

# INDUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE CALOS E EMBRIÕES SOMÁTICOS EM MAMOEIRO

Eliane Pires de Almeida<sup>1</sup>; Roberto Pedroso de Oliveira<sup>2\*</sup>; Jorge Luis Loyola Dantas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, C.P. 82 - CEP: 44380-000 - Cruz das Almas, BA.

<sup>2</sup>Embrapa Clima Temperado, C.P. 403 - CEP: 96001-970 - Pelotas, RS.

<sup>3</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura, C.P. 7 - CEP: 44380-000 - Cruz das Almas, BA.

\*Autor correspondente <rpedroso@cena.usp.br>

**RESUMO:** Este trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo para a indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro (*Carica papaya* L. cv. Tainung n.1). Foram utilizados quatro tipos de explantes (hipocótilo com folhas cotiledonares, hipocótilo, folhas cotiledonares e epicótilo) e duas condições de cultivo (escuro e 16 horas de luz). A indução e o desenvolvimento de calos foram avaliados nos meios de cultura ½MS2, ½MS10 e HMH e a indução e o desenvolvimento de embriões somáticos nos meios ½MS e HMH1. O cultivo de explantes de hipocótilo com folhas cotiledonares em meio de cultura ½MS10, por 20 dias, sob condições de escuro, foi o mais adequado para a indução (100%) e o crescimento de calos friáveis embriogênicos. O cultivo desses calos em meio ½MS, por duas subculturas de 30 dias, sob condições de escuro, foi o mais adequado para a indução (60%) e o desenvolvimento de embriões somáticos. O tipo de explante, meios de cultura e condições de cultivo foram definidos para a embriogênese somática em mamoeiro. Palavras-chave: *Carica papaya* L. cv. Tainung n.1, embriogênese somática, epicótilo, hipocótilo com folhas cotiledonares, 2,4-D

## PAPAYA CALLUS AND SOMATIC EMBRYO INDUCTION AND DEVELOPMENT

**ABSTRACT:** In order to establish a protocol for induction and development of callus and somatic embryos of papaya (*Carica papaya* L. cv. Tainung n.1) four explant types (hypocotyl with cotyledonary leaves, hypocotyl, cotyledonary leaves and epycotyl) and two light conditions (dark and 16 h photoperiod) were used. Callus induction and development were evaluated in ½MS2, ½MS10 and HMH media, and somatic embryo induction and development in ½MS and HMH1 media. *In vitro* culture of hypocotyl with cotyledonary leaves in ½MS10 medium, under dark condition for 20 days, was suitable for induction (100%) and growth of embryogenic friable callus. The culture of these callus in ½MS medium, under dark condition for two subcultures of 30 days, was suitable for induction (60%) and development of papaya somatic embryos. The explant type, culture media and culture conditions were defined for papaya somatic embryogenesis.

Key words: *Carica papaya* L. cv. Tainung n.1, epycotyl, somatic embryogenesis, hypocotyl with cotyledonary leaves, 2,4-D

## INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo o Brasil o maior produtor com 1,65 milhões de toneladas (FAO, 1996). Os cultivares de mamoeiro mais utilizadas no país são a Sunrise Solo, Improved Sunrise Solo line 72/12 e o híbrido Tainung n.1. As sementes desse híbrido são importadas de Taiwan.

Nas últimas duas décadas, diversas técnicas de biotecnologia têm sido empregadas em apoio a programas de melhoramento do mamoeiro, tais como o resgate de embriões, cultura de anteras, isolamento e cultivo de protoplastos, produção de sementes artificiais, micropropagação, marcadores moleculares e transformação genética (Oliveira et al., 1996).

O estabelecimento de protocolos para a embriogênese somática do mamoeiro é importante por

permitir a multiplicação massal de plantas hermafroditas, diminuindo a importação de sementes híbridas que apresentam preço elevado no mercado internacional. Ademais, existe uma demanda não satisfeita de protocolos para a indução de embriões somáticos e regeneração *in vitro* de mamoeiros geneticamente transformados.

Em vários cultivares, embriões somáticos de mamoeiro já foram induzidos a partir de explantes de pecíolos, caules, folhas, raízes e embriões zigóticos (Chen et al., 1987; Fitch & Manshardt, 1990; Yang & Ye, 1992; Fitch, 1993; Khatoon & Sultana, 1994; Mondal et al., 1994). Além da composição dos meios nutritivos e das condições de cultura, diversos fatores como o sexo, clone, idade da planta, época de coleta dos explantes e tipo de explante influenciam no desenvolvimento *in vitro* dos explantes de mamoeiro (Litz & Conover, 1981; Oliveira et al., 1996). Por isso, uma das grandes limitações da cultura de tecidos consiste na necessidade

de um exato ajuste no balanço de nutrientes, reguladores de crescimento e condições de cultura em função de cada cultivar e do estado fisiológico das plantas (Arora & Singh, 1978).

Este trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo para a indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos de mamoeiro (*Carica papaya* L. cv. Tainung n.1).

## MATERIAL E MÉTODOS

Os explantes iniciais do mamoeiro 'Tainung n.1' foram obtidos de plântulas oriundas de germinação *in vitro*. Para a germinação foram utilizados três frutos hermafroditas provenientes de plantas do Banco de Germoplasma de Mamão da *Embrapa Mandioca e Fruticultura*. A desinfestação dos frutos foi realizada em solução de álcool 70% por dois minutos, solução comercial de hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo por 15 minutos, sendo, em seguida, lavados com água destilada esterilizada por três vezes. Os integumentos externo e interno das sementes foram removidos sob condições assépticas e as sementes cultivadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 500 mg L<sup>-1</sup> de extrato de malte, com pH 5,7. A germinação ocorreu em sala de crescimento, no escuro, à temperatura de 25 ± 2°C.

Para a indução de calos foram utilizados os explantes: a) hipocótilo com folhas cotiledonares totalmente expandidas com 15 mm de comprimento; b) folhas cotiledonares sem a nervura central; c) epicótilo (3 mm); d) secção de hipocótilo (5 mm), coletados, em média, 20 dias após a sementeira. Os explantes foram introduzidos individualmente em frascos (3,5 cm x 7,5 cm) contendo 15 mL dos seguintes meios de cultura: a) ½MS suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D (ácido diclorofenoacético), 60 g L<sup>-1</sup> sacarose, 50 mg L<sup>-1</sup> meso-inositol, 2 mg L<sup>-1</sup> glicina, 0,5 mg L<sup>-1</sup> ácido nicotínico, 0,5 mg L<sup>-1</sup> piridoxina, 0,4 mg L<sup>-1</sup> tiamina, 400 mg L<sup>-1</sup> glutamina, 10 g L<sup>-1</sup> agar, pH 5,7 (½MS2); b) ½MS suplementado com 10 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, 60 g L<sup>-1</sup> sacarose, 50 mg L<sup>-1</sup> myo-inositol, 2 mg L<sup>-1</sup> glicina, 0,5 mg L<sup>-1</sup> ácido nicotínico, 0,5 mg L<sup>-1</sup> piridoxina, 0,4 mg L<sup>-1</sup> tiamina, 400 mg L<sup>-1</sup> glutamina, 10 g L<sup>-1</sup> agar, pH 5,7 (½MS10); c) meio HMM (Alloufa, 1993) suplementado com 41 g L<sup>-1</sup> sacarose, 0,18 mg L<sup>-1</sup> AIA (ácido indol acético), 0,20 mg L<sup>-1</sup> AIB (ácido indol butírico), 0,19 mg L<sup>-1</sup> ANA (ácido naftaleno acético), 0,22 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, 0,21 mg L<sup>-1</sup> cinetina e 0,23 mg L<sup>-1</sup> BAP (benzilaminopurina), pH 6,5 (HMM). Utilizou-se dois fotoperíodos: a) no escuro; b) 16 horas de luz (1500 lux), ambos com temperatura de 25 ± 2°C. O experimento foi inteiramente casualizado, contendo 24 tratamentos com 10 repetições cada um, constituindo um fatorial 4x3x2 (quatro tipos de explante, três meios de cultura e duas condições de cultivo). Foram realizadas avaliações visuais da indução e crescimento dos calos e das taxas de contaminação e oxidação a cada cinco dias por 30 dias.

Para a obtenção de embriões somáticos, metade dos calos induzidos em cada meio de cultura foi transferida para meio ½MS sem reguladores de crescimento (½MS) e a outra metade para HMM com 0,2 mg L<sup>-1</sup> ANA e 2,0 mg L<sup>-1</sup> cinetina (HMM1), cultivados nas condições já mencionadas por dois subcultivos de 30 dias. Foram realizadas avaliações mensais de indução e desenvolvimento dos embriões.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de calos iniciou-se de três a cinco dias após a cultura *in vitro* dos explantes, sendo atingido o maior nível de crescimento aos 20 dias. Em geral, os calos apresentaram coloração amarelo-pálida. Em função dos tratamentos utilizados, houve formação de calos friáveis que se mostraram altamente embriogênicos e de não friáveis que não formaram embriões. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (1998) com o cultivar de mamoeiro Baixinho de Santa Amália.

Independentemente do meio de cultura e do fotoperíodo, foi obtida maior porcentagem de indução de calos utilizando os explantes hipocótilo com folhas cotiledonares (96,7%) e hipocótilo (95%) e de calos friáveis com os explantes hipocótilo (63%) e epicótilo (58,3%) (TABELA 1). Diferenças somente ocorreram na indução de calos. Oliveira et al. (1998) obtiveram diferenças significativas no comportamento *in vitro* dos explantes com a cv. Baixinho de Santa Amália, tendo o hipocótilo com folhas cotiledonares apresentado o melhor desempenho para a indução de calos. Os explantes folha cotiledonar e epicótilo apresentaram porcentagem elevada de oxidação (23,3%) ao contrário dos demais explantes (TABELA 1).

Independentemente do tipo de explante e do fotoperíodo, houve maior porcentagem de formação de calos (78%) no meio de cultura ½MS2 (TABELA 2) e de

TABELA 1 - Indução de calos de mamoeiro (*Carica papaya* L. cv. Tainung n.1) em função do tipo de explante, aos 20 dias de cultura, independentemente do meio de cultura e fotoperíodo.

Explante	Indução de calos	Calos friáveis	Oxidação
Hipoc. c/folhas cotil.	96,7 a	53,3 a	0,0 a
Hipocótilo	95,0 a	63,0 a	1,7 a
Epicótilo	58,3 b	58,3 a	23,3 a
Folha cotiledonar	51,7 b	41,7 a	23,3 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem à 5% pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis.

calos friáveis (71%) no meio ½MS10 (TABELA 3), não havendo, no entanto, diferenças estatísticas em relação aos outros meios. No meio HMM, Alloufa (1993) obteve indução de calos embriogênicos superior a 60%, porém utilizando embriões zigóticos como explante inicial.

Independentemente do tipo de explante e do meio de cultura, ocorreu maior indução de calos (76%) e de calos friáveis (59%), respectivamente sob 16 horas de luz e no escuro, porém sem haver diferenças estatísticas ao nível de 5% (TABELAS 2 e 3). No entanto, os calos mantidos no escuro apresentaram maior crescimento, confirmando os resultados de Winnaar (1987).

A análise das combinações explante/meio de cultura/fotoperíodo permitiu observar que em vários casos ocorreu 100% de indução de calos (TABELA 2). No entanto, quando foi analisada a porcentagem de calos friáveis houve 100% de indução apenas nas combinações hipocótilo com folhas cotiledonares em meio ½MS10 sob luz e no escuro, hipocótilo em meio ½MS2 sob escuro e hipocótilo em meio ½MS10 sob luz (TABELA 3). Esses resultados bem como os obtidos por Oliveira et al. (1998) demonstram que para cada explante e condição de cultura existe um melhor meio para induzir a formação de calos friáveis.

A indução de embriões somáticos ocorreu por meio de um processo de embriogênese indireta, tendo ocorrido a partir de calos dos explantes hipocótilo com folhas cotiledonares, folha cotiledonar e epicótilo no escuro. Essa potencialidade de indução de embriões somáticos a partir de diferentes tecidos de mamoeiro já

havia sido descrita por Chen et al. (1987), Fitch & Manshardt (1990), Yang & Ye (1992), Fitch (1993), Khatoon & Sultana (1994) e Mondal et al. (1994).

Houve uma grande variação na indução de embriões somáticos em diferentes combinações de explante, meio de cultura e fotoperíodo (TABELA 4). Essas variações de respostas *in vitro* demonstram que para cada explante existe uma melhor combinação de meio de cultura e fotoperíodo para a obtenção de embriões somáticos. A porcentagem máxima de indução de embriões somáticos obtida (60%) foi superior a relatada por Fitch (1993) em meio ½MS com 2,4-D (45%) e idêntica a de Oliveira et al. (1998) obtida com o explante hipocótilo com folhas cotiledonares sob escuro em meio ½MS. Em outras três combinações houve indução de embriões somáticos, sempre sob condições de escuro. O meio de cultura ½MS mostrou-se o mais adequado para a indução de embriões somáticos.

A diferenciação dos embriões somáticos ocorreu na superfície dos calos. Ao longo de dois subcultivos de 30 dias houve formação de zero a 15 embriões somáticos por calo, inicialmente globulares, passando, em seguida, para as formas cordiforme, torpedo e cotiledonar. Num mesmo calo embriogênico pôde-se observar embriões em estágios distintos. Os embriões cotiledonares formaram pequenas plântulas (<2 mm). Fitch (1993) obteve resultados semelhantes, ou seja, em três semanas, formaram-se dois a 20 embriões somáticos de calos originados a partir de hipocótilos dos cultivares Kapoho,

TABELA 2 - Porcentagem de indução de calos de explantes de mamoeiro (*Carica papaya* L. cv. Tainung n.1) em diferentes meios de cultura e fotoperíodos, aos 20 dias de cultivo.

Explante	Meio de Cultura			Fotoperíodo
	½MS10	½MS2	HMM	
Hipoc.c/ fol. cotiled.	100 Aa	90 Aa	100 Aa	
Hipocótilo	100 Aa	100 Aa	100 Aa	16 h luz
Folha cotiledonar	100 Aa	0 Bb	30 Bb	76 a
Epicótilo	60 Aa	60 Aab	80 Aab	
Hipoc.c/ fol. cotiled.	100 Aa	100 Aa	90 Aa	
Hipocótilo	70 Aa	100 Aa	100 Aa	Escuro
Folha cotiledonar	60 Aab	80 Aa	40 Aa	74 a
Epicótilo	10 Bb	90 Aa	50 ABA	
Média	75 A	78 A	74 A	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem a 5% pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. No caso das médias de fotoperíodo utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon.

TABELA 3 - Porcentagem de indução de calos friáveis de explantes de mamoeiro (*Carica papaya* L. cv. Tainung n.1) em diferentes meios de cultura e fotoperíodos, aos 20 dias de cultivo.

Explante	Meio de Cultura			Fotoperíodo
	½MS10	½MS2	HMM	
Hipoc.c/ fol. cotiled.	100 Aa	30 Aa	30 Aab	
Hipocótilo	100 Aa	10 Ba	40 ABab	16 h luz
Folha cotiledonar	70 Aa	0 Ba	10 Bb	49 a
Epicótilo	60 Aa	60 Aa	80 Aa	
Hipoc.c/ fol. cotiled.	100 Aab	50 Aa	40 Aa	
Hipocótilo	70 Aa	100 Aa	60 Aa	Escuro
Folha cotiledonar	60 Aa	80 Aa	0 Bb	59 a
Epicótilo	10 Bb	90 Aa	50 ABab	
Média	71 A	53 A	39 A	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem a 5% pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. No caso das médias de fotoperíodo utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon.

TABELA 4 - Porcentagem de indução de embriões somáticos de mamoeiro (*Carica papaya* L. cv. Tainung n.1) em diferentes combinações de meios de cultura.

Explante	Fotoperíodo	Meio indução calos/meio indução embriões					
		1/4	1/5	2/4	2/5	3/4	3/5
Hipoc.c/fol.cotiled.	Escuro	60	0	0	0	0	20
	16 h luz	0	0	0	0	0	0
Folha cotiledonar	Escuro	0	0	20	0	0	0
	16 h luz	0	0	0	0	0	0
Epicótilo	Escuro	0	0	20	0	0	0
	16 h luz	0	0	0	0	0	0
Hipocótilo	Escuro	0	0	0	0	0	0
	16 h luz	0	0	0	0	0	0

1) ½MS10; 2) ¼MS2; 3) HMH; 4) ½MS; 5) HMH1.

Sunset, Sunrise e Waimanalo. A maioria das plântulas regeneradas apresentavam fenótipo normal, porém foram comuns os casos de alterações na morfologia das folhas e no caule das plântulas, que se apresentava mais largo e com freqüente produção de calos na base. Esses variantes somaçonais ocorreram tanto em plantas regeneradas a partir de calos obtidos dos explantes epicótilo e epicótilo com folhas cotiledonares quanto de folhas, onde são relatados maiores índices de variação.

## CONCLUSÕES

- O cultivo *in vitro* do explante hipocótilo com folhas cotiledonares em meio de cultura ½MS10, por 20 dias, sob condições de escuro, é recomendado para a indução e crescimento de calos friáveis embriogênicos de mamoeiro cv. Tainung n.1.

- O cultivo de calos em meio ½MS, por duas subculturas de 30 dias, sob condições de escuro, é recomendado para a indução e desenvolvimento de embriões somáticos de mamoeiro cv. Tainung n.1.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLOUFA, M.A.I. Effect of some growth regulators on embryo culture of *Carica papaya* L. *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.15, p.27-32, 1993.

ARORA, I.K.; SINGH, R.N. Growth hormones and *in vitro* callus formation of papaya. **Scientia Horticulturae**, v.8, p.357-361, 1978.

CHEN, M.H.; WANG, P.J.; MAEDA, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. **Plant Cell Report**, v.6, p.348-351, 1987.

FAO QUARTERLY BULLETINS OF STATISTICS. Rome, v.9, n.3/4, 1996. 144p.

FITCH, M.M.M. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.205-212, 1993.

FITCH, M.M.M.; MANSHARDT, R.M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Cell Report**, v.9, p.320-324, 1990.

KHATOOM, K.; SULTANA, R. Plant regeneration from *Carica papaya* cv. Malir grown in tissue culture. **Pakistan Journal of Botany**, v.26, p.191-195, 1994.

LITZ, R.E.; CONOVER, R.A. Effect of sex type, season and other factors on *in vitro* establishment and culture of *Carica papaya* L. explants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.106, p.792-794, 1981.

MONDAL, M.; GUPTA, S.; MUKHERJEE, B.B. Callus culture and plantlet production in *Carica papaya* (var. Honey Dew). **Plant Cell Reports**, v.13, p.390-393, 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.437-497, 1962.

OLIVEIRA, R.P.; ALMEIDA, E.P.; DANTAS, J.L.L.; NICKEL, O. Papaya somatic embryogenic protocol (*Carica papaya* L. cv. Baixinho de Santa Amália). In: LATIN-AMERICAN MEETING ON PLANT BIOTECHNOLOGY, 3., Havana, 1998. **Abstracts**. Havana, 1998. p.123.

OLIVEIRA, R.P.; DANTAS, J.L.L.; ALMEIDA, E.P.; NICKEL, O.; VILARINHOS, A.D.; MORALES, C.F.G. Uso da biotecnologia no melhoramento genético e propagação do mamoeiro. In: MENDES, L.G.; DANTAS, J.L.L.; MORALES, C.F.G. **Mamão no Brasil**. Cruz das Almas: EAUFBA; EMBRAPA, CNPMF, 1996. 179p.

WINNAAR, W. First plants from papaw callus. **Information Bulletin of Citrus and Subtropical Fruits Research Institute**, n.177, p.1-2, 1987.

YAMAMOTO, H.; TABATA, M. Correlation of papaya and enzyme production with laticifer formation in somatic embryos of papaya. **Plant Cell Report**, v.8, p.251-254, 1989.

YANG, J.S.; YE, C.A. Plant regeneration from petioles of *in vitro* regenerated (*Carica papaya* L.) shoots. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.33, p.375-381, 1992.

Recebido em 27.06.00