita.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afreen, F., Zobayed, S.M.A. Kozai, T. (2002) Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. *Annals of Botany*, 90: 11-19.
- Agnihotri, S., Singh, S.K., Jain, M., Sharma, M., Sharma, A.K., Chaturvedi, H.C. (2004) *In vitro* cloning of female and male *Carica papaya* through tips of shoots and inflorescences. *Indian Journal of Biotechnology*, 3: 235-240.
- Agrianual (2009) *Anuário da agricultura brasileira*. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 496p.
- Allan, P. (1964) Papaws grown from cuttings. *Farming in South Africa*, 39 (11): 35-40.
- Allan, P. (1967) Papaws research at Pietermaritzburg: production from cuttings. *Farming in South Africa*, 42 (11): 5-21.
- Allan, P. (1990) Vegetative propagation and production of 'Honey Gold' papayas. *Acta Horticulturae*, 269: 105-111.
- Allan, P. (1995) Propagation of 'Honey Gold' papayas by cuttings. Improving the quality of tropical fruits. *Acta Horticulturae*, 370: 99-102.
- Allan, P., Clark, C., Laing, M. (2010) Grafting papayas (*carica papaya* L.). *Acta Horticulturae*, 851: 253-258.
- Allan, P., Macmillan, C.N. (1991) Advances in propagation of *Carica papaya* L. cv. Honey Gold cuttings. *Journal of the Southern African Society for Horticultural Sciences*, 1 (2): 69-72.

- Alves, F.L., Pacova, B.E.V., Galvaes, P.A.O. (2003) Seleção de plantas matrizes de mamão, grupo Solo, para produção de sementes. *In: Martins, D.S., Costa, A.F.S. (eds.) A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção*. Vitória: Incaper, p. 103-114.
- Alves, K.L. (2003) A cultura do mamão *Carica papaya* no mundo, no Brasil e no Estado do Espírito Santo. *In: Martins, D.S., Costa, A.F.S. A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção*. Vitória: Incaper, p. 13-34.
- Anna, W., Young, C.C., An, W., Cy, C. (1999) Effect of photosynthetic foton flux density and sacarose on the photoautotrophy of rose explantes *in vitro*. *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science*. 45 (4): 345-352.
- Aragón, C.E., Escalona, M., Rodriguez, R., Cañal, M.J., Capote, I., Pina, D., González-Olmedo, J. (2010) Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46: 89-94.
- Arango, L.V., Rezende, C.R., Carvalho, S.P. (2008) Identificação antecipada do sexo do mamoeiro pelos caracteres físicos das sementes e padrões isoenzimáticos das mudas. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuária*, 9 (1): 22-29.
- Araújo, A.G.F., Yamanishi, O.K. (2003) Propagação vegetativa do mamoeiro via enxertia: influência do método de garfagem e do tipo e diâmetro do garfo. *Anais do papaya Brasil: Qualidade do mamão para o mercado interno*, 1, Vitória: Incaper, p. 321-323.
- Arigita, L., González, A., Tamés, R.S. (2002) Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 115 : 166-173.
- Ayres, M., Ayres Júnior, M., Ayres, D.L., Santos, A.A.S. (2007) *Bioestat 5.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biomédicas*. 5. ed. Belém: Ong Mamirauá, 324p.
- Badillo, V.M. (1971) *Monografía de la familia Caricaceae*. Maracay: Asociacion de Profesores, Universidad Central de Venezuela, 222p.
- Barboza, S.B.S.C., Ribeiro, D.G., Teixeira, J.B., Portes, T.A., Souza, L.A.C. (2006) Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41 (2): 185-194.
- Barros, F.L.S., Schimdt, E.R., Amaral, J.A.T., Coelho, R.I. (2009) Influência da poda em diferentes alturas do mamoeiro 'Golden'. *Revista Ciência Agrônômica*, 40 (4): 596-601.
- Barrueto Cid, L.P. (2001) A propagação *in vitro* de plantas. O que é isto? *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 3 (19): 16-21.

- Benassi, A.C. (2006) Informes sobre a produção de mamão. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/portal/icNoticiaAberta.asp?idNoticia=14291>, em 22/09/2010, página mantida pela Toda Fruta.
- Bertoloti, G., Gonçalves, A.N. (1980) *Enraizamento de estacas: especificações técnicas para construção do modelo de propagação*. Piracicaba: IPEF, 8p. (circular técnica).
- Biasi, L.A. (1996) Emprego do estiolamento na propagação de plantas. *Ciência Rural*, 26 (2): 309-315.
- Blazich, F.A. (1987) Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. In: Davies, T.D., Haissig, B.E., Sankhla, N. (eds.) *Adventitious root formation in cuttings*. Portland: Dioscorides Press, p. 132-149.
- Bolhàr-Nordenkamph, H.R. Long, S.P., Baker, N.R., Öquist, G., Schreiber, U., Lechner, E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*, 3 (4): 497-514.
- Brainerd, K.E., Fuchigami, L.H. (1981) Acclimatization of aseptically cultured plants to low relative humidity. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 106 (4): 515-518.
- Brapex (2010) O Brasil em destaque. [http://www.brapex.net/index\\_1024.asp](http://www.brapex.net/index_1024.asp), em 20/12/2010, página mantida pela BRAPEX.
- Brscan, I.N. (2009) Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais. Disponível em: [http://www.florestropicais.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=96&catid=4:noticias-flores&Itemid=20](http://www.florestropicais.net/index.php?option=com_content&view=article&id=96&catid=4:noticias-flores&Itemid=20), em 28/11/10, página mantida pela Flores Tropicais.
- Buddendorf-Joosten, J.M.C., Woltering, E.J. (1994) Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 15 : 1-16.
- Campo e Negócios (2010) Manejo e comercialização da produção de mamão. <http://www.revistacampoenegocios.com.br/anteriores/201011/index.php?referencia=reportagemesp01>, em 22/12/2010, página mantida pela Campo e Negócios.
- Campostrini, E., Otoni, W.C. (1996) *Aclimatização de plantas: abordagens recentes*. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/laborato/biodel/abctp25.htm>, em 12/05/2010, página mantida pela ABCTP.
- Campostrini, E., Teixeira, J.B., Cruz, A.R.R., Yamanishi, O.K. (1999) Efeito da concentração de CO<sub>2</sub> e do teor de sacarose no crescimento de plântulas de abacaxi (*Ananas comosus* [L.] Merrill) cultivadas *in vitro*. *Anais do Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal*, 7, Brasília: SBFV, v. 11, p. 33-33.

- Cassells, A.C., Walsh, C. (1994) The influence of gas permeability of the culture lid on calcium uptake and stomatal function in *Dianthus* microplants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37: 171-178.
- Chamovitz, D.A., Deng, X.W., Lam, E. (1996) Light signaling in plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 15 : 455-478.
- Chang, H.S., Chakrabarty, D., Hahn, E.J, Paek, K.Y. (2003) Micropropagation of Calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39 : 129-134.
- Chan, L.K., Teo, C.K.H. (2002) Micropropagation of Eksotika, a Malaysian papaya cultivar, and the field performance of the tissue culture derived clones. *Acta Horticulturae*, 575: 99-105.
- Chutteang, C., Yingjajaval, S., Wasee, S. (2007) Leaf photosynthetic potential of female and hermaphrodite papaya (*Carica papaya* cv. Khaeg Nuan). *Acta Horticulturae*, 740: 197-202.
- Cline, M.G. (1997) Concepts and terminology of apical dominance. *American Journal of Botany*, Ithaca, 84 (9): 1064-1069.
- Correia, C.M., Pereira, J.M.M., Coutinho, J.F., Bjorn, L.O., Torres-Pereira, J.M.G. (2005) Ultraviolet-B radiation and nitrogen affect the photosynthesis of maize: a Mediterranean field study. *European Journal of Agronomy*, 22 (3) 337-347.
- Costa, A.F.S., Costa, A.N. (2003) Produção de mudas clonais de mamoeiro. *Anais do papaya Brasil: Qualidade do mamão para o mercado interno*, 1, Vitória: Incaper, p. 317-320.
- Costa, A.F.S., Martins, D.S., Costa, A.N., Fassio, L.H. (2005) Evolução da cultura e do mercado mundial de mamão. *Anais do Papaya Brasil: Mercado e inovações tecnológicas para o mamão*, 2, Vitória: Incaper, p. 647-652.
- Costa, A.F.S., Pacova, B.E.V. (2003) Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. *In: Martins, D.S., Costa, A.F.S. (eds.) A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção*. Vitória: Incaper, p. 59-102.
- Costa, F.H.S., Pereira, J.E.S., Pasqual, M., Castro, E.M., Santos, A.M. (2009) Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. *Ciência Rural*, 39 (3): 742-748.
- Couvillon, G.A. (1998) Rooting responses to different treatments. *Acta Horticulturae*, Wageningen, 227: 87-196.
- Crespo, L.E.C. (2007) *Cultivo in vitro de cana-de-açúcar (saccharum spp.) em ambientes que favorecem condições heterotróficas e mixotróficas: um estudo relacionado à fotossíntese, à eficiência fotoquímica e às relações hídricas*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 49p.

- Critchley, C. (1998) Photoinhibition. *In: Raghavendra, A.S. (ed.) Photosynthesis: A comprehensive treatise*. Cambridge: Cambridge University Press, p.264-272.
- Cruz, C.D. (2006) *Programa GENES: biometria*. Viçosa: Editora UFV, 382p.
- Dantas, J.L.L., Castro Neto, M.T. (2000). Aspectos botânicos e fisiológicos. *In: Trindade, A.V. (ed.) Mamão. Produção: Aspectos técnicos*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p.11-14.
- Dantas, J.L.L., Dantas, A.C.V.L., Lima, J.F. (2002) Mamoeiro. *In: Bruckner, C.H. (ed.) Melhoria de fruteiras tropicais*. Viçosa: UFV, p.309-349.
- Davis, T.D. (1988) Photosynthesis during adventitious rooting. *In: Davis, T.D., Haissig, B.E., Sankhla, N. (eds.) Adventitious root formation in cuttings*. Portland: Dioscorides Press, p. 214-234.
- Debergh, P.C. (1991) Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 289: 291-300.
- Decetti, S.F.C. (2004) *Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de Annona glabra L.* Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Lavras - MG, Universidade Federal de Lavras, UFLA, 93p.
- Deng, R., Donnelly, D.J. (1993) *In vitro* hardening of red raspberry through CO<sub>2</sub> enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. *Canadian Journal of Plant Science*, 73: 1105-1113.
- De Proft, M.P., Maene, J.L., Debergh, P.C. (1985) Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 65 : 375-379.
- De Riek J, Piqueras A., Debergh P.C (1997) Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 269–278.
- Desjardins, Y., Hdider, C., de Rieck, J. (1995) Carbon nutrition *in vitro*. Regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. *In: Aitken-Christie, J., Kozai, T., Smith, M.A.L. (eds.) Automation and environmental control in plant tissue culture*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 441-471.
- Dousseau, S., Alvarenga, A.A., Castro, E.M., Soares, R.P., Emrich, E.B., Melo, L.A. (2008) Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. *Ciência e Agrotecnologia*, 32 (6): 1694-1700.
- Drew, R.A. (1987) The effects of medium composition and conditions on *in vitro* initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Horticultural Science*, 62 (4): 551-556.

- Drew, R.A. (1988) Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature field-grown trees. *HortScience*, 23 (3) : 609-611.
- Economou, A.S., Read, P.E. (1987) Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. *HortiScience*, 22 (5): 751-754.
- Eliasson, M.K., Beyl, C.A., Barker, P. (1994) *In vitro* responses and acclimatization of *Prunus serotina* with paclobutrazol. *Journal Plant Growth Regulation*, 13: 137-142.
- Erig, A.C., Schuch, M.W. (2005) Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rural*, 35 (4): 961-965.
- Escalona, M., Lorenzo, J.C., Gonzalez, B.L., Danquita, M., Gonzales, J.L., Desjardins, Y., Borroto, C.G. (1999) Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18: 743-748.
- Escalona, M., Samson, G., Borroto, C., Desjardins, Y. (2003) Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*, 39: 651-656.
- Etienne, H., Berthouly, M. (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 215–231.
- Fachinello, J.C., Hoffmann, A., Nachtigal, J.C., Kersten, E. (2005) Propagação vegetativa por estaquia. In: Fachinello, J.C., Hoffmann A., Nachtigal J. C. (eds.). *Propagação de plantas frutíferas de clima temperado*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 69-109.
- FAO (2010) Faostat. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, em 20/12/2010, página mantida pela FAO.
- Felippe, G.M. (1986) Fotomorfogênese. In: Ferri, M.G. (ed) *Fisiologia Vegetal*. 2. ed. São Paulo: EPU, p. 231-280.
- Ferreguetti, G.A. (2003) Caliman 01 - O primeiro híbrido de mamão Formosa brasileiro. *Anais do papaya Brasil: Qualidade do mamão para o mercado interno*, 1, Vitória: Incaper, p.211-218.
- Fráguas, C.B. (2003) *Micropropagacao e aspectos da anatomia foliar da figueira Roxo de Valinhos em diferentes ambientes*. Tese (Mestrado em Fitotecnia) - Lavras - MG, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 110p.
- Fráguas, C.B., Villa, F., Souza, A.V., Pasqual, M., Dutra, L.F. (2003) Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. *Revista Ceres*, 50 (292): 719-726.

- Fuentes, G., Talavera, C., Desjardins, Y., Santamaría, J.M. (2007) Low exogenous sucrose Improves *ex vitro* growth and photosynthesis in Coconut *in vitro* plantlets if grown *in vitro* under high light. *Acta Horticulturae*, 748: 151-156.
- Garcia, R.D.C., Costa, E.B., Loss., W.R. (2003) Custos de produção de mamoeiro. In: Martins, D.S., Costa, A.F.S. (eds.) *A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção*. Vitória: Incaper. p. 443-464.
- George, E.F., Hall, M.A, De Klerk, G.J. (2008) *Plant propagation by Tissue Culture*. 3. ed. Dordrecht: Springer, 501p.
- Giampan, J.S., Cerqueira, T.S., Jacomino, A.P., Rezende, J.A.M., Sasaki, F.M. (2005) Indução de brotos laterais em mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 27 (1):185-187.
- Gomes, A.L. (1987) *Propagação clonal: Princípios e particularidades*. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 69p.
- Grana Jr., J.F. (2000) *Fitorreguladores na quebra da dominância apical e no enraizamento das brotações laterais em mamoeiro (Carica papaya L.)*. Tese (Mestrado em Horticultura) - Botucatu - SP, Universidade Estadual Paulista - UNESP, 68p.
- Grattapaglia, D., Machado, M.A. (1998) Miropropagação. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, p. 183-260.
- Gribaudo, L., Fronda, A.L (1993). Ambientamento delle piante frutticole micropropagate. *Rivista di Frutticoltura*,1: 75-79.
- Gribble, K., Tingle, J., Sarafis, V., Heaton, A., Holford, P. (1998) Position of water in vitrified plants visualized by NMR imaging. *Protoplasma*, 201: 110-114.
- Grigoriadou, K., Leventakis, N. (2003) Comparative use of a commercial bioreactor system and conventional micropropagation for the production of potato microtubers and grape myrtle (*Lagerstroemia indica*) microshoots. *Acta Horticulturae*, 616: 369-373.
- Grout, B.W.W. (1988) Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and stress of transplanting. *Acta Horticulturae*, 230: 129-135.
- Grout, B.W.W., Donkin, M.E. (1987) Photosynthetic activity of cauliflower meristem cultures *in vitro* and at transplanting into soil. *Acta Horticulturae*, 212: 323-327.
- Haissig, B.E. (1982) Carbohydrate and amino acid concentrations during adventitious root primordium development in *Pinus banksiana* (Lam.) cuttings. *Forest Science*, 28 (4): 813-821.



- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies Jr, F.T., Geneve, R.L. (2011) *Hartman & Kester's Plant propagation: principles and practices*. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall, 928p.
- Hazarika, B.N. (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108 (2) : 105-120.
- Hdider, C., Desjardins, Y. (1994) Effects of sucrose on Photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36 (1): 27-33.
- Hinojosa, G.F. (2000) Auxinas. In: Cid, L.P.B. (ed.). *Introdução aos hormônios vegetais*. Brasília: Embrapa, p. 15-54.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. (1950) *The water culture method for growing plants without soil*. England: California Agricultural Experiment Station, 32p.
- Hoffmann, A., Chalfun, N.N.J., Antunes, L.E.C., Ramos, J.D., Pasqual, M., Rezende, E., Silva, C.R. (1996) *Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas*. Lavras: UFLA/FAEPE, 319p.
- Inoue, M.T., Graça, M.E.C., Correa, G. (1988) Capacidade fotossintética de plântulas micropropagadas e de mudas de *Eucalyptus tereticornis* SM. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, (36): 71-77.
- Janick, J. (1996) *A Ciência da Horticultura*. Rio de Janeiro: F Bastos, 485p.
- Jindal, K.K., R.N. Singh. (1976) Sex determination in vegetative seedlings of *Carica papaya* by phenolic tests. *Scientia Horticulturae*, 4 (1): 33-39.
- Kabir, A.H., Bari, M.A., Huda, A.K.M.N., Rezvy, M.A., Mahfuz, I. (2007) Effect of growth regulators and carbon sources on axillary shoot proliferation from shoot-tip explant and successful transplantation of papaya (*Carica papaya* L.). *Biotechnology*, 6 (2): 268-272.
- Kato, F., Oishi, A. (2003) A study on juvenility and nodal aging of papaya by vegetative propagation. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 72 (2): 93-98.
- Khan, P.S.S.V., Kozai, T., Nguyen, Q. T., Kubota, C., Dhawan, V. (2002) Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 141-146.
- Kim, S.J., Hahn, E.J., Heo, J.W., Paek, K.Y. (2004) Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 101 (2): 143-151.
- Kitaya, Y., Arima, K., Takahashi, A. (1997) Visualization and analysis of air currents on plant tissue culture vessels. *Environment Control in Biology*, 35 (2): 139-141.

- Kitaya, Y., Ohmura Y., Kubota, C. and Kozai, T. (2005) Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on plantlets photosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83: 251-257.
- Kitaya, Y., Sakami, K., Kozai, T. (1995) Development of photoautotrophic Plant Tissue Culture System Using CO<sub>2</sub> from Shiitake Mushroom. *Environmental Control in Plant Tissue Culture. Acta Horticulturae*, 393: 195-202.
- Kodym, A., Zapata-Arias, F.J. (1999) Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55: 141-145.
- Kozai, T. Autotrophic Micropropagation. (1991) *In: Bajaj, Y.P.S (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 17: High-Tech and Micropropagation I. Berlin: Springer-verlag Heidelberg, p. 313-343.
- Kozai, T., Fujiwara, K., Watanabe, I. (1986) Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. (2) Effect of stoppers and vessels on gas exchange rates between inside and outside of vessels closed with stoppers. *Journal of Agricultural Meteorology*, 42: 119-127.
- Kozai, T., Kubota, C., Jeong, B.R. (1997) Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51: 49-56.
- Kozai, T., Nguyen, Q.T. (2003) Photoautotrophic micro-propagation of woody and tropical plants. *In: Jain, S.M., Ishii, K. Micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 757-781.
- Kozai, T., Ohde, N., Kubota, C. (1991) Similarity of growth patterns between plantlets and seedlines of *Brassica campestris* L. under different *in vitro* environmental conditions. *Plant cell, Tissue Organ Culture*, 24: 181-186.
- Kozai, T., Oki, H., Fujiwara, K., (1990) Photosynthetic characteristic of Cymbidium plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 22: 205-211.
- Kramer, T. Kozlowski, T.(1979) *Physiology of woody plants*. New York: Academic Press, 811p.
- Kubota, C., Kozai, T. (1992) Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum in vitro* under forced and natural ventilation. *HortScience*, 27: 1312-1314
- Langford, P.J., Wainright, S. (1987) Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots *in vitro*. *Annals of Botany*, 60: 633-640.
- Lédo, A.S., Gomes, K.K.P., Barboza, S.B.S.C., Vieira, G.S.S., Tupinambá, E.A., Aragão, W.M. (2007) Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42 (2):147-154.

- Lee, N., Wezstein, N.H.Y., Sommer, H.E. (1995) Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiology*, 78: 637-641.
- Lee, N., Wezstein, Y., Sommer, H. E. (1988) Quantum Flux Density Effects on the anatomy and Surface Morphology of *in vitro*-and *in vivo* developed Sweetgum Leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113 (1): 167-171.
- Leite, G.B., Finardi, N., Fortes, G.R.L. (2000) Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira OH x F97. *Ciência e Agrotecnologia*, 24 (2): 353-357.
- Litz, R.E., Conover, R.A. (1978) *In vitro* propagation of papaya. *HortScience*, 13 (3): 241-242.
- Litz, R.E.; Conover, R.A. (1981) 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 (6): 792-794.
- Lone, A.B., López, E.L., Rovaris, S.R.S., Klesener, D.F., Higashibara, L., Ataíde, L.T., Roberto, S.R. (2010) Efeito do AIB no enraizamento de estacas herbáceas do porta-enxerto de videira VR 43-43 em diferentes substratos. *Semina: Ciências Agrárias*, 31 (3): 599-604.
- Lopes, J.C., Coelho R.I.C., Bregonci, I.S., Macedo, C.M.P., Lílian, L.R. (2008) Brotação de mamoeiro tainung 1 submetido a diferentes alturas de corte do caule. *Ciência e Agrotecnologia*, 32 (2): 360-365.
- Louro, R.P., Santiago, L.J.M. (2000) Ultraestrutura de plantas cultivadas *in vitro*. *Caderno de Pesquisa Série. Botânica*, 12 (1): 99-107.
- Magdalita, P.M., Mercado, C.P. Determining the sex of papaya for improved production. Disponível em: <http://www.agnet.org/library/eb/534/>, em 10/10/2010, página mantida pela Food & Fertilizer Technology Center.
- Majada, J.P., Tadeo, F., Fal, M.A. Sánchez-Tamés, R. (2000) Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 207-214.
- Marin, S.L.D. (2001) *Melhoramento genético do mamoeiro (Carica papaya L.): habilidade combinatória de genótipos dos grupos 'Solo' e 'Formosa'*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 117p.
- Marin, S.L.D., Gomes, J.A., Salgado, J.S., Martins, D.S., Fullin, E.A. (1995) *Recomendações para a cultura do mamoeiro dos grupos solo e formosa no estado do espírito santo*. 4. ed. Vitória, ES: EMCAPA, 57p. (Circular Técnica, 3).

- Marin, S.L.D., Silva, J.G.F. (1996) 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: Embrapa-CNPMPF, p. 7-20.
- May, C.T., Espadas, F.G., Contreras, G.F.M., Santamaría, J.M. (2009) Acclimatization, rooting and field establishment of micropropagated papaya plants. *Acta Horticulturae*, 812: 373-378.
- May, C.T., Gil, F.E., Contreras, F., Santamaría, J.M. (2007) Field performance of 100% hermaphrodite micropropagated papaya plants. *Acta Horticulturae*, 748: 219-222.
- Mcalister, B., Finnie, J., Watt, M.P., Blakeway, F. (2005) Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA<sup>®</sup>) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forests (SA). *Plant cell, tissue and organ culture*, 81 (3): 347-358.
- Medina, J. C. (1989) 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, p. 1-177.
- Ming R., Hou S., Feng Y., Yu Q., Dionne-Laporte A., Saw J.H, Senin, P., Wang, W., Ly, B.V., Lewis, K.L. et al. (2008) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*. 452: 991-997
- Monteiro, S. (2006) Frutas frescas: vitórias e desafios. *Frutas e derivados*. IBRAF-Instituto Brasileiro de Frutas. ano 1. edição 2.
- Moreira, M.A. (2001) *Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro Ananás comosus (L) Merrill cv. Pérola*. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Lavras - MG, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 81p.
- Morini, S., Muleo, R. (2003) Effects of light quality on micropropagation of woody species. *In*: Jain, S.M., Ishii, K. *Micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 3-35.
- Mosaleeyanon, K., Cha-Um, S., Kirdmanee, C. (2004) Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO<sub>2</sub>-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. *Scientia Horticulturae*, 103: 51-63.
- Mothé, G.P.B., Torres Netto, A., Crespo, L.E.C., Campostrini, E. (2008) Eficiência fotoquímica e características de crescimento da cana-de-açúcar (*saccharum officinarum* L.) cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e qualidade de luz. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 4 (2): 84-91.
- Murashige, T. (1974) Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, 25: 135-166.

- Murashige, T., Skoog, F.A. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3): 473-497.
- Nelson, E.A., Sage, R.F. (2008) Functional constraints of CAM leaf anatomy: tight cell packing is associated with increased CAM function across a gradient of CAM expression. *Journal of Experimental Botany*, 59: 1841-1850.
- Nhut, D.T., Takamura T., Watanabe H., Okamoto K., Tanaka, M. (2003) Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73: 43-52.
- Nicoloso, F.T., Cassol, L.F., Fortunato, R.P. (2001) Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). *Ciência Rural*, 31 (1): 57-60.
- Nicoloso, F.T., Erig, A.C., Russowski, D., Martins, C.F. (2003) Efeitos de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, 27 (1): 84-90.
- Norton, C.R., Norton, M.E., Herrington, T., Phillips, D. (1988) Light quality and light pipe in the micropropagation of woody ornamental plants. *Acta Horticulturae*, The Hague, 226: 413-416.
- Oliveira, A.M.G., Souza, L.F.S., Raij, B.G. Magalhães, A.F.J., Bernardi, A.C.C. (2004) *Nutrição, calagem e adubação do mamoeiro irrigado*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 10p. Circular Técnica 69.
- Oliveira, E.D. Dantas, J.L.L., Castellen, M.S., Lima, D.S., Barbosa, H.S., Motta, T.B.N. (2007) Marcadores moleculares na predição do sexo em plantas de mamoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42 (12): 1747-1754.
- Ono, E.O., Grana Junior, J.F., Rodrigues, J.D. (2004) Reguladores vegetais na quebra da dominância apical de mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26 (2): 348-350.
- Osunkoya, O.O., Ash, J.E., Hopkins, M.S., Graham, A.W. (1994) Influence of seed size and seedling ecological attributes on shade-tolerance in northern Queensland. *Journal of Ecology*, 82: 149-163.
- Paiva, H.N., Gomes, J.M. (2001) *Propagação vegetativa de espécies florestais*. Viçosa: UFV, 46p.
- Panjaitan, S.B., Aziz, M.A., Rashid, A.A., Saleh, N.M. (2007) *In Vitro* plantlet regeneration from shoot tip of field-grown hermaphrodite papaya (*Carica papaya* L. cv. Eksotika). *International Journal of Agriculture & Biology*, 9 (6): 827-832.

- Pasqual, M. (2001) *Textos acadêmicos: meios de cultura*. Lavras: FAEPE/UFLA, 127p.
- Penchel, R.M., Otoni, W.C., Xavier, A. (2007) Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: Borém, A. (ed.) *Biotechnologia Florestal*. Viçosa: UFV, p. 75-92.
- Pereira, C.L. (1992) Mamão, a fruta dos nossos quintais: ótima fonte de vitamina e de renda para o produtor. 1. ed. São Paulo: Editora ícone, 78p.
- Pereira, M.G., Marin, S.L.D., Viana, A.P., Ferregueti, G.A., Martelleto, L.A.P., Cattaeneo, L.F., Pereira, T.N.S. (2003) Melhoramento genético do mamoeiro (*Carica papaya* L.): desenvolvimento e recombinação de híbridos. *Anais do Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas*, 2, Porto Seguro: SBMP.
- Pio, R., Ramos, J.D., Chalfun, N.N.J., Chagas, E.A., Dalastra, I.M., Campagnolo, M.A., Chalfun, M.Z.H. (2008) Enraizamento de estacas apicais de figueira e desenvolvimento inicial das plantas no campo. *Scientia Agraria*, 9 (2): 147-152.
- Pierik, R.L.M. (1990) *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid: Mundi-Prensa, 326p.
- Poorter, L. (1999) Growth responses of 15 rain-forest tree species to a light gradient : the relative importance of morphological and physiological traits. *Functional Ecology*, 13: 396-410.
- Pospisilová, J., Solarová, Catsky, J. (1992) Photosynthetic responses to stress during *in vitro* cultivation. *Photosynthetica*, 26: 3-18.
- Pyke, K., López-Juez, E. (1999) Cellular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18 (4): 527-546.
- Rajeevan, M.S., Pandey, R.M. (1986) Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya* L.) for clonal propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 6: 181-188.
- Ramkhelawan, E., Baksh, N., Lauckner, B. (1999) Propagation of papaya (*Carica papaya* L.) by *in vivo* methods in Trinidad. *Tropical Agriculture*, 76 (2): 126-130.
- Ramos, J.D., Matos, L.E.S., Gontijo, T.C.A., Pio, R., Junqueira, k.p., Santos, F.C. (2003) Enraizamento de estacas herbáceas de 'Mirabolano' (*Prunus cerasifera* Ehrn) em diferentes substratos e concentrações de ácido indolbutírico. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25 (1) 189-191.
- Reis, F.O., Campostrini, E. (2008) Trocas gasosas e eficiência fotoquímica potencial em mamoeiro do grupo 'Formosa' cultivado em condições de campo. *Bragantia*, 67 (4): 815-822.
- Reuveni, O., Shlesinger, D. R. (1990) Rapid vegetative propagation of papaya plants by cuttings. *Acta Horticulturae*, 275: 301-306.

- Ribeiro, M.N.O., Pasqual, M., Silva, A.B., Rodrigues, V.A. (2008) Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-de-leite). *Revista Ciência Agronômica*, 39 (1): 101-106.
- Rocha, P.S.G., Oliveira, R.P., Scivittaro, W.B., Santos, U.L. (2010) Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. *Ciência Rural*, 40 (9): 1922-1928.
- Ribeiro, M.N.O., Pasqual, M., Silva, A.B., Rodrigues, V.A. (2009) Multiplicação *in vitro* de copo-de-leite: espectros de luz e sacarose. *Ciência Rural*, 39 (8): 2388-2393
- Rodrigues, M.M., Melo, M.D., Aloufa, M.A.I. (2006) Propagação vegetativa *in vitro* e análise estrutural de macieira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41 (1): 171-173.
- Rogalski, M., Moraes, L.K.A, Felisbino, C., Crestani, L., Guerra, M.P., Silva, A.L. (2003) Aclimatização de porta-enxertos de *Prunus* sp. Micropropagados. *Revista Brasileira de fruticultura*, 25 (2): 417-423.
- Rohman, M.M., Islam, M.N., Alam, M.S., Ahmad, M.R., Paul, T.K. (2007) Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya*) for clonal propagation. *Biotechnology*, 6 (3): 339-343.
- Romano, A., Martins-Loução, M.A. (2003) Water loss and morphological modifications in leaves during acclimatization of Cork Oak micropropagated plantlets. *Acta Horticulturae*, 616: 439-442.
- Saebo, A., Krekling, T., Appelgren, M. (1995) Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41 (2) 177-185.
- Saha, M., Phatak, A., Chandra, N. (2004) *In vitro* culture studies in four dioecious varieties of *Carica papaya* L. using axillary buds from field-grown plants. *Journal of Tissue Research*, 4 (2): 211-214.
- Saitou, T., Hashidume, A., Tokutomi, S., Kamada, H. (2004) Reduction of phytochrome level and light-induced formation of adventitious shoots by introduction of antisense genes for phytochrome A in horseradish hairy roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 45-51.
- Santos, R.P. *Respostas morfofisiológicas de videiras cultivadas sob diferentes condições in vitro*. (2007). Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Viçosa - MG, Universidade Federal de Viçosa - UFV, 115 p.
- São José, A.R., Marin, S.L.D. (1988) Propagação do mamoeiro. *In: Ruggiero, C. Mamão*. Jaboticabal: FUNEP, p. 177-196.

- Sha, L., McCown, B.H., Lloyd, A.P. (1985) Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110 (5): 631-634.
- Schmildt, E.R. (1994) *Enraizamento 'in vitro' e 'ex vitro' de ramos de mamoeiro (Carica papaya L.)*. Tese (Mestrado em Fitotecnia) - Viçosa - MG, Universidade Federal de Viçosa - UFV, 84p.
- Schmildt, E.R., Amaral, J.A.T. (2002) Contaminação e reação morfogênica *in vitro* de explantes de mamoeiro. *Revista Ceres*, 49 (281): 63-70.
- Schmildt, E.R., Amaral, J.A.T., Schmildt, O., Coelho, R.I., Rabello, W.S., Martins Filho, S. (2010) Níveis de ácido indol butírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro 'Tainung 01'. *Acta Scientiarum Agronomy*, 32 (1): 125-129.
- Schmildt, E.R., Teixeira, S.L., Cruz, C.D., Couto, F.A.D., Lani, E.R.G. (1997) Enraizamento de ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) obtidos por cultivo *in vitro* de ápices caulinares. *Revista Ceres*, 44 (253): 339-345.
- Schmildt, O., Schmildt, E.R., Amaral, J.A.T. (2007a) Cinetina e ANA na multiplicação *in vitro* de mamoeiro 'tainung 01'. *Scientia Agraria*, 8 (1): 55-60.
- Schmildt, O., Schmildt, E.R., Amaral, J.A.T. (2007b) Sulfato de adenina na multiplicação *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'. *Scientia Agraria*, 8 (2): 141-147.
- Schuerger, A.C., Brown, C., Stryjewski, E.C. (1997) Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) growth under red light emitting diodesupplemented with blue or far-red light. *Annals of Botany*, 79 (3): 273-282.
- Shimizu-Sato, S., Mori, H. (2001) Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiolog*, 127 (4): 1405-1413.
- Silva, A.B. (2006) Biorreator e luz natural na micropropagação do abacaxizeiro. Tese (Doutorado em Agronomia) – Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 132p.
- Silva, A.B., Pasqual, M., Teixeira, J.B., Araújo, A.G. (2007) Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42 (9): 1257-1260.
- Silva, A.T., Pasqual, M., Ishida, J.S., Antunes, L.E.C. (1995) Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 30 (1): 49-53.
- Silva, M.M., Broetto S.G., Valbão, S.C., Costa, A.F.S., Silva D.M. (2010) Características vegetativas e de frutos de mamoeiros obtidos por seleção massal. *Semina: Ciências Agrárias*, 31 (1): 29-38.



- Simão, S. (1998) Mamão. In: Simão, S. *Tratado de Fruticultura*. Piracicaba: Fealq, p. 541-575.
- Skoog, F.; Miller, C.O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 54 (11): 118-130.
- Skrebsky, E.C., Nicoloso, F.T., Ferrao, G. E. (2004) Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng Pedersen). *Ciência Rural*, 34 (5): 1471-1477.
- Smart, D.R., Kocsis, L., Walker, M.A., Stockert, C. (2003) Dormant buds and adventitious root formation by *Vitis* and other woody plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21: 296-314.
- Soave, R.C.F., Silva, O.A. (1993) Aspectos fenológicos e variação dos conteúdos das clorofilas *a* e *b* em *Caryocar brasiliense* CAMB. *Arq. Biologia e Tecnologia*, 36 (1): 57-69.
- Souza, F.X., Almeida, F.C.G., Correa, M.P.F., Almeida, F.A.G. (1992) Enraizamento de estacas de caule juvenil de cajueiro 'Anão-precoce' (*Anacardium occidentale* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 14 (3): 59-65.
- Stancato, G.C., Tucci, M.L.S.A. (2010) Monitoring the end of the *in vitro* phase of *Anthurium andreanum* Lindl. Plantlets. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22 (1): 61-68.
- Sutter, E.G., Novello, V., Shackel, K. (1988) Physiological and anatomical aspects of water stress of cultured plants. *Acta Horticulturae*, 230: 113-119.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2009) *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 848p.
- Takahashi, N., Phinney, B.O., Mac Millan, J. (1991) *Gibberellins*. New York: Springer-Verlag. p. 199-210.
- Talavera, C., Espadas, F., Contreras, F., Fuentes, G., Santamaría, J.M. (2009) Acclimatization, rooting and field establishment of micropropagated papaya Plants. *Acta Horticulturae*, 812: 373-378.
- Teixeira, J.B. (2002) Biorreatores. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 4 (24): 36-41.
- Teixeira, M.T., Teixeira, S.L. (2004) Estabelecimento de segmentos apicais de mamoeiro *in vitro*. *Revista Ceres*, 51 (296): 477-483.
- Thomas, P., Kumari, S., Swarna, G.K., Prakash, D.P., Dinesh, M.R. (2007) Ubiquitous presence of fastidious endophytic bacteria in field shoots and index-negative apparently clean shoot-tip cultures of papaya. *Plant Cell Reporter*, 26: 1491-1499.

- Tichá, I., Cap, F., Pacovska, D., Hofman, P., Haisel, D., Capkova, V., Schäfer, C. (1998) Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 102: 155-162.
- Toda Fruta (2004) Propagação vegetativa do mamoeiro. <http://www.todafruta.com.br/portal/icNoticiaAberta.asp?idNoticia=6642>, em 15/08/2010, página mantida pela Toda Fruta.
- Tofanelli, M.B.D., Rodrigues, J.D., Ono, E.O. (2003) Método de aplicação de ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de pessegueiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25 (2): 363-364.
- Tokuhisa, D., Dias, D.C.F.S, Alvarenga, E.M., Dias, L.A.S., Marin, L.S.D. (2007) tratamentos para superação da dormência em sementes de mamão. *Revista Brasileira de sementes*, 29 (1): 131-139.
- Torres, A.C., Caldas, L.S. (1990) *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: Embrapa-CNPq, 433p.
- Torres, A.C., Teixeira, S.L., Pozzer, L. (1998) Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, v. 1, p. 133-145.
- Torres Netto, A., Campostrini, E., Oliveira, J.G., Yamanishi, O.K. (2002) Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 14 (3): 203-210.
- Vianna, G.R., Couto, F.A.A., Oliveira, A.B., Zambolim, L., Maria, J. (1997) Rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. *Bragantia*, 56 (2): 249-254.
- Viña, G., Muñoz, B., Alfaro, F.P. (2001) Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 65 (3): 229-237.
- Vlahos, J.C., Martakis, G.F.P., Heuvelink, E. (1992) Daylength, light quality, and temperature influence growth and development of *Achimenes*. *HortScience*, 27: 1269-1271.
- Wainwright, H., Scrace, J. (1989) Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vitro* establishment. *Scientia Horticulturae*, 38: 261-267.
- Wardle, K., Dobbs, E.B., Schort, K.C. (1983) *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108 (3): 386-389.
- Wedling, I., Gatto, A., Paiva, H.N. (2002) *Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas*. Viçosa: Aprenda Fácil, 166p.

- Williams, R.R. (1993) Mineral nutrition in vitro – a mechanistic approach. *Australian Journal of Botany*, 41: .237-251.
- Yamanishi, O.K. (2009) Mamão na China tem técnica brasileira. Disponível em: <http://inovabrasil.blogspot.com/2009/03/mamao-na-china-tem-tecnicabrasileira.html>, em 20 /10/10, página mantida pela Inova Brasil.
- Yang, S.H., Yeh, D.M. (2008) *In vitro* leaf anatomy, *ex vitro* photosynthetic behaviors and growth of *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy plants obtained from semi-solid medium and temporary immersion systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93: 201–207.
- Yeh, N., Chung, J.P. (2009) High-brightness LEDs - Energy efficient lighting sources and their potential in door plant cultivation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, p. 1-6.
- Xavier, A., Comércio, J. (1996) Microestaquia: uma maximização de Eucaliptos. *Revista Árvore*, 20 (1): 9-16.
- Zaidan, H.A. (2002) *Micropropagação e uso de marcadores moleculares na determinação do sexo do mamoeiro*. Tese (Doutorado em Agronomia) - Jaboticabal - SP, Universidade Estadual de São Paulo - UESP, 154p.
- Ziv, M. (1995) *In vitro* acclimatization. In: Aitken-Christie, J., Kozao, T., Smith, M.L.A. (eds.) *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 493-516.
- Ziv, M. (1999) Organogenic plant regeneration in bioreactors. In: Altman, A., Ziv, M., Izhar, S. (eds.) *Plant biotechnology and in vitro biology in the 21<sup>st</sup> century*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 673-676.
- Ziv, M., Schwartz, A., Fleminger, D. (1987) Malfunctioning stomata *in vitro* leaves of carnation (*Sianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. *Plant Science*, 52: 127-134.
- Zobayed, S.M.A., Afreen, F., Kozai, T. (2000) Quality Biomass Production Via Photoautotrophic Microrpropagation. *Acta Horticulturae*, 530: 377-386.
- Zuffellato-Ribas, K.C., Rodrigues, J.D. (2001) *Estaquia: uma abordagem dos principais aspectos fisiológicos*. Curitiba: Imprensa Universitária da UFPR, 39p.