

CONTROLE DA MORFOGÊNESE EM

MAMÃO (*Carica papaya* L.) "IN VITRO"

HELAINÉ CARRER

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de MESTRE em Agronomia, Área de Concentração: "Energia Nuclear na Agricultura".

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Abril - 1988

CONTROLE DA MORFOGÊNESE EM
MAMÃO (*Carica papaya* L.) "IN VITRO"

HELAINÉ CARRER
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: "Energia Nuclear na Agricultura".

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Abril-1988

CONTROLE DA MORFOGÊNESE EM
MAMÃO (*Carica papaya* L.) "IN VITRO"

HELAINÉ CARRER

Aprovada em: 20/05/88

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo


ESALQ/USP

Prof. Dr. Salim Simão

ESALQ/USP

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

ESALQ/USP


Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo
Orientador

AGRADECIMENTOS

- . Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo pela amizade, incentivo, orientação e constante contribuição para minha formação profissional.
- . Ao Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves e Prof. Dr. Neftalí Ochoa-Alejo pelas valiosas sugestões e discussões.
- .
Ao Biólogo Enio Tiago de Oliveira pelo auxílio técnico prestado.
- . Ao Carlos A. Dorelli pela colaboração nas análises de laboratório
- . Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), pela contribuição à minha carreira científica.
- . Ao Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC/FEALQ), pela oportunidade oferecida.
- . Aos amigos Leonardo Alves Carneiro e Marina Yukie Murayama, Renata P. de Almeida, pela amizade e estímulo que muito contribuíram para realização deste trabalho.
- . A Maria Aparecida Schiavuzzo, Sandra Tabai, Jeanette I. Miachir, Maria Therese Grothge, José B. Cabral, Fernando Broetto e demais colegas da Seção de Bioquímica de Plantas, pelo apoio.
- . À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

- . Ao Departamento de Química, pelo estímulo.
- . A Comissão Nacional de Energia Nuclear pela concessão de Bolsa de Estudos.
- . A Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária pela doação de sementes de mamão.
- . Ao Dr. Murilo Melo pelo auxílio na redação do "Summary".
- . A Maria A.C. Soares pelo trabalho datilográfico e Roméu Rocha pela elaboração dos gráficos e Figuras.

- . A *TODOS* que direta ou Indiretamente contribuíram para a realização deste Trabalho.

AOS MEUS PAIS E IRMÃOS
OFEREÇO

À
minhas Avós
Lydia e Mathilde
DEDICO

HOMENAGEM PÓSTUMA

À memória de JOSÉ AUGUSTO MOCHEL, que tanto lutou pela *Associação Nacional de Pós-Graduandos* na esperança de um desenvolvimento científico voltado para as necessidades do nosso povo.

A você MOCHEL, que não pôde concluir o seu Mestrado, divido a alegria da concretização dessa Dissertação.

Minha Gratidão e Saudades

Fica decretado, que agora vale a verdade
Que agora vale a VIDA
E de mãos dadas trabalharemos todos,
pela VIDA VERDADEIRA
Fica decretado que a partir deste instante
Haverã girassóis em todas as janelas
Que os girassóis terão direito a
abrir-se dentro da sombra
e que as janelas devem permanecer o dia
inteiro abertas para o verde
onde cresce a esperança
Fica decretado, que o homem não precisará
nunca mais duvidar do homem
Que o homem confiarã no homem,
como a palavra confia no vento
como o vento confia no ar
e como o ar confia no azul do céu
Fica decretado que a maior dor
Sempre foi e será sempre
Não poder dar AMOR a quem se ama
E saber que é a água
Que dá à planta o milagre da FLOR

Thiago de Mello

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xi.
LISTA DE TABELAS.....	xvi.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xix.
RESUMO.....	xx.
SUMMARY.....	xxiii.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos Econômicos da Cultura.....	6
2.2. Fator Limitante da Produção.....	15
2.3. Cultura de Tecidos de Mamão.....	21
2.4. Efeito da Radiação Gama no Crescimento de Calos "in vitro".....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1. Germinação das Sementes.....	40
3.1.1. Germinação das Sementes em Condições Assépticas.....	41
3.1.2. Germinação das Sementes em Vermiculita.....	41
3.1.3. Condições de Germinação.....	42
3.2. Obtenção dos Explantes e Assepsia.....	42
3.3. Meio de Cultura Básico.....	44
3.4. Cultura de Calos.....	48

SUMÁRIO

	Página
3.4.1. Interação 2,4-D/cinetina	48
3.4.2. Interação 2,4-D/Água de Côco.....	49
3.4.3. Interação NAA/Cinetina.....	50
3.5. Irradiação dos Explantes de Mamão.....	51
3.6. Análises Químicas.....	52
3.6.1. Extração de Açúcares Solúveis To tais.....	52
3.6.2. Quantificação de Açúcares Solúveis To tais.....	53
3.6.3. Determinação de Nitrogênio Total....	53
3.6.3.1. Digestão das Amostras.....	53
3.6.3.2. Quantificação.....	54
3.7. Regeneração de Plantas.....	54
3.8. Micropropagação.....	57
3.9. Enraizamento.....	58
3.10. Aclimação.....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1. Germinação de Sementes.....	60
4.2. Meio de Cultura.....	65
4.3. Cultura de Calos.....	67
4.3.1. Interação 2,4-D/Cinetina.....	67
4.3.2. Interação 2,4-D/Água de Côco.....	75

SUMÁRIO

	Página
4.3.3. Interação NAA/Cinetina.....	80
4.4. Efeito da Radiação Gama no Crescimento de <u>Ca</u> los.....	87
4.5. Regeneração de Plantas.....	99
4.6. Micropropagação.....	105
4.7. Enraizamento.....	111
5. CONCLUSÕES.....	116
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Participação percentual dos cinco principais países produtores mundiais (1975-1985) - FAO (1975-1985).....	9
2	Médias de crescimento (notas) de calos obtidos em diferentes concentrações de 2,4-D/cinetina mantidos no claro e no <u>es</u> curo, avaliados aos 20, 40 e 50 dias após inoculação.....	68
3	Aspecto dos calos desenvolvidos no claro, em diferentes interações de 2,4-D/cinetina aos 42 dias após inoculação.....	71
4	Aspectos dos calos desenvolvidos no <u>escu</u> ro em diferentes interações de 2,4-D/cine <u>ti</u> na aos 42 dias após inoculação.....	71

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
5	Médias de crescimento (notas) de calos obtidos em diferentes concentrações de 2,4-D com AC (15%) mantidos no claro e escuro, avaliados aos 20, 40 e 50 dias após a inoculação.....	76
6	Massa de matéria fresca e massa de matéria seca em gramas dos calos mantidos no claro e no escuro (Experimento 2,4-D/AC (15%).....	78
7	Aspecto dos calos desenvolvidos no claro em diferentes interações de 2,4-D/AC (15%) 42 dias após inoculação.....	81
8	Aspectos dos calos desenvolvidos no escuro em diferentes interações de 2,4-D/AC (15%) aos 42 dias após inoculação.....	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
9	Médias de crescimento (notas) de calos crescidos em diferentes concentrações de NAA/Cinetina, mantidos no claro e no escuro (35 dias após inoculação).....	82
10	Aspecto dos calos desenvolvidos no claro em diferentes interações de NAA/Cinetina aos 35 dias após inoculação.....	83
11	Crescimento de calos de mamão irradiados, com diferentes doses de radiação gama. Média de notas (0-4).....	88
12	Sequência de crescimento dos calos (notas) em diferentes intervalos de tempo (dias) após irr. (0,0-1,0-2,5-5,0-7,5 e 10,0Krad)	90
13	Valores da massa de matéria fresca e massa de matéria seca em gramas, de calos de mamão irradiados mantidos 42 dias em cultura.....	92

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
14	Percentagem de nitrogênio total, proteínas e açúcares solúveis totais em calos de mamão irradiados com diferentes doses de radiação gama.....	96
15	Crescimento de calos de mamão 42 dias após serem inoculados com diferentes doses de radiação gama.....	98
16	Percentagem de regeneração de plantas de mamão a partir de calos.....	101
17	Sequência do desenvolvimento de ápices vegetativos de mamão a partir de calos.....	103
18	Detalhe da organogênese.....	103
19	Micropropagação de mamão em meios YL ₁ , YL ₂ , LC ₁ e LC ₂	107
20	Desenvolvimento de ápices caulinares em diferentes concentrações de BAP (0,0-0,1-0,2 0,5-1,0 e 2,0) mg/ℓ.....	109

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
21	Sequência de desenvolvimento de ápices caulinares em meio de cultura com BAP (0,5 mg/l)	110
22	Desenvolvimento de raízes em plantas de mamão "in vitro".....	112
23	Aspecto das plantas após 30 dias em sala de crescimento (aclimação).....	115

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
1 Quantidade de mamão produzido no mundo e nos dez países maiores produtores mundiais em (1000 toneladas métricas) no período de 1975-1985.....	8
2 Quantidade de mamão produzido no Brasil e principais Estados produtores (1000 frutos); período 1975-1985.....	11
3 Área colhida em hectare no Brasil e principais Estados produtores, período 1975-1985.....	13
4 Rendimento médio (100 frutos/hectare) no Brasil e principais Estados produtores, período 1975-1985.....	14
5 Sais componentes do meio de <i>MURASHIGE & SKOOG (1962)</i> e a suplementação usada para constituição do meio básico MS.....	45

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
6	Sais componentes do meio de <i>WHITE</i> (1963) e a suplementação usada para constituição do meio básico W.....	46
7	Sais componentes do meio de <i>WHITE & RISSER</i> (1964) e a suplementação usada para constituição do meio WR.....	47
8	Efeito do tipo de substrato na germinação (%) e no crescimento (dias) para atingir 6 cm) das plantas.....	61
9	Massa de matéria fresca (mg), massa de matéria seca (mg), umidade (%), nitrogênio total (%) e proteínas (%), médias das repetições dos calos mantidos no claro.....	73
10	Massa de matéria fresca (mg), massa de matéria seca (mg), umidade (%), nitrogênio total (%) e proteínas (%). Média das repetições dos calos mantidos no escuro.....	74

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINAS
11	Teor de Umidade (%), nitrogênio total (%) e proteína (%) dos calos mantidos no claro e escuro do experimento 2,4-D/AC (15%).	79
12	Percentagem de raiz, nitrogênio total e proteína dos calos mantidos no claro e no escuro. Experimento NAA/cinetina.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AC = Água de côco

2,4-D = Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2 iP = 2-isopenteniladenina

BAP = 6-Benzilaminopurina

DNA = Ácido desoxiribonucleico

Gln = Glutamina

IAA = Ácido Indolacético

Kin = Cinetina

Krad = 1000 rad; Rad (Radiation Absorbed Dose) é a unidade de dose absorvida e é definida como a quantidade de radiação ionizante que transmite 100 ergs de energia a 1 g de substância irradiada.

LC = LITZ & CONOVER (1977)

MS = MURASHIGE & SKOOG (1962)

N = Nitrogênio

NAA = Ácido naftalenoacético

RNA = Ácido Ribonucleico

YL = YIE & LIAW (1977)

CONTROLE DA MORFOGÊNESE EM
MAMÃO (*Carica papaya* L.) "IN VITRO"

Autora: HELAINE CARRER

Orientador: PROF.DR. OTTO JESU CROCOMO

RESUMO

O trabalho teve como objetivo estudar o desenvolvimento de calos de mamão (*Carica papaya* L.), o seu potencial morfogênético, o controle da micropropagação de ápices caulinares e analisar o comportamento das células "in vitro" quando o explante é submetido a diferentes doses de radiação gama.

Sementes de mamão (*Carica papaya* L.) variedade Sunrise Solo 72/12 germinaram em vermiculita autoclavada e umedecida. A partir de plântulas com aproximadamente 25 a 40 dias foram obtidos os explantes (hipocótilo e ápice caulinar).

Segmentos de hipocótilos previamente esterilizados foram inoculados em meio básico MS que consiste da solução salina de MURASHIGE & SKOOG (1962), suplementado com vitaminas, glicina, inositol e sacarose. Diferentes interações de fitorreguladores foram testados procurando indução de calos: 2,4-D/cinetina; NAA/cinetina e 2,4-D/água de côco

(15%). Obteve-se melhor desenvolvimento de calos utilizando 2,4-D (1,0 mg/l) e cinetina (1,0 mg/l). Determinou-se massa de matéria fresca, massa de matéria seca, percentagem de Nitrogênio total e proteína nos tratamentos realizados.

O potencial morfo genético dos calos desenvolvidos em 2,4-D (1,0 mg/l) mais cinetina (1,0 mg/l) e segmentos de hipocótilos foram estudados. Observou-se que calos transferidos para meio de cultura contendo IAA(1,0 mg/l) e BAP(1,0 mg/l) apresentaram maior taxa de regeneração de plantas.

Segmentos de hipocótilos foram irradiados com raios gama nas doses (0,0- 1,0- 2,5- 5,0- 7,5 e 10,0 Krad) e em seguida foram inoculados em meio MS com cinetina (1,0 mg/l) e 2,4-D (1,0 mg/l). Observou-se que o crescimento de calos foi estimulado nas doses mais baixas (1,0- 2,5 e 5,0 Krad), possivelmente devido alongação celular. Doses acima de 5,0 Krad provocaram áreas de necrose nos calos e a análise de crescimento mostrou que o mesmo foi inversamente proporcional à dose de radiação empregada após 35 dias. Aos 42 dias da irradiação observou-se pequena recuperação no crescimento nas doses 1,0- 2,5 e 5,0 Krad provavelmente pela reativação das divisões celulares. As análises químicas mostraram que houve pequeno aumento no teor de Nitrogênio total nos calos irradiados até 7,5 Krad, enquanto que com 10,0 Krad houve decréscimo comparados com o controle. Percentagem de açúcares solúveis totais apresentou aumento nas doses mais altas de radiação gama.

A propagação rápida de clones com características superiores se constitui numa das grandes aplicações da cultura de tecidos. Nesse contexto, ápices caulinares com a proximadamente 1,0 mm foram inoculados em diferentes concetrações de BAP (0,0- 0,1- 0,2- 0,5- 1,0 e 2,0 mg/l) e em interações de 2,4-D/cinetina; NAA/BAP; IAA/cinetina e IAA/BAP. Obteve-se em média 50 plantas por ápice caulinar após 60 dias da inoculação em meio de cultura com BAP (0,5 mg/l).

Parte aérea regeneradas de calos e/ou a partir de ápices caulinar (micropropagação) foram individualizados e inoculados em meio MS variando as concentrações de Ácido Indolbutírico (IBA). Obteve-se desenvolvimento de raízes primárias e secundárias, utilizando-se IBA (0,2 mg/l). A seguir as plantas foram transferidas para vasos plásticos com vermiculita cobertas com plástico para aclimatação e após um período de 20 dias foram transferidas para casa de vegetação.

MORPHOGENESIS CONTROL IN
Papaya (Carica papaya L.) IN VITRO

Authora: HELAINE CARRER

Adviser: PROF. DR. OTTO JESU CROCOMO

SUMMARY

The objective of this dissertation is to study tissue culture cells of *Papaya (Carica papaya L.)*. Investigation of several physiological and morphological parameters such as morphogenetic potential, callus development and control of micropropagation utilizing shoot apex was carried out. The effect of gamma radiation on callus formation was also studied.

Papaya seeds (*Carica papaya L.* var. Sunrise Solo 72/12) were germinated in soaked treated vermiculite and seedlings (25 to 40 days after germination) were used as inoculum material for callus formation.

Treated hypocotyl segments were transferred into MS basic media consisting of saline solution (MURASHIGE and SKOOG, 1962) supplemented with vitamins, glycine

inositol and sucrose. The effect of diverse phytohormones (2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)/kinetin, naphthaleneacetic acid/kinetin and 2,4-D/15% coconut water) on callus formation induction were tested. Based on fresh weight, dry weight, total nitrogen, and protein content, a more satisfactory result is obtained when 2,4-D (1.0 mg/l)/kinetin (1.0 mg/l) is used. The morphogenetic potential of callus developed in 2,4-D (1.0 mg/l)/kinetin (1.0 mg/l) and of hypocotyl segments was studied. It was observed that calli transferred to culture medium containing indole-3-acetic acid (IAA) (1.0 mg/l)/benzylaminopurine (BAP) (1.0 mg/l) showed better plant regeneration than hypocotyl segments.

Hypocotyl segments irradiated with gamma radiation (0.0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 Krad) and inoculated in MS culture media containing 2,4-D (1.0 mg/l) and kinetin (1.0 mg/l) showed growth stimulation, probably caused by cellular elongation, when lower exposure radiations (1.0, 2.5 and 5.0 Krad) were used. Radiations higher than 5.0 Krad caused necrotic areas on the calli and their growth magnitude up to 35 days is observed to be always inverse related to the radiation intensity. Around the 42nd day after radiation a slight growth recovery, probably due to cell division activation, of 1.0, 2.5 and 5.0 Krad treatments was observed.

Chemical analyses indicated a small increase on the total nitrogen content on cells irradiated with up to 7.5 Krad. Cells irradiated with up to 10.0 Krad showed nitrogen content lower than the control. For total soluble sugars there was a positive response by the irradiated cells, mainly at higher radiation levels.

The fast propagation, of clones showing desirable phenotypes consists on one of the aims of tissue culture cells. In this investigation, starting with one 1.0 mm shoot apex inoculation in medium containing different concentrations of BAP (0.0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l) and different phytohormone interactions (NAA/kinetin, NAA/BAP, IAA/kinetin and IAA/BAP) an average of 50 plants per shoot apex was obtained 60 days after inoculation in a medium containing BAP (0.5 mg/l).

On aerial parts regenerated from callus and/or from shoot apex (micropropagation) and transferred to MS media containing different concentrations of Indole-3-Butyric acid (IBA) the formation of primary and secondary roots was optimized at IBA concentration of 0.2 mg/ml. These rooted plants were next transplanted to plant pot containing soaked vermiculite and protected properly for acclimation. After 20 days the already acclimated plants were transferred to green house.

1. INTRODUÇÃO

O mamão (*Carica papaya*) é uma das principais frutas tropicais, muito utilizada para consumo, maduro ao natural, ou verde em doces industrializados, podendo do fruto ser extraída a papaína, uma enzima hidrolítica de grande importância industrial como amaciante de carne, no preparo de cerveja, produção de cosméticos, em curtumes para limpeza de couro e na medicina produzindo remédios com efeito diurético, vermífugo, depressante do coração e "spray" anti alérgico nasal, entre outros produtos.

O Brasil é o principal produtor de mamão, participando com mais de 25% do montante produzido mundialmente (FAO, 1985).

Normalmente a propagação do mamoeiro é feita através de sementes. A planta é dióica com alta heterozigose sendo, portanto, difícil a obtenção de variedades verdadeiras.

Somente plantas fêmeas e hermafroditas apresentam-se produtivas e devido sua propagação usual ser por

sementes há ocorrência de variações genéticas indesejáveis. Neste sentido, através da utilização da técnica de micropropagação "in vitro", pode-se obter um grande número de plantas de uma variedade conhecida e com características desejáveis. Utilizando-se como explantes, gemas meristemáticas, pode-se obter plantas que apresentam-se livres de viroses.

A cultura do mamão é muito susceptível a doenças causadas por fungos, bactérias e principalmente por vírus como o do mosaico ("Papaya Ringspot virus") que em poucos dias pode destruir toda uma plantação.

Com o objetivo de desenvolver uma metodologia que permita auxiliar os estudos de melhoramento da cultura, a técnica de variação somaclonal tem grande importância, produzindo um grande número de plantas para posterior seleção visando resistência a vírus, alta produtividade e boa qualidade em sabor e aroma.

Outra técnica auxiliar no melhoramento da cultura de mamão é a utilização de radiação ionizante que aumenta a taxa de mutação e, quando associada à cultura de tecidos, há a possibilidade de se aumentar ainda mais a variabilidade.

Nesse contexto, o presente trabalho tem por objetivo estudar o efeito de diferentes doses de radiação gama no desenvolvimento de calos e estabelecer protocolos para o controle da morfogênese e a micropropagação de plantas de mamão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O mamoeiro (*Carica papaya*) é uma planta herbácea, pertencente à classe dicotiledoneae, ordem Violales, família *Caricaceae* e gênero *Carica*. Existem aproximadamente 21 espécies, sendo *Carica papaya* a única que apresenta importância comercial, com produção de frutos comestíveis. É nativa da América Tropical, cresce entre latitudes de 32° Norte e Sul, como descrito por CHAN (1983).

Carica papaya, com $2n=18$, é uma planta de rápido crescimento, apresenta-se com caule herbáceo ereto, com 2 a 10 m de altura, de coloração verde acinzentado na base. Possui uma cora de folhas dispostas de forma espiralada e alternadas, com limbo amplo de até 70 cm de diâmetro, profundamente palmatilobadas, segundo descrição de PURSEGLOVE, 1968.

Basicamente, o mamoeiro apresenta três tipos de flores que conferem às plantas o caráter sexo feminino, masculino e hermafroditas, sendo que também ocorrem plantas com sexo indeterminado (SIMÃO, 1971).

Segundo *MARIN & GOMES (1985)* os mamoeiros podem ser classificados quanto ao sexo, em dois tipos: dióicos e ginóico-andromonóicos. É uma planta de fácil cruzamento natural e, como a propagação é feita geralmente por sementes, os tipos resultantes são os mais variáveis.

Os cultivares do grupo Solo, conhecido como mamão Havai, muito comercializado atualmente, reproduzem-se fielmente por sementes, tendo em vista que apresentam elevado grau de autopolinização (*LUNA, 1986*).

A importância da cultura do mamoeiro é devida principalmente ao grande aproveitamento dos frutos maduros para sobremesa ou desjejum. A porção comestível da polpa consiste primariamente de água (86,8%) e carboidratos (12,2%) e tem sido indicado como boa fonte de provitamina A e ácido ascórbico (vitamina C), (*CHAN & TANG, 1979*). Segundo *CHAN & KWOK (1975)*, a composição de açúcares no fruto consiste em 48,3% de sacarose, 29,8% de glicose e 21,9% de frutose. De acordo com *CHAN (1983)*, além da provitamina A e vitamina C possui também tiamina (vitamina B), riboflavina (vitamina B₂) e niacina.

Alguns produtos que podem ser elaborados do mamão maduro são o purê em calda (compota), mamão cristalizado, salada de frutas tropicais, geléias, confeitados, gelatina, coquetéis, aperitivos, vinhos e champagne (*MANICA, 1982*).

Os frutos verdes podem ser industrializados na forma de doces. Também a partir de frutos verdes pode-se extrair a papaina, uma enzima cuja função é catalizar a hidrólise de proteínas e encontra-se em toda planta do mamoeiro, exceção das raízes, mas é no latex dos frutos verdes que contém a maior quantidade (MELO, 1980; MEDINA, 1980 e LEKEU, 1987).

A papaina contém um complexo enzimático muito ativo no qual as propriedades proteolíticas são semelhantes às da pepsina e tripsina, HAENDLER & HUET (1965) BENZA *et alii* (1967). É utilizada na indústria alimentícia como amaciante de carnes, no preparo de queijos, goma de mascar, alimentos dietéticos e infantis. A papaina tem grande importância na fabricação de produtos farmacêuticos para tratamento do aparelho digestivo, para facilitar a digestão e também na cicatrização de feridas.

A papaina tem sua maior utilização na clarificação da cerveja (LEKEU, 1987). Na indústria têxtil tem importância para desgomar a seda e para preparar tecidos de lã, em curtumes para depilar e amaciar couros. Nos produtos cosméticos é usada para tirar manchas e sardas como também no preparo de bronzeadores (MELO, 1980 e MANICA, 1982).

CHAN & TANG (1979) relataram que o alcalóide carpaína ocorre em mamão e tem sido muito usado para fins

medicinais como depressante do coração, amebicida e diurético.

As sementes dos frutos podem ser usadas para extração de óleo usado como vermífugo e contra irritação. As folhas podem ser usadas como forragens e no preparo de expectorante. O bagaço (resíduo do processamento que fica depois da prensagem da planta verde para a extração da papaina) pode ser empregado na alimentação do gado (BENZA *et alii*, 1967).

Segundo LEKEU (1987), existem grandes plantações de mamão no Zaire, no lago Manyara, área do Norte da Tanzânia, Sri Lanka e Kenia, primariamente envolvidas com extração da papaina, sendo que a produção de papaina seca é de 80 a 320 kg/ha/ano; a enzima impura é enviada para Dinamarca, França e Holanda para purificação, sendo estes os maiores países exportadores da enzima purificada.

2.1. ASPECTOS ECONÔMICOS DA CULTURA

O mamão (*Carica papaya*), tem sua origem na América do Sul, América Central ou possivelmente no sul do México, onde se propagou por quase todas as regiões do mundo.

Segundo SIMÃO (1971) a introdução do mamoeiro no Brasil ocorreu na época do descobrimento e logo em se

guida disseminou-se por todo o território Nacional em esta do semi-silvestre ou cultivado e de acôrdo com De Candole, em 1607,¹ já era conhecido em todo estado da Bahia.

O Brasil é o principal produtor de mamão par ticipando com mais de 37,5% do montante produzido mundial mente em 1984, segundo dados da *FAO (1985)*.

Na Tabela 1 estão listados os dez países maiores produtores de mamão no período de 1975-1985, juntos englobando mais de 89% da quantidade produzida no mundo. A Figura 1, demonstra a comparação entre as participações per centuais dos cinco principais países produtores mundiais Tomando-se como base o ano de 1985, destacam-se por ordem decrescente de importância: Brasil, Índia, Indonésia, México e Zaire. Estes cinco países representaram em 1985, 74% da produção mundial deste fruto.

¹ DE CANDOLE, A. *L'Origines Plants Cultivées*. 4 ed. Paris, Paris Felix Alean, 1895. p.387. Citado por SIMÃO (1971)

TABELA 1. Quantidade de mamão produzida no mundo e nos dez países maiores produtores mundiais (em 1000 toneladas métricas) no período de 1975 a 1985.

	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985
Brasil	114F	114F	205	200F	355	427	450F	435	481	974	600F
Indonésia	N	N	244	196	264	315	312	295	353	300F	313F
Índia	221	225F	250F	250F	250F	265F	270F	270F	268	300F	350F
México	162	183*	282	255	326	221	226	249	317	300F	300F
Zaire	165	168	170F	172F	159*	155*	156F	160F	160F	160F	165F
Filipinas	55F	55F	86	87	85	52	104	105F	75	78F	110F
China	34F	33F	19F	26F	63F	54F	75F	70F	73F	77F	80F
Colômbia	46	47F	50	58	65	65	27F	60*	51	67*	78*
Peru	62F	64F	66F	66F	43	45F	47F	48F	46F	47F	48F
Cuba	50*	43F	45F	48F	23	38	32	38	47	42	43F
Subtotal (1)	909	932	1417	1358	1633	1637	1699	1730	1871	2345	2087
Mundial	1168	1190	1652	1595	1858	1862	1957	1965	2114	2595	2330
1±2 (%)	77,8	78,3	85,8	85,1	87,9	87,9	86,8	88,0	88,5	90,4	89,6

* - dados não oficiais ; F - estimativa FAO; N - dados não existentes.
FAO (1975-1985).

PARTICIPAÇÃO PRODUÇÃO MUNDIAL
(1975-1985)

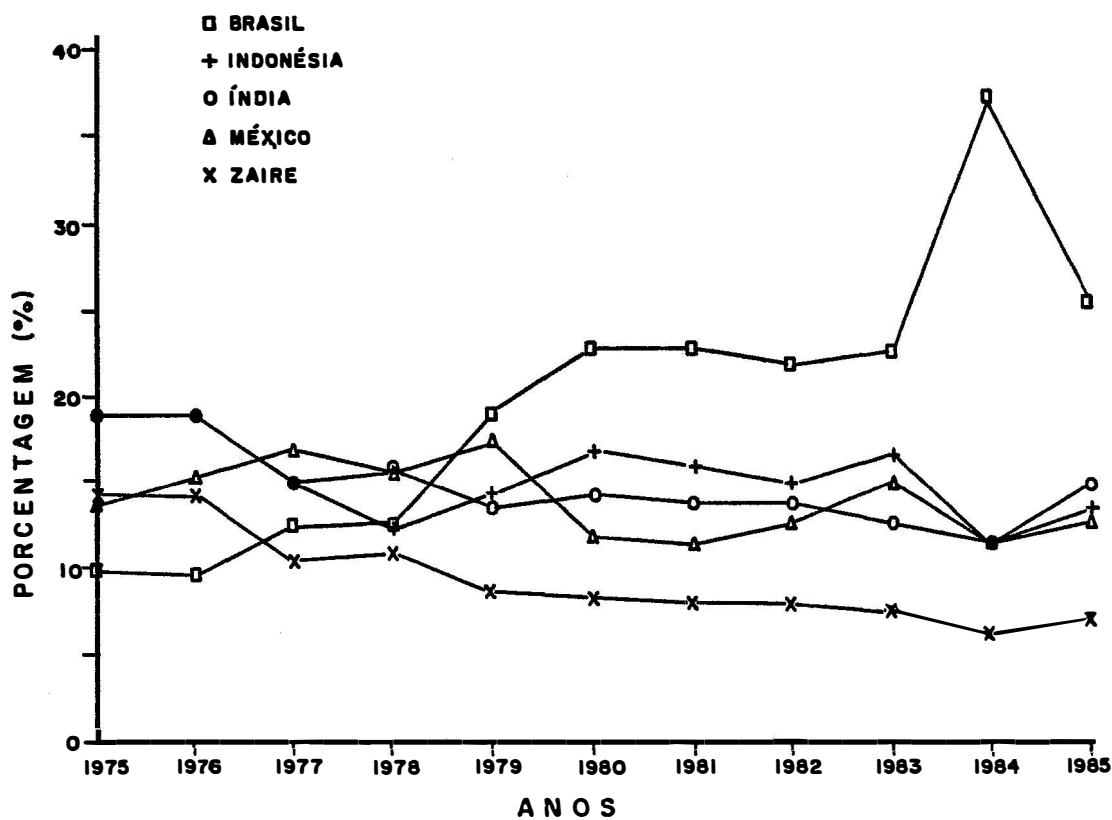


FIGURA 1. Participação percentual dos cinco principais países produtores mundiais. (1975-1985). FAO (1975-1985).

Observa-se que a produção do Brasil aumentou cinco vezes no período de 1975-1985, enquanto a produção mundial nesse mesmo período cresceu apenas duas vezes. Em 1975, o Brasil produzia 114 mil toneladas, o que correspondia a 9,8% da produção mundial, passando a produzir 37,5% em 1984. Destaca-se o crescimento de 854,4% da produção brasileira entre 1975 e 1984. O fato da produção nacional apresentar uma queda de produção em 1985, como mostrado na Tabela 1 e Figura 1, pode ser fictícia devido aos dados da FAO em 1985 serem estimativas.

Segundo dados da Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção Brasileira em 1975 era de 81 milhões de frutos e em 1985 aproximadamente 705 milhões de frutos, como demonstrada na Tabela 2, apresentando um aumento de 8,7 vezes no período de 10 anos. Destaca-se um crescimento de 119,7% nos anos de 1983 a 1985 devido principalmente ao Estado da Bahia que em 1985 produziu 412 milhões de frutos correspondentes a 58,4% da produção Nacional. Este Estado apresentou uma taxa de crescimento de 66,5% a.a., enquanto a produção Nacional cresceu 22,6% a.a. no período de 1975-1985.

Além do Estado da Bahia, outros Estados como Pará, Espírito Santo, Goiás e São Paulo tem apresentado alta produção de mamão, representando os cinco Estados, 93%

TABELA 2. Quantidade de mamão produzida no Brasil e principais Estados produtores (1000 frutos); período 1975-1985.

	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985 *
Bahia	2502	2591	3582	3612	7713	15481	17092	17892	18804	243881	411850
Pará	612	612	9856	36829	50170	82052	101864	99089	110533	116091	102620
Espírito Santo	2715	3540	1988	1955	4603	6275	12835	33195	60305	150942	87776
São Paulo	33012	50520	71852	80757	126340	135044	100755	72017	59974	70508	38540
Goiás	-	-	-	-	381	745	845	2455	5431	12769	15588
Minas Gerais	2640	2800	2961	3437	3733	4542	11606	14571	21284	13624	8431
Rio de Janeiro	29010	32394	30254	35866	21647	16169	20204	15099	9902	6507	5039
Amazonas	564	675	1381	2050	2840	4218	4573	4760	4868	5547	5623
Paraíba	255	436	444	489	572	890	1115	5115	4860	4855	4963
Rio Grande do Sul	1686	1390	2611	2048	3045	4894	6293	6130	6343	5535	4301
Paraná	835	870	3802	4305	5689	4821	5772	5059	4174	3811	3754
Pernambuco	2278	1800	2281	2940	2923	2990	6178	4952	4614	2452	3435
Rondonia	54	100	154	100	1149	679	1115	1420	1661	3603	2422
Sub-total (1)	76166	97428	131166	174388	230805	278800	290247	281754	312753	640125	694342
Brasil (2)	81097	103600	136881	183221	236554	284684	295963	289903	320757	649494	704781
1 ÷ 2 (%)	93,9	94	95,8	95,2	97,6	97,9	98,1	97,2	97,5	98,6	98,5

* Dados obtidos diretamente no IBGE/Rio de Janeiro-RJ (não publicado)

da produção Nacional. Estes Estados apresentam as maiores áreas produtoras como demonstrado na Tabela 3. Verifica-se que o Estado de Goiás apresentou uma taxa de crescimento de 91,9% a.a nos últimos seis anos (1979-1985), enquanto outros Estados como Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais diminuíram drasticamente a produção e a área cultivada, provavelmente pelo aparecimento de doenças como as viroses, que atacam a cultura do mamoeiro, sendo atualmente o principal fator limitante da produção não somente no Brasil como também nos países maiores produtores.

Na Tabela 4, é apresentado o rendimento médio em 1000 frutos por hectare de mamão nos Estados brasileiros maiores produtores. Observam-se que a produtividade média brasileira no período de 1975-1985 é de 28,2 mil frutos/ha, muito baixa quando comparamos com o Estado do Pará que apresentou produtividade média de 46,9 mil frutos/ha. Observa-se que Estados com baixa produção de mamão como o Rio Grande do Sul mantém seu rendimento médio de 12,8 mil frutos/ha, enquanto outros, como o Estado de Goiás, que vem surgindo como grande produtor, tem apresentado no período de 1979 a 1985 uma taxa de crescimento da produtividade de 31,4% a.a superior ao Espírito Santo que apresenta taxa de 18% a.a nos últimos dez anos (1975-1985).

TABELA 3. Área colhida em hectare no Brasil e principais Estados produtores; período 1975-1985.

	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985*
Bahia	175	209	237	233	423	715	774	830	903	4738	7841
Pará	69	69	304	539	882	1467	1657	1773	1958	2048	1905
Espírito Santo	252	254	144	159	230	252	400	535	1168	1632	1306
São Paulo	1998	2470	4183	4104	5263	5351	2596	1612	2158	2000	1072
Minas Gerais	264	264	265	269	300	389	407	739	630	550	455
Rio Grande do Sul	150	126	201	184	238	300	374	400	510	501	401
Rio de Janeiro	1969	2221	2024	2505	2119	2458	2328	950	560	387	330
Goiás	-	-	-	-	54	62	55	107	89	148	214
Fonóndia	12	19	31	32	75	81	89	196	177	243	211
Amazonas	117	142	42	48	65	94	106	106	110	198	198
Paraná	45	70	111	192	246	224	228	220	209	190	192
Pernambuco	287	137	134	146	146	159	200	210	213	158	188
Paraíba	22	52	50	51	56	77	92	172	172	162	160
Sub-Total(1)	5360	6033	7726	8462	10097	11629	9306	7850	8857	12955	14473
Brasil(2)	5612	6308	7992	9162	10390	11953	9600	8228	9277	13409	14953
1 ÷ 2 (%)	95,5	95,6	96,7	92,3	97,2	97,3	96,9	95,4	95,5	96,6	96,8

* Dados obtidos diretamente no IBGE/Rio de Janeiro (não publicado)

TABELA 4. Rendimento médio (1000 frutos/hectare) no Brasil e principais Estados produtores período 1975/1985.

	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985*
Goiás	N	N	N	N	70	12,0	15,4	22,9	61,0	86,3	72,8
Espírito Santo	10,8	13,9	13,8	12,3	20,0	24,9	32,1	62,0	51,6	92,5	67,2
Pará	8,9	8,9	32,4	68,3	56,9	55,9	61,5	55,9	56,4	56,7	53,9
Bahia	14,3	13,8	15,1	15,5	18,2	21,7	22,1	21,6	20,9	51,5	52,5
São Paulo	16,5	20,5	17,2	19,7	24,0	25,2	38,8	44,7	27,8	35,3	35,9
Paraíba	11,6	8,4	8,9	9,6	10,2	11,6	12,1	29,7	28,2	30,0	31,0
Amazonas	4,8	4,8	32,9	42,7	43,7	44,8	43,1	44,9	44,2	28,0	28,4
Paraná	18,6	12,4	34,2	22,4	23,1	21,5	25,3	23,0	20,0	20,0	19,6
Minas Gerais	10,0	10,6	11,2	12,8	12,4	11,7	16,5	19,7	33,8	24,8	18,5
Pernambuco	7,9	13,1	17,0	20,1	20,0	18,8	31,0	23,6	21,7	15,5	18,3
Rio de Janeiro	14,7	14,6	14,9	14,3	10,2	6,6	8,7	15,9	17,7	16,8	15,3
Rondonia	4,5	5,3	5,0	3,1	15,3	8,4	12,5	7,2	9,4	14,8	11,5
Rio G. do Sul	11,2	11,0	13,0	11,1	12,8	16,3	16,8	15,3	12,4	11,0	10,7
Sub-total	14,2	16,1	16,9	20,6	22,9	23,9	31,2	35,9	35,3	49,4	48,0
BRASIL	14,6	16,4	17,1	20,0	22,8	23,8	30,8	35,2	34,6	48,4	47,1

* Dados obtidos diretamente no IBGE/Rio de Janeiro-RJ (não publicado)

No Brasil, devido principalmente ao problema do mosaico do mamoeiro, a cultura não tem sido fixada num mesmo local ou município, com alterações muito frequentes em relação às principais regiões produtoras. Isto pode ser confirmado pela Tabela 2, que demonstra que até 1980, São Paulo era o Estado maior produtor, sendo superado pelo Pará até 1983, e a partir de 1984 a Bahia passou a ser o maior produtor nacional, mas apesar da Bahia ter a maior produção nacional, sua produtividade é baixa quando comparada com a produtividade média brasileira, (Tabela 4). Pode-se observar que a cultura está se dirigindo às regiões Norte-Nordeste e Centro-Oeste, saindo da região Sudeste, caracterizando o mamoeiro como uma cultura nômade.

Segundo dados apresentados por TAVARES(1988) durante o 2º Simpósio Brasileiro Sobre a Cultura do Mamoeiro os países maiores importadores de mamão brasileiro em 1986 são em ordem decrescente: Reino Unido, Alemanha Ocidental, França, Holanda, Itália, Suíça e Bélgica.

2.2. FATOR LIMITANTE DA PRODUÇÃO

O mosaico do mamoeiro, causado por ("Papaya Ringspot virus") é uma das mais destrutivas doenças do mamão (*Carica papaya* L.), é considerado o fator limitante da

produção em vários países (NAMBA, 1988) como Hawai (JENSEN, 1949; GONSALVES & ISHII, 1980), Flórida (COOK & ZETTER, 1970) África (LANA, 1980); Índia (SINGH, 1969) e nas ilhas do mar do Caribe (QUIOT-DOUINE *et alii*, 1986).

No Brasil, a ocorrência do mosaico foi constatada em municípios do Estado de São Paulo por volta de 1968 por COSTA *et alii* (1969a). No Ceará seu reconhecimento se deu em 1974 por LIMA & GOMES (1975). No Paraná ocorreu em 1974, descrito por ALMEIDA & CARVALHO (1978) e em Pernambuco foi verificado por PAGUIO & BARBOSA (1979).

Segundo REZENDE (1985), a presença do mosaico também foi detectada no Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia, podendo com o tempo vir a ocorrer em todas as áreas produtoras do País. Dados apresentados durante o 2º Simpósio Brasileiro Sobre a Cultura do Mamoeiro (1988), demonstra que a virose apresenta-se muito preocupante na região do Sul da Bahia, maior área produtora de mamão.

CARVALHO & PONTE (1985) destacam que no Ceará o principal fator limitante da produção vem a ser a Meloidoginose, causada por nematóides, seguida da antracnose e o mosaico, sendo que este último causa danos relativamente pequenos em relação aos anteriores.

As partículas do vírus do mosaico do mamoeiro de ocorrência no Brasil (COSTA *et alii*, 1969b), caracteri

zaram-se por apresentar comprimento médio de 800 nm, 12 nm de diâmetro e são do tipo flexível segundo descrições de *BOKX (1965)* e *LANA (1980)*. Esse vírus é colocado no grupo dos "potyvirus" de acôrdo com o sistema de classificação em grupos proposto por *HARRISON et alii (1971)* e induzem formação de inclusões amorfas e do tipo catavento no citoplasma dos tecidos infestados, *ZETTLER et alii (1968)*.

De acôrdo com vários autores como *BOKX (1965)*; *COSTA et alii (1969b)*; *YEH & GONSALVES (1984)* no campo a transmissão natural se dá por meio de afídeos, sendo a relação vírus-vetor não persistente (*JENSEN, 1949* e *YEH & GONSALVES, 1984*). Vinte espécies de afídeos já foram testadas experimentalmente e consideradas vetores desse vírus. No Brasil, *COSTA et alii (1969b)*; *PAGUIO & BARBOSA (1979)* e *BARBOSA & PAGUIO (1982)* verificaram que as espécies, *Mysus persicae* sulzer; *Aphis gossypii* Glover; *Aphis fabae* Scop., *A. coreopsides* (Thos.), *Aphis* spp.; *Dactynotus* sp e *Toxoptera citricidus* Kird deram resultados positivos de transmissão. Experimentalmente esse vírus é facilmente transmitido através da inoculação mecânica (*JENSEN, 1949*; *COSTA et alii, 1969a* e *LANA, 1980*).

COSTA et alii (1969b) enfatizam a possibilidade do vírus passar de mamoeiro afetado para abóboras e outras curcubitáceas e vice-versa.

Procurando medidas mais efetivas para o controle dessa virose, várias linhas de pesquisa estão sendo desenvolvidas. REZENDE (1985) tem estudado a premunização das plantas jovens com isolados fracos dos vírus de valor protetivo para obtenção de resistência ao vírus, LITZ & CONOVER (1979; 1981a e 1982) tem procurado variedades resistentes por meio de cruzamentos interespecíficos e REZENDE *et alii*, 1985 por mutações induzidas.

Vários trabalhos foram desenvolvidos procurando variedades resistentes a virose do VMM dentro da espécie papaya (COOK & ZETTLER, 1970; CONOVER, 1976 e LITZ & CONOVER, 1978b) sendo que somente algumas espécies de *Carica* são resistentes ao VMM, mas elas não hibridizam facilmente com papaya (HOROVITZ & JIMENEZ, 1967, CONOVER, 1976 e NAKASONE, 1988).

HOROVITZ & JIMENEZ (1967) citam algumas espécies de *Carica* que apresentam resistência a vírus, como *C. pubescens*, *C. stipulata*, *C. heilbornii* e *C. cauliflora*; cruzamentos destas espécies com *C. papaya* deram resultados negativos.

No trabalho de ZERPA (1959) ficou demonstrado, por estudos cariológicos, que os híbridos interespecíficos citados por HOROVITZ & JIMENEZ (1967) foram bivalentes na metáfase I, demonstrando afinidade genética entre espécies.

Entre cruzamentos interespecíficos ocorrem resultados adversos, como no caso em que as flores polinizadas ou os frutos pequenos se desprendem poucos dias após polinização. Pode ocorrer caso em que os frutos se desenvolvem, não ocorrendo a formação das sementes porque não é raro partenocarpia em *Caricaceae*. Em certos cruzamentos formam-se sementes com esclerotesta, de aspecto exterior normal, mas vazias por dentro. Dissecando estas sementes quando jovens pode-se constatar que algumas possuem embrião porém, não endosperma. Estes embriões imaturos podem ser cultivados "in vitro", podendo obter-se um híbrido.

Segundo *CONOVER (1976)* além da cultura de embriões usada para contornar os problemas de incompatibilidade entre papaya e outras espécies de *Carica* sp, a cultura de anteras pode ser usada para produzir plantas haplóides que podem ser tratadas com colchicina para tornarem-se diploides homozigotas. Esta metodologia resulta numa grande diminuição do tempo necessário para se obter linhagens homozigotas por processos de melhoramento normal.

A técnica da fusão de protoplastos pode ser utilizada em *Carica papaya* L. como descrito por *LITZ & CONOVER (1979)* que obteve protoplastos de folhas de plantas jovens

Este autor também descreveu a obtenção de embriões somáticos de *Carica stipulata* que apresentam resistência ao vírus do mosaico do mamoeiro. Esse trabalho sugere a possibilidade de fundir protoplastos de células

de *Carica stipulata* com protoplastos de *C. papaya* transferindo a resistência para *C. papaya*.

Segundo REZENDE (1985), uma medida para o controle da virose também poderia ser conseguida por premunização de plantas jovens com isolados fracos dos vírus de valor protetivo. Plantas premunizadas da região de Taiacu e Monte Alto mostraram intensificação na severidade dos sintomas, devido principalmente a alterações dos isolados fracos nas plantas. Houve aparecimento de mutantes mais severos e competitivos. A dificuldade da premunização como medida de controle do mosaico do mamoeiro está na dependência de obtenção de isolados fracos estáveis que não sofram alterações durante o período de vida útil da cultura.

REZENDE (1984), procurando obter plantas mutantes resistentes ao vírus do mosaico do mamoeiro, utilizou radiações gama em sementes de mamão IAC-98. Como observaram COSTA & CARVALHO (1971), essa variedade apresenta certo nível de tolerância ao vírus. Das plantas obtidas, as sementes foram plantadas produzindo a geração M_2 e estas as M_3 .

REZENDE et alii (1985), avaliaram as progênes autofecundadas de IAC-98 gerações M_2 e M_3 . Os testes para resistência verdadeira deram resultados negativos sugerindo que a tolerância encontrada em IAC-98 é provavelmente condicionada por poucos gens recessivos.

Deste modo, as técnicas de cultura de tecidos demonstram ser um instrumento efetivo no controle dessa virose na cultura do mamoeiro.

2.3. CULTURA DE TECIDOS DE MAMÃO

Além de alargar os horizontes para a compreensão dos fenômenos bioquímicos e fisiológicos responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das células, tecidos e órgãos vegetais, e assim proporcionar meios para melhor controlá-los, a técnica da cultura de tecidos "in vitro" é um excelente instrumento auxiliar no melhoramento de culturas de interesse econômico, como o mamão, bem como a propagação vegetativa das espécies.

Certos fatores que influenciam na produtividade de uma cultura, como a do mamoeiro (*Carica papaya* L.) por exemplo, podem ser contornados, e com excelentes resultados, utilizando-se essa tecnologia (SHARP & CROCOMO, 1975 e CROCOMO & OCHOA-ALEJO, 1983).

O mamoeiro quando planta dióica, possui polinização aberta, a propagação é geralmente através de sementes resultando em alto grau de variabilidade nas características morfológicas (ARORA & SINGH, 1978b). Plantações co

merciais podem chegar a ter até 30% de plantas do sexo masculino, mas somente as plantas fêmeas e hermafroditas são produtivas (JORDAN *et alii*, 1983, SIMÃO, 1971). conhecido que propagação vegetativa de mamão, através de métodos convencionais como estaquia e enxertia não são muito bem sucedidos. Uma alternativa para propagação de plantas de mamão é através da cultura de tecidos (ARORA & SINGH, 1978b; LITZ & CONOVER, 1977 e RAJEEVAN & PANDEY, 1983).

LITZ & CONOVER (1978a) apontam para a necessidade de um método para preservação e propagação rápida de germoplasma com tolerância ao vírus do mosaico do mamoeiro e com boas qualidades hortícolas. Alguns autores como ARORA & SINGH (1978 b), ²DE BRUIJNE *et alii*(1974), MEDHI & HOGAN (1976) e YIE & LIAW (1977) consideram propagação passando pela fase de calo. Segundo LARKIN & SCOWCROFT, 1981 as células dos calos possuem diferentes níveis de ploidia e modificações nos cromossomos demonstrando não ser ideal para um sistema de propagação vegetativa, mas de grande importância para produção de variantes somaclonais.

DE BRUIJNE *et alii* (1974) citados por LITZ & CONOVER (1977), foram os primeiros pesquisadores a induzir

²DE BRUIJNE, E.; DE LANGHE, E.; VANRIJCK, R. Actions of hormones and embryoid formation in callus culture of *Carica papaya*. *International Symp. Fytofarm. Fytiat.* 26(1): 637-645, 1974.

calos a partir de tecidos de mamão e utilizaram como explante segmentos de pecíolos de plântulas. Outros tipos de explantes, como segmentos de caulículo foram utilizados para estabelecimento da cultura de calos (LITZ & CONOVER, 1977; YIE & LIAW, 1977; ARORA & SINGH, 1978 a,b,c; MEDORA et alii 1973 e 1979; JORDAN et alii, 1983). LITZ et alii (1983) obtiveram calos a partir de cotilédones sendo que outras partes da planta como óvulos, anteras e raízes podem ser usadas como explantes.

O melhor meio de cultura básico para cultura de tecidos de mamão parece ser o de MURASHIGE & SKOOG (1962) sendo que o meio de WHITE (1963) também é usado (LITZ & CONOVER, 1981 a,b,c e MEDORA et alii, 1979). YAMAMOTO et alii (1986) utilizaram meio básico de LISMAYER & SKOOG (1965) para indução de calo, ARORA & SINGH (1978 b) também observaram crescimento de calo de até aproximadamente 50 vezes o tamanho do explante usando solução salina de LISMAYER & SKOOG (1965).

De acordo com MEDORA et alii (1979), nitrogênio na forma amoniacal é essencial para crescimento de calo. Benzilaminopurina (BAP) demonstrou ser inibidora e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) estimulou o crescimento. MEDORA et alii (1973) e YAMAMOTO et alii (1986) usaram a auxina 2,4-D como indutor de crescimento de calo. Por outro lado, DeBRUIJNE et alii (1974), ARORA & SINGH (1978 b,c) e

YIE & LIAW (1977) encontraram bom crescimento de calo com NAA. *ARORA & SINGH (1978a)* observaram que IAA e 2,4-D inibiram a formação de calo. *LITZ & CONOVER (1977)* obtiveram crescimento de calos utilizando IAA em interação com cinetina e BAP.

Utilizando como explante, pedúnculo de *C. stipulata*, *LITZ & CONOVER (1980)* obtiveram culturas de calos com 0,5 mg/l de BAP e 0,1 mg/l de NAA.

ARORA & SINGH (1978 a,b) e *YIE & LIAW (1977)* utilizaram cinetina para obterem crescimento de calo. De *BRUIJNE et alii (1974)* obtiveram melhor produção de calo quando o meio foi suplementado com 2iP, enquanto que *LITZ & CONOVER (1980)* utilizaram BAP. Observa-se que ocorre muita divergência entre os vários autores, mas é aparente que condições ótimas para indução e crescimento de calo de mão são proporcionadas pelo NAA junto com alguma citocinina como cinetina, 2iP ou BAP (*LITZ, 1984*).

Em seu trabalho *YIE & LIAW (1977)* observaram não somente formação de embriões somáticos mas também a formação de caules adventícios em presença de IAA mais cinetina ou somente com cinetina. *ARORA & SINGH (1978c)* encontraram que era necessário transferir os calos do meio de indução de calo para um meio de indução de parte aérea para se obter regeneração de plantas. Alta taxa cinetina/NAA pa-

rece ser favorável para diferenciação em ápices e quando a taxa cinetina/NAA é baixa, ocorre maior diferenciação dos calos em raiz.

LITZ et alii (1983) obtiveram raízes adventícias a partir de calo de cotilédones de mamão em saís de *MURASHIGE & SKOOG (1962)* com NAA e BAP. *MEDHI & HOGAN (1976)* observaram formação de raiz utilizando ácido Indol Butírico (IBA), mas estas apresentavam-se com geotropismo negativo.

Embriogênese somática por via direta e indireta pode ser observada em várias espécies de *Carica* (*GEORGE & SHERRINGTON, 1984*). *DeBRUIJNE et alii (1974)* induziram embriogênese em calos de segmentos de pecíolo de plântulas de *C. papaya*, utilizando os reguladores de crescimento, NAA mais 2iP ou BAP. *LITZ & CONOVER (1980)* desenvolveram cultura em suspensão de *C. stipulata*, adicionando carvão ativado em combinação com NAA e BAP, estimulando a formação de embriões após 6-8 semanas.

JORDAN et alii (1983) induziram embriogênese somática em calos obtidos a partir de *C. candamarcensis*, a única espécie que cresce nas regiões temperadas da costa do Chile podendo ser de grande importância para cruzamentos, como objetivo de transferir resistência a baixas temperaturas em *C. papaya*.

Outros Autores, como *LITZ & CONOVER (1981c)*,

1982), descrevem a indução de poliembrionia e conseguiram controlar a embriogênese somática a partir de calo ovular do cruzamento de *C. cauliflora* e *C. papaya*. A competência embriogênica foi induzida utilizando meio de WHITE (1963), em ausência de água de côco, sendo que a presença no estabelecimento da cultura geralmente era necessária para induzir alta frequência embriogênica.

Espécies de *Carica* são sexualmente incompatíveis (NAKASONE, 1988). A obtenção de híbridos interespecíficos particularmente entre *C. papaya* e *C. cauliflora* Jacq é de grande interesse, esta última espécie apresenta resistência a infecção por vírus. A incompatibilidade entre ambas é possivelmente devido a falha na formação do endosperma. Embriões maduros de *C. papaya* foram cultivados "in vitro" com sucesso por LITZ (1984). Embriões imaturos, advindos do cruzamento entre ambas as espécies citadas anteriormente, foram cultivados por KUSPE *et alii* (1980) em meio sólido em ausência de vitaminas, e na presença de sacarose, cloreto cúprico e molibdato de sódio, no escuro, obtendo-se regeneração de plantas, as quais posteriormente foram cultivadas em presença de vitaminas e de glicina.

LITZ & CONOVER (1978a) descrevem a recuperação de plantas haplóides de *C. papaya* quando cultivaram anteras retiradas de botões florais e colocadas em meio MS lí

quido. Esse meio foi suplementado com Benzilaminopurina , ácido naftalenoacético e carvão ativado. A taxa de regeneração de plantas foi de 1 para cada 1000 anteras cultivadas. A contagem de cromossomos indicou que as plantas regeneradas possuíam o número haplóide ($n=9$).

MEHDI & HOGAN (1976) estabeleceram a cultura de ápice a partir de plântulas de mamão em meio de *MURAS HIGE & SKOOG (1962)* contendo cinetina e enraizamento em meio com cinetina e IBA, mas eles não observaram de formação brotações e de parte aérea durante enraizamento.

Meio MS acrescido de IAA mais cinetina ou BAP, promove a micropropagação, quando ápices de plântulas de mamão são cultivados "in vitro" (*YIE & LIAW, 1977*). *LITZ & CONOVER (1977; 1978a)* desenvolveram um procedimento para estabelecimento da cultura de ápices retirados de plantas adultas no campo, por causa da variabilidade em plantas de mamão propagadas comercialmente.

LITZ & CONOVER (1981a) descrevem que o tempo de estabelecimento e taxa de proliferação eram dependentes da idade das plantas mães, da época do ano, sexo e da presença de contaminantes bacterianos e/ou vírus. Observaram que plantas estaminadas responderam mais rapidamente que plantas pistiladas e tinham maior proliferação. A capacidade de manter cultura proliferando foi perdida após 8-13 subculturas, sendo que as plantas foram bem sucedidas no estabelecimento no campo.

2.4. EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NO CRESCIMENTO DE CALOS "in vitro"

Exposição de plantas ou partes de plantas como células, tecidos, órgãos e sementes à doses apropriadas de radiações ionizantes pode induzir mudanças citológicas, genéticas, fisiológicas e morfológicas resultando em modificações no crescimento e desenvolvimento do organismo (*GUNCKEL & SPARROW, 1961*).

Enquanto grande número de trabalhos foram deseenvolvidos verificando efeito das radiações ionizantes em animais, sementes e plantas, poucos pesquisadores tem dado atenção para estudo dos efeitos da radiação em cultura de tecidos vegetais. A partir de 1965, quando *VASIL & HILDEBRANDT*, obtiveram plantas completas a partir de células isoladas, estudos radiobiológicos puderam ser melhor estu dado e entendidos.

Radiação gama é um tipo de radiação ionizante, a qual segundo *KLEIN & KLEIN (1971)* é qualquer tipo de radiação eletromagnética, com comprimentos de onda abaixo

de 100 nm, capazes de provocar a ionização da água. Tem sido muito empregada em pesquisas utilizando radiações em sistemas biológicas devido a ser penetrante e interagir com os elementos da célula.

As radiações ionizantes, independente de sua ação direta ou indireta, provocam alterações no metabolismo celular. Segundo *KLEIN & KLEIN (1971)*, essas alterações são devido a desequilíbrio oxidoredução, desaminação oxidativa dos aminoácidos, descarboxilação dos ácidos nucleicos e competição entre as substâncias pelos radicais livres.

De acordo com *SHEPPARD & EVENDEN (1986)*, os efeitos bioquímicos das radiações ionizantes são devido a formação de radicais livres nos tecidos por conterem água, que em seguida formam peróxidos e quinonas, podendo causar grande número de importantes reações, incluindo alterações nos genes levando a modificações na síntese de proteínas.

Os efeitos bioquímicos das radiações ionizantes foram estudados por *SCHIAVUZZO (1986)* em células de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) irradiadas com baixas doses (0-5-15 Krad). Foi observado escurecimento nos calos com 15 Krad, possivelmente devido aos efeitos diretos da radiação sobre auxinas.

BAJAJ et alii (1970) estudaram o efeito de várias doses de radiação gama emitidas por uma fonte de

6

^oCo em sementes, plântulas e cultura de calos de *Phaseolus vulgaris* L., concluindo que as células dos calos toleram doses maiores de radiação. Atribuíram que essa radiorresistência observada nos calos poderia ser devido ao estado indiferenciado das células, simplicidade estrutural, diversos níveis de ploidia e menor interdependência celular.

A utilização da radiação gama induzindo mutações pode ser muito útil para alterar uma ou mais características, particularmente em espécies propagadas vegetativamente, como em plantas ornamentais quando alterações na cor das flôres ou a produção de plantas sem formação de pólen pode ser desejável economicamente. Também em espécies florestais que se propagam vegetativamente, deve-se procurar desenvolver técnicas que produzam mutantes a partir de clones altamente produtivos, apresentando resistência a doenças, capacidade para formar copas e alterar hábitos morfológicos (DOUGLAS, 1986).

Segundo VOSE (1980) radiações ionizantes tem a propriedade de induzir mutações em plantas, apesar da maioria das radiações apresentar efeito prejudicial no desenvolvimento, o fato de aumentar a variabilidade genética pode ser de grande interesse para os melhoristas, aumentando a possibilidade de obter características desejáveis.

A utilização de radiações ionizantes em cul-

tura de tecidos vegetais com posterior regeneração de plantas tem sido enfatizado por alguns autores como uma técnica promissora para a obtenção de "mutantes". De acordo com HELL (1979), irradiando "tecidos haplóides" e logo em seguida promovendo a diploidização destes tecidos, pode-se conseguir plantas mutantes diplóides isogênicas sem sofrer o risco de ocorrer quimera (quando existe heterogeneidade genética).

Poucos anos após a descoberta do raio X em 1895, observou-se seu efeito estimulante no crescimento de plantas. Autores como SKOK *et alii* (1965), HOLSTEN *et alii* (1965) e BAJAJ *et alii* (1970) observaram efeito de estímulo no crescimento com baixas doses de radiação ionizante e resultados inversos utilizando altas doses de radiações ionizantes.

SHEPPARD & EVENDEN (1986) irradiando sementes de trigo (*Triticum aestivum* 'Columbus'), cevada (*Hordeum vulgare* 'Bedford') e linho (*Linum usitatissimum* 'Norlin'), notaram que a emergência e o crescimento inicial era aumentado, mas este efeito estimulatório não era persistente até os últimos estádios de desenvolvimento, observando que variações na frequência do crescimento era muito influenciado pela umidade da semente.

BAJAJ (1970) obteve significativo estímulo no

crescimento em feijão com baixa dose de radiação (0,5 Krad). O mesmo foi encontrado por *HOLSTEN et alii* (1965) com cultura de células de cenoura e por *PANDEY & SABHARWALL*, 1978), com cultura de calos de *Haworthia mirabilis* Haw.

WERRY & STOLFFELSEN (1981) demonstraram que estímulo do crescimento é devido ao aumento do tamanho das células (alongação celular), pois observaram aumento na massa de matéria fresca das células, sendo que a massa de matéria seca era constante. *BAJAJ* (1970) e *BAJAJ et alii* (1970) verificaram que doses de radiação entre 1 e 10 Krad as células de feijão apresentavam deformidades no tamanho e na forma, com inibição mitótica e o núcleo apresentando-se com a cromatina condensada, havendo aumento de poliploidia, contração do citoplasma e escurecimento da parede celular. Doses de 20 e 30 Krad reduziam drasticamente o crescimento.

Irradiando-se cultura de células de amendoim (*Arachis hypogaea*) com radiação gama (500 Krad) *VERMA & HUUSTEE* (1971 a, b) observaram formação de células gigantes, com tamanho de 10 a 15 vezes o normal; a forma e o tamanho das células gigantes eram altamente variáveis e a frequência destas células aumentava após 4 a 5 semanas da irradiação. Estas células apresentavam citoplasma denso com grande número de grãos de amido e eram capazes de sintetizar os constituintes necessários para alongação celular. Demonstrou-se que ocorre síntese proteica mesmo após alta irradiação e na ausência de síntese do DNA; enquanto o conteúdo de DNA

era baixo, o conteúdo de proteína em células gigantes radioenduzida era igual ou maior que o controle. *ROMANI & FISCHER (1966)* demonstraram que síntese de proteína mitocondrial "in vitro" é inibida imediatamente após irradiação (250 Krad) mas é recuperada a níveis próximos do controle 24 horas após irradiação.

Dos trabalhos de *HABER et alii (1961)* surgiu a tese , de que as células vegetais que se encontram num estágio de não divisão celular na ocasião da irradiação, apresentam determinada radioresistência. Plantas originadas de sementes de trigo (*Triticum aestivum*) irradiadas eram capazes de sintetizar RNA, proteínas e enzimas, realizar fotosíntese e obter energia pela respiração e passar por o ciclo de diferenciação celular. Estas plântulas formavam se a partir de crescimento de diferenciação do embrião apenas por expansão e diferenciação celular. O DNA, desde que não solicitado à replicação, pode permanecer funcional durante todo o ciclo celular, transcrevendo os RNAs necessários para a diferenciação e regulação metabólica das células. *HELL (1978)* demonstrou a diferença na radiosensibilidade dos dois processos de desenvolvimento nas plantas, sendo o processo de divisão celular fortemente afetado e os de expansão e diferenciação celular extremamente resistentes.

É concebível que a deficiência de divisão celular é um dos fatores que pode levar a formação de células gigantes, levando a morte (INOUE & HUUSTEE, 1984).

VERMA & HUUSTEE (1971^a) analisaram síntese de proteína em células após três dias em meio irradiado, em diferentes doses de radiação, verificando que a síntese não foi afetada até 50 Krad, diminuindo entretanto, com doses maiores. Notaram também que a síntese proteica continua em aproximadamente 45-55% do nível do controle após utilizar dose de 500 Krad. Cultura de células irradiadas transferidas para meio não irradiado foi somente 10% afetado com 500 Krad, após 8 dias em cultura, demonstrando que o meio de cultura influi bastante na radiosensibilidade.

O trabalho de POLLARD (1964) indica que o estágio de transcrição DNA-RNA é altamente radiosensível. Pela análise da síntese proteica durante o período pós-irradiação, observou-se que proteínas com grande peso molecular são quebradas direta ou indiretamente em frações de baixo peso molecular. Embora síntese proteica mostre uma aparente recuperação após irradiação massiva, as proteínas sintetizadas durante o período pós-irradiação são marcadamente diferentes das proteínas normalmente sintetizadas por células não irradiadas. A indução de tais erros no metabolismo das proteínas após irradiação pode resultar na formação de células gigantes, crescimento anormal e subsequente morte das

células.

O trabalho de DUBUC-LEBREUX & VIETH (1987), estudando os efeitos da radiação gama em gerbera (*Gerbera jamesonii*) demonstrou que o efeito estimulador ou inibidor depende da dose total, do estágio de desenvolvimento do material e da espécie. Observaram que as brotações laterais, são mais radiosensíveis que as células dos calos, o que já fora observado por BAJAJ (1970). O grau de radioresistência das plantas varia em função da espécie. Um tratamento com 10 Krad em *Vigna sinensis* reduz o crescimento em 50% enquanto em *Gerbera jamesonii*, apenas com 2-3 Krad ocorre mesma diminuição no crescimento. O número de brotações é reduzido a metade após exposição a 5 Krad (taxa de 0,84 Krad/h) ou após exposição a 2 Krad (taxa de 60 Krad/h). Tratamentos com radiação gama afetam além do número de brotações, o vigor das mesmas. Demonstraram também o efeito indireto gerado a partir do meio de cultura irradiado, podendo inibir ou estimular o crescimento dos calos e suspensões celulares quando somente o meio é irradiado (HOLSTEN *et alii*, 1965), podendo intervir no estímulo da organogênese (AMMIRATO & STEWARD, 1969). DUBUC-LEBREUX & VIETH (1987) verificaram que um único tratamento de 3 Krad diminuía a taxa de multiplicação, a massa de matéria fresca dos calos regenerados. Por outro lado, administrando a mesma dose, mas fracionada, 1 Krad em três vezes, em intervalo de

48 horas, ocorreu diminuição na intensidade dos efeitos prejudiciais. O meio de cultura pode interferir quanto aos diferentes efeitos de uma dose única ou fracionada, e ainda quanto a diferentes concentrações de auxina com efeito sobre a morfogênese "in vitro" (HELL *et alii*, 1978).

Tratamentos em doses fracionadas são muito úteis em gerbera pois interferem muito pouco na taxa de multiplicação; a redução no peso dos caulículos regenerados é menor, assegurando a obtenção de maior número de caulículos viáveis (DUBUC-LEBREUX & VIETH, 1987).

Indução de organogênese foi demonstrada por HELL (1983), usando cultura de calos haplóides e diplóides de *Nicotiana tabacum* L., verificando-se que células com menor número de cromossomos são mais sensíveis aos efeitos da radiação.

De acordo com SKOOG (1944), as auxinas inibem a formação de gemas em calos de tabaco mantidas no escuro e coloca a possibilidade das radiações ionizantes inativar o IAA. DEGANI (1975) irradiou com 5 Krads (taxa de 5 Krads/min) IAA, cinetina e m-inositol e observou que somente m-inositol induziu desenvolvimento de gemas, sendo possível que tenha ocorrido a formação de uma nova substância a partir do m-inositol responsável pela indução. O autor também verifica que a idade do inóculo é o número de

subculturas afeta o potencial morfogênético.

Fitorreguladores podem reverter ou ao menos diminuir os efeitos deletérios causados pelas radiações ionizantes em células ou tecidos (*CROCOMO et alii*, 1982). *FERRERA* (1983) demonstrou ser possível a reversão do efeito deletério da irradiação gama sobre células de cana-de-açúcar cultivadas "in vitro" em presença de cinetina (1 mg/ℓ) e ácido indolacético (1 mg/ℓ) permitindo o desenvolvimento de calos e posterior diferenciação em parte aérea.

CHAUHAN & SINGH (1975) demonstraram que pequenas injúrias causadas por radiação gama em ápices de açúcar (*Carthamus tinctorius* Linn.) tratadas com 10 ppm de 2,4-D, se recuperaram.

PANDEY & SABHARWAL (1978) demonstraram que calos de *Haworthia* irradiados com 1-2 Krad, com taxa de 0,19 Krad/h, cresciam continuamente mas não sofria diferenciação; análises demonstraram a formação de fatores de divisão celular ou citocininas, as quais não apareciam nos tecidos não irradiados. Por sua vez, *WERRY & STOFFELSEN* (1981) observam que indução de cinetina é mais eficiente em maiores taxas de dose em células de *Haplopappus* crescendo em suspensão irradiadas com Raios X.

De acordo com *JONARD et alii* (1979), as cito-

cininas quando adicionadas ao meio de cultura, logo após irradiação, fazem com que as células adquiram capacidade de proliferação celular e divisão. As enzimas ou as moléculas cuja síntese ocorrem devido a citocininas são radiosensíveis; a adição de citocininas após irradiação pode provocar proliferação celular e divisão celular, provocando uma restauração notável no metabolismo.

O fluxo de metabólitos nas células para os sítios de síntese e o transporte de íons, podem ser facilitados grandemente pelas citocininas, pois agem na permeabilidade celular.

As citocininas aumentam a síntese proteica (KLAMBT, 1976) e, podem aumentar a síntese de proteínas específicas indispensáveis a iniciação da proliferação celular com a formação de polirribossomos (FOSKET *et alii*, 1977).

GIACOMELLI *et alii* (1967) encontraram variação na síntese proteica em folhas de cevada irradiadas. Utilizando tratamentos com cinetina, as folhas apresentaram menor decréscimo no conteúdo de proteína, principalmente para as mais altas doses. Segundo esses Autores, a radiação determinaria um aumento na permeabilidade dos tecidos, o que promoveria a penetração da cinetina, aumentando sua efetividade ou então, a radiação modificaria algumas vias metabólicas essenciais para a ação da cinetina na síntese de proteínas.

BAJAJ (1970), encontrou que a baixas doses (0,5 a 1,0 Krad) não houve diferenças significativas para cultura de feijão irradiado; a partir de 2 Krad houve aumento gradual no nitrogênio total. Com o tempo, o crescimento dos calos diminuiu. O aumento de nitrogênio total foi considerado como devido à mudanças quantitativas no nitrogênio não proteico advindo do acúmulo de produtos do catabolismo.

IQBAL et alii (1973) observaram um aumento de aminoácidos livres em raízes de plântulas de milho com 10 dias, irradiadas com doses de 10 e 15 Krad. Na parte aérea ocorreu decréscimos, exceto a 20 Krad quando houve um pequeno aumento. Em raízes houve um aumento em lisina e valina na dose de 5,0 Krad. Foi observado que o nitrogênio α -amínico na parte aérea diminuiu em todos os tratamentos (exceto a 20 Krad) enquanto o nitrogênio proteico aumentou significativamente em todas as doses.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Seção de Bioquímica de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), no Campus da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba-SP.

As sementes de mamoeiro (*Carica papaya*), utilizadas para o trabalho foram da variedade 'Improved Sunrise' Solo 72/12, obtidas através da Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária (EMCAPA), Vitória, Estado de Espírito Santo.

3.1. GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

As sementes de mamoeiro, foram lavadas com solução de detergente neutro e enxaguadas em água corrente, para que ficassem livres da camada gelatinosa (sarcotesta) que acompanha a maioria das sementes.

Após a lavagem, as sementes foram germinadas em vermiculita e/ou assepticamente em tubos de ensaio.

3.1.1. GERMINAÇÃO DAS SEMENTES EM CONDIÇÕES ASSÉPTICAS

Após a lavagem para retirar a sarcotesta, as sementes foram esterilizadas, em câmara de fluxo laminar, utilizando solução comercial de hipoclorito de sódio (Q-Boa) 20% v/v, em presença de tween 20, 0,1%, permanecendo sob agitação durante 20 minutos. Em seguida as sementes foram enxaguadas quatro vezes com água deionizada estéril e imediatamente, inoculadas em tubos de ensaio contendo algodão embebido em solução de *MURASHIGE & SKOOG (1962)* (MS), mais sacarose nas diferentes concentrações: 0-5-10 e 20 g/l. O valor do pH foi ajustado para 5,7.

Fêz-se 50 repetições de cada tratamento.

3.1.2. GERMINAÇÃO DAS SEMENTES EM VERMICULITA

Sementes de mamão (*Carica papaya* L.), após lavagem foram colocadas para germinar em bandejas com vermiculita previamente esterilizada em autoclave à 120°C e 1 atm de pressão, durante 20 minutos.

As bandejas foram regadas semanalmente com

solução salina de *MURASHIGE & SKOOG (1962)* e com água destilada em intervalos semanais.

3.1.3. CONDIÇÕES DE GERMINAÇÃO

As sementes contidas em tubos de ensaio e em bandejas de vermiculita foram colocadas para germinar em sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 14/10 horas (luz/escuro).

3.2. OBTENÇÃO DOS EXPLANTES E ASSEPSIA

Plântulas com 25 a 40 dias após a semeadura apresentavam-se com aproximadamente 6 cm de comprimento e 2 pares de folhas, tamanho apropriado para retirada dos explantes.

Para o estabelecimento da cultura de calo foi utilizado como explante segmentos do hipocótilo; ápice caulinar foi utilizado como explante para a micropropagação da cultura.

A assepsia dos explantes (vindos de sementes germinadas em vermiculita) consistiu de lavagens em solução de água e detergente neutro (Tween 20), enxaguadas em água

corrente. Posteriormente, em condições assépticas, fêz-se esterilização com solução comercial de hipoclorito de sódio (Q-Boa), na concentração 20% (v/v), mais Tween 20 (0,1%) durante 20 minutos sob agitação. Em seguida fêz-se 4 lavagens em água deionizada estéril.

Após a esterilização, os hipocótilos foram cortados em segmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento e imediatamente inoculados em meio de cultura.

Das plântulas germinadas em tubos de ensaio, foram separados os explantes e imediatamente inoculados em meio de cultura sem necessidade de esterilização, pois já se encontravam em condições assépticas.

3.3. MEIO DE CULTURA BÁSICO

Para seleção do melhor meio de cultura para o estabelecimento da cultura de tecidos de mamão (*Carica papaya* L.), segmentos de hipocótilos foram inoculados em três diferentes meios de cultura básico: *MURASHIGE & SKOOG* (1962) (MS), *WHITE* (1963) (W) e *WHITE & RISSER* (1964) (WR), descritos nas Tabelas 5, 6 e 7 respectivamente. Estes meios foram suplementados com glicina, 2,0 mg/l ; ácido nicotínico, 0,5 mg/l ; tiamina, 1,0 mg/l ; piridoxina, 0,5 mg/l ; inositol, 100 mg/l ; sacarose, 20 g/l e agar 8 g/l. O pH dos diferentes meios de cultura foi ajustado para 5,7.

Como indutor de crescimento utilizou-se água de côco, 15% (v/v). Foram feitas 50 repetições de cada meio e a avaliação foi realizada trinta dias após inoculação com base na multiplicação celular.

TABELA 5. Sais componentes do meio de *MURASHIGE & SKOOG* (1962) com a suplementação usada para constituição do meio básico MS.

Sais	Concentração (mg/l)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
Na_2 EDTA.....	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
H_3BO_3	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6
KI.....	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Suplementação:	
- ácido nicotínico..	0,5 mg/l
-Tiamina.....	1,0 mg/l
- Piridoxina.....	0,5 mg/l
-Glicina.....	3,0 mg/l
- i-Inositol.....	100 mg/l

TABELA 6. Sais componentes do meio de *WHITE* (1963) com a suplementação usada para constituição do meio básico W.

Sais	Concentração (mg/l)
KCl	65
KNO ₃	80
Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O.....	300
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	720
Na ₂ SO ₄	200
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O.....	16,5
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2,5
MnSO ₄ ·4H ₂ O.....	7
ZnSO ₄ ·7H ₂ O.....	3
H ₃ BO ₃	1,5
KI.....	0,75
CuSO ₄ ·5H ₂ O.....	0,001
MoO ₃	0,001
Suplementação:	
- ácido nicotínico.....	0,5 mg/l
- Tiamina	1,0 mg/l
- Piridoxina	0,5 mg/l
- Glicina	3,0 mg/l
- i-inositol.....	100 mg/l

TABELA 7. Sais componentes do meio de *WHITE & RISSER (1964)* com a suplementação usada para constituição do meio básico WH.

Sais	Concentração (mg/l)
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	740
Ca(NO ₃) ₂	300
Na ₂ SO ₄	200
KNO ₃	80
KCl	65
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O.....	16,5
MnSO ₄ ·H ₂ O.....	4,5
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2,5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O.....	2,5
H ₃ BO ₃	1,5
KI.....	0,75
Suplementação:	
- ácido nicotínico.....	0,5 mg/l
- Tiamina.....	1,0 mg/l
- Piridoxina.....	0,5 mg/l
- Glicina	3,0 mg/l
- i-Inositol.....	100 mg/l

3.4. CULTURA DE CALOS

Para o estabelecimento da cultura de calos de mamão, três experimentos foram realizados utilizando as seguintes interações de fitorreguladores: 2,4-D/cinetina; 2,4-D/água de côco e NAA/cinetina. Foram usados segmentos de hipocótilo previamente esterilizado como explante.

O meio de cultura básico sólido (agar, 8 g/l) usado foi constituído dos macro e micronutrientes de *MURASHIGE & SKOOG (1962)*, com a suplementação já descrita como mostra a Tabela 5. O valor pH dos meios foi ajustado para 5,7. Os frascos foram autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão, durante 20 minutos.

3.4.1. INTERAÇÃO 2,4-D/CINETINA

Os explantes (segmentos de hipocótilo) foram colocados individualmente em frascos com 10 ml de meio de cultura. Os tratamentos realizados consistiram de um delineamento experimental na forma de quadrado Latino nas seguintes concentrações entre os fitorreguladores.

cinetina : 0,0 - 0,2 - 0,4 - 0,5 - 1,0 mg/l

2,4-D : 0,0 - 1,0 - 2,0 - 3,0 - 5,0 - 7,0 - 10,0 mg/l

Foram feitas 20 repetições. Destas, 10 foram mantidas à luz em sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo 14/10 horas (luz/escuro) e as outras 10 repetições foram mantidas no escuro à mesma temperatura.

A avaliação foi feita, dando-se notas de 0 a 4 para o desenvolvimento de calo, sendo a nota zero dada para o menor crescimento e nota 4 para o maior e de aspecto friável. As épocas de avaliação foram aos 20, 40 e 50 dias após a inoculação dos explantes. Após 50 dias de manutenção da cultura, foram determinados: massa de matéria fresca, massa de matéria seca, percentagem de umidade e nitrogênio total dos calos.

3.4.2. INTERAÇÃO 2,4-D/ÁGUA DE CÔCO

Os explantes (segmentos de hipocótilo) foram colocados individualmente em frascos contendo 10 ml do meio básico, agar-sólido (4 g/l) adicionado de 2,4-D nas seguintes concentrações: 0,0 - 1,0 - 2,0 - 3,0 - 5,0 - 7,0 - 10,0 mg/l), cada uma delas em presença de água de côco 15%. Das 20 repetições, 10 foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 14/10 horas (luz/escuro) e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ as outras 10 repetições foram mantidas no es

curo, à mesma temperatura.

A avaliação foi feita dando-se notas de 0 a 4 para o crescimento, sendo a nota 4 atribuída aos calos maiores, aos 20, 40 e 50 dias após inoculação dos explantes. Após 50 dias de manutenção da cultura foram determinados: massa de matéria fresca, massa de matéria seca, a percentagem de umidade e nitrogênio total dos calos.

3.4.3. INTERAÇÃO NAA/CINETINA

Os explantes (segmentos de hipocótilos) foram colocados individualmente em frascos contendo 10 ml de meio básico agar-sólido (4 g/l) contendo interações de NAA e cinetina nas seguintes concentrações. Obedecendo um delineamento experimental na forma de Quadrado Latino.

NAA: 0,0 - 0,1 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 5,0 mg/l

Cinetina: 0,0 - 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,5 - 1,0 mg/l

e o tratamento NAA (0,2 mg/l) com cinetina (2,0 mg/l) descrita por *ARORA & SINGH (1978b)*. Esses autores observaram alta frequência de calos friáveis com esse tratamento.

Cada tratamento constou de 20 repetições, sendo mantidos no claro, em sala de crescimento sob fotoperíodo

do de 14/10 horas (luz/escuro) e 10 mantidos no escuro. A temperatura de manutenção da cultura era de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Para dar avaliação ao crescimento foram dadas notas de 0 a 4 para cada frasco, sendo a nota 4 atribuída aos calos apresentando maior desenvolvimento e de aspecto friável. Fêz-se uma única avaliação aos 30 dias após inoculação. Somente nitrogênio total foi determinado na massa de matéria seca.

3.5. IRRADIAÇÃO DOS EXPLANTES DE MAMÃO

Segmentos de hipocótilo de mamão com aproximadamente 1 cm de comprimento foram irradiados com raios gama da fonte de ^{60}Co do CENA/USP, nas doses de: 0,0 - 1,0 - 2,5 - 5,0 - 7,5 - 10,0 Krad, a uma intensidade de 90,5 Krad/h. Os explantes imediatamente após irradiação foram inoculados em meio básico de *MURASHIGE & SKOOG (1962)* agar sólido (4 g/l) suplementado com sacarose (20 g/l); ácido nicotínico (0,5 mg/l); piridoxina (0,5 mg/l); tiamina (1,0 mg/l); glicina (3,0 mg/l) e i-inositol (100 mg/l). O pH foi ajustado a 5,7. Foram feitas 30 repetições e os frascos foram mantidos à luz em temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 14/10 horas (luz/escuro).

A avaliação foi feita dando-se notas de 0 a

4 para o crescimento, sendo a nota 4 atribuída aos calos maiores. As épocas de avaliação foram aos 14, 21, 28, 35 e 41 dias após inoculação dos explantes irradiados. Após 41 dias de manutenção da cultura determinou-se a massa de matéria fresca, massa de matéria seca, umidade. Foram analisados nitrogênio total, proteína total e açúcares solúveis totais.

3.6. ANÁLISES QUÍMICAS

3.6.1. EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

Os açúcares foram extraídos pelo método descrito por *SCHIAVUZZO (1986)*. Amostras de 100 mg de material liofilizado e pulverizado foram aquecidos em banho-maria a 85°C por quinze minutos com 4 ml de etanol 80% e, logo após o resfriamento, centrifugado a 6000 rpm, durante 10 minutos. O precipitado foi coletado e reextraído por mais duas vezes com três ml de etanol, juntando-se no final os três extratos e completando o volume a 10 ml com etanol 80%.

3.6.2. QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

A quantificação de açúcares solúveis totais foi realizada pelo método de fenol-sulfúrico descrito por *DUBOIS et alii (1956)*. Alíquotas de 0,1 ml do extrato de açúcares solúveis em álcool (item 3.6.1) foram transferidos para tubos de ensaio e completou-se o volume para 0,4 ml com água destilada. Adicionou-se 0,5 ml de solução de fenol a 5% com agitação e, a seguir, acrescentou-se 2,5 ml de H₂SO₄ concentrado. Após 20 minutos, a densidade ótica foi lida em espectrofotômetro a 490 nm contra um branco preparado com água destilada e os outros reagentes (fenol 5% e H₂SO₄).

Os valores de absorbância foram interpolados em uma curva padrão de glicose.

3.6.3. DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL

3.6.3.1. DIGESTÃO DAS AMOSTRAS

Amostras de 50 mg de material seco e pulveriizado foram transferidas para balão Kjeldahl contendo 7 ml de solução digestora e submetidas à digestão até se obter uma solução levemente azulada. A solução digestora era comoposta de: selenito de sódio anidro (1,0 g); Na₂SO₄ (21,39g) CuSO₄.5H₂O (4 g); H₂SO₄ concentrado (200 ml) e água desu

tilada (175 ml), *JORGENSEN, 1977*.

3.6.3.2. QUANTIFICAÇÃO

O amônio de cada solução foi separado por destilação em presença de NaOH 12 N. A amônia foi coletada em um Erlenmeyer contendo 10 ml e solução de ácido bórico 2% em presença dos indicadores verde de bromocresol e vermelho de metila. A seguir a amônia coletada foi titulada com H₂SO₄ 0,1 N até o indicador da solução mudar de cor. A percentagem de nitrogênio foi calculada a partir do volume de H₂SO₄ 0,1N necessário para titular o NH₃ da amostra.

3.7. REGENERAÇÃO DE PLANTAS

Foi utilizado como meio básico os sais de *MURASHIGE & SKOOG (1962)*, suplementado com ácido nicotínico (0,5 mg/l); tiamina (1,0 mg/l); piridoxina (0,5 mg/l); glicina (3,0 mg/l); i-inositol (100 mg/l); sacarose (20 g/l) e agar (8 g/l). O valor do pH foi ajustado a 5,7. Como explante foram usados segmentos de hipocótilo a partir de plantas com aproximadamente 35 dias após a semeadura. Nos tratamentos seguintes realizados procurou-se verificar o efeito da água de côco (15%) e glutamina (400 mg/l), autoclavada ou filtra-

da em milipore na regeneração de plantas. Foram feitas 20 repetições de cada tratamento. Este ensaio foi denominado Experimento 1.

TRATAMENTOS

1. AC + Gln filtrada + caseina 2,0 g/l
2. AC + Gln filtrada
3. AC + Gln filtrada + BAP (0,8 mg/l) + IAA (1,0 mg/l)
4. AC + Gln filtrada + BAP (0,5 mg/l) + NAA (0,2 mg/l)
5. AC + Gln filtrada + BAP (2,0 mg/l)
6. AC filtrada + caseina (2,0 g/l)
7. Gln filtrada
8. Gln filtrada + BAP (0,8 mg/l) + IAA (1,0 mg/l)
9. Gln filtrada + BAP (0,5 mg/l) + NAA (0,2 mg/l)
10. Gln filtrada + BAP (2,0 mg/l)
11. AC + Gln autoclavada + caseina (2,0 mg/l)
12. AC + Gln autoclavada
13. AC + Gln autoclavada + BAP (0,8 mg/l) + IAA (1,0 mg/l)
14. AC + Gln autoclavada + BAP (0,5 mg/l) + NAA (0,2 mg/l)
15. AC + Gln autoclavada + BAP (2,0 mg /l)
16. Gln autoclavada + caseina (2,0 mg/l)
17. Gln autoclavada
18. Gln autoclavada + BAP (0,8 mg/l) + IAA (1,0 mg/l)
19. Gln autoclavada + BAP (0,5 mg/l) + NAA (0,2 mg/l)
20. Gln autoclavada + BAP (2,0 mg/l)

Os calos formados no Experimento 1, e os desenvolvidos em meio com 2,4-D (1,0 mg/l) e cinetina (1,0 mg/l), foram inoculados nos seguintes tratamentos procurando obter maior taxa de regeneração de plantas. Este ensaio foi denominado Experimento 2.

TRATAMENTOS

1. Meio de *MURASHIGE & SKOOG* (1962) (MS) (descrito ítem 3.3)
2. Meio de MS + AC (15%)
3. MS + BAP (0,5 mg/l)
4. MS + BAP (0,5 mg/l) + AC (15%)
5. MS + BAP (1,0 mg/l) + IAA (1,0 mg/l)
6. MS + BAP (1,0 mg/l) + IAA (1,0 mg/l)
7. MS + BAP (1,0 mg/l) + NAA (1,0 mg/l)
8. MS + BAP (1,0 mg/l) + NAA (1,0 mg/l)
9. MS + cinetina (1,0 mg/l) + NAA (1,0 mg/l)
10. MS + cinetina (1,0 mg/l) + NAA (1,0 mg/l)

Todos os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento a temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, com fotoperíodo de 14/10 horas (luz/escuro).

A avaliação dos melhores tratamentos foi realizada observando-se a intensidade de regeneração de plantas.

3.8.MICROPROPAGAÇÃO

O meio básico consistiu dos sais de *MURASHIGE & SKOOG (1962)*, suplementado com ácido nicotínico (0,5mg/ℓ); tiamina (1,0 mg/ℓ); piridoxina (0,5 mg/ℓ); glicina (3,0 mg / ℓ); inositol (100 mg/ℓ); sacarose (30 g/ℓ). O valor do pH foi ajustado a 5,7.

Os tratamentos constituíram-se de diferentes concentrações dos fitoreguladores de crescimento, com 20 repetições cada tratamento. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 14-10 horas (luz/escuro) e temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Os tratamentos foram os seguintes:

1. BAP 0,0 mg/ℓ
2. BAP 0,1 mg/ℓ
3. BAP 0,2 mg/ℓ
4. BAP 0,5 mg/ℓ
5. BAP 1,0 mg/ℓ
6. BAP 2,0 mg/ℓ
7. YL₁: IAA (0,05 mg/ℓ) + cinetina (5,0 mg/ℓ)
8. YL₂: IAA (0,05 mg/ℓ) + BAP (0,5 mg/ℓ)
9. LC₁: NAA (2,0 mg/ℓ) + cinetina (10,0 mg/ℓ)
10. LC₂: NAA (0,1 mg/ℓ) + BAP (0,5 mg/ℓ)

Foi utilizado como explante, ápices caulinares com aproximadamente 1,0 mm, previamente esterilizado (ítem 3.2).

As concentrações utilizadas nos tratamentos 7 e 8 são aquelas usadas por *YIE & LIAW (1977)*, razão porque estes tratamentos foram denominados YL_1 e YL_2 . Por sua vez as concentrações utilizadas nos tratamentos 9 e 10 são aquelas usadas por *LITZ & CONOVER (1977)*, razão porque estes tratamentos foram denominados LC_1 e LC_2 .

3.9. ENRAIZAMENTO

Parte aérea regenerada em meios de cultura de finidos para regeneração de plantas a partir de calos e parte aérea obtidas da micropropagação (cultura de ápices caulinares), foram individualizadas para ensaios de definição de um meio de cultura adequado para enraizamento.

Utilizou-se o meio básico de *MURASHIGE & SKOOG (1962)* suplementado com inositol (100 mg/ℓ) e sacarose (30 mg/ℓ) a pH 5,7 nos seguintes tratamentos variando a concentração de ácido indol butírico (IBA).

IBA : 0,0 - 0,2 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 3,0 mg/ℓ

Os frascos (20 repetições por tratamento) foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}C$ e fotoperíodo de 14/10 horas (luz /escuro).

3.10. ACLIMATAÇÃO

Plantas completas (raiz, caule e folhas) foram transferidas para vasos de plástico com vermiculita autoclavada e umedecida. Após transplante, os vasos foram mantidos em túnel de plástico (câmara úmida), em sala de crescimento, com temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}C$ e fotoperíodo de 14/10 horas (luz /escuro). Após 20 dias, os vasos foram retirados do túnel de plástico, e cinco dias depois foram transferidos para casa de vegetação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. GERMINAÇÃO DE SEMENTES

Procurando obter plântulas saudias para retirada dos explantes (hipocótilo e ápice caulinar) foram feitos ensaios de germinação em tubos de ensaio e em vermiculita. Esperava-se que a obtenção de plântulas "in vitro", seria a melhor metodologia, porque utilizando sementes que sofreram tratamento de desinfestação não haveria necessidade de novo tratamento nos explantes, pois as plântulas apresentam aspecto frágil e poderiam ser injuriadas pelo tratamento de desinfestação.

A germinação de sementes em tubos de ensaio e em bandejas com vermiculita apresentaram resultados distintos, como mostra a Tabela 8. Observou-se que a menor percentagem de germinação ocorreu quando as sementes foram germinadas "in vitro" usando algodão embebido em solução salina de *MURASHIGE & SKOOG (1962)* como substrato. Houve também maior tempo de crescimento das plântulas e menor uniformidade na germinação em relação a germinação das sementes em vermiculita. Verificou-se que os sais de MS e a

sacarose influem na intensidade de germinação.

TABELA 8. Efeito do tipo de substrato na germinação (%) e no crescimento (dias para atingir 6 cm) das plantas.

Substrato	Sacarose (g/l)	Germinação (%)	Crescimento (dias)
Vermiculita	0	61,5	25
Tubos de ensaio	0	48,7	
	5	44,4	±40
	10	27,7	
	20	13,7	

De acôrdo com *TOLEDO & MARCOS FILHO (1977)*, a água desempenha o papel mais importante na germinação. Tem a função de amolecer os tegumentos, ativar os processos de respiração, digestão, assimilação, como também tornar possível a transferência dos nutrientes solúveis dos tecidos

de reserva para os pontos de crescimento do embrião.

O processo de germinação em função do teor de umidade ocorre em três etapas, como descreve *BEWLEY & BLACK (1978)*. A primeira etapa geralmente é muito rápida (entre 1 a 2 horas) com a semente atingindo teor de umidade entre 35-40%. Nesta fase ocorre aumento na intensidade respiratória produzindo grandes quantidades de energia originadas da degradação de substâncias de reservas (carboidratos, proteínas e lipídeos), que irão nutrir o embrião. Na segunda fase, ocorre um transporte ativo das substâncias desdobradas do tecido de reserva para o tecido meristemático; esta fase é muito longa (8 a 10 vezes a primeira fase) e a semente absorve muito pouca umidade. A partir de um teor de umidade de 50 a 60% a semente volta a absorver água e a respirar intensamente, tendo início o crescimento visível do eixo embrionário. Inicia-se então a terceira fase.

Notou-se que a germinação das sementes "in vitro" foi menor e conforme aumentava a concentração de sacarose no meio a germinação foi decrescendo; estas sementes não chegam a terceira fase da germinação. *BEWLEY & BLACK (1978)* cita alguns tratamentos osmóticos com polietilenoglicol ou manitol para as sementes permanecerem na fase intermediária da germinação, diminuindo o tempo que a semente permanecerá no solo até a germinação. É um tratamento

usado em sementes sujeitas ao ataque de microrganismos a adversidades climáticas levando a melhor uniformidade na germinação.

É possível que as sementes de mamão tenham absorvido o meio até a segunda fase quando o potencial h_idrico da semente e o substrato entraram em equilíbrio não mais absorvendo o meio e interrompendo a germinação, antes de chegar à terceira fase.

CARVALHO & NAKAGAWA (1983), explicam que a duração de cada fase depende de certas propriedades das sementes como: conteúdo de substratos hidrolizáveis, permeabilidade da casca das sementes, absorção de oxigênio, tamanho, etc, e também das condições durante a exposição à água, como nível de umidade, composição do substrato, temperatura etc.

A restrição ao fluxo de oxigênio nas sementes colocadas em tubos de ensaio pode ter interferido na germinação, pois as sementes permaneceram fechadas com tampão de algodão para manter o ambiente interno asséptico. Também a forma física dos tubos pode ter restringido aeração.

Segundo *TOLEDO & MARCOS FILHO (1977)*, o oxigênio é essencial, para que ocorra a respiração. É um processo muito ativo havendo necessidade de grandes quantidades de oxigênio disponíveis. De acordo com *CARVALHO & NAKA*

GAWA (1983) as exigências de oxigênio pelas sementes são normalmente baixas. No início da germinação a produção de energia é obtida através da respiração anaeróbica e a partir do nível de hidratação dos tecidos, o oxigênio dissolvido na água se difunde até o tecido meristemático possibilitando a mudança para respiração aeróbica.

Segundo *SIEGEL & ROSEN (1962)* a maioria das espécies não exigem uma concentração de oxigênio superior a 10% para germinar e o excesso de água, durante a embebição da semente tende a sufocar o eixo embrionário. Em alguns casos a germinação é inibida, e em outros ocorre emergência da radícula seguida pela morte da semente. *BEWLEY & BLACK (1978)* observaram que 48 dos 78 gêneros de plantas terrestres por eles estudados podiam germinar submersas em água e destes, 18 gêneros germinaram tão bem em baixa tensão de O_2 quanto em condições aeróbicas.

HEYDECKER (1977), utilizando tratamento osmótico a $15^{\circ}C$ por 14 dias, obteve redução do tempo médio de germinação de 12 dias para 3 dias, aumentando a uniformidade na germinação.

O efeito da área de contato da semente com o substrato pode interferir no processo de embebição e germinação das sementes (*MANOHAR & HEYDECKER, 1964*). As sementes em tubos de ensaio ocuparam somente metade da área em contato com o substrato, o que pode ter interferido no resultado.

O fato de que em todos os tratamentos ter ocorrido germinação das sementes, pode ser explicado com base no vigor das sementes (CARVALHO & NAKAGAWA, 1983 e MAGUIRE, 1977).

4.2. MEIO DE CULTURA

No estabelecimento da cultura de tecidos de mamão (*Carica papaya* L.), verificou-se que a utilização dos sais de MURASHIGE & SKOOG (1962), proporcionou melhor resultado para o crescimento de células quando comparado com o meio de WHITE (1963) e WHITE & RISSER (1964), sendo que este último apresentou menor multiplicação celular.

O meio básico MS, foi usado para cultura de células de mamão por LITZ & CONOVER (1977, 1978a,b). MEDORA *et alii* (1979), observaram que o meio MS contendo somente a metade da concentração dos macronutrientes foi o melhor meio para crescimento de calo e demonstrou que o nitrogênio na forma amoniacal é essencial para o crescimento de calo. MEDORA *et alii* (1973) obtiveram cultura de calo em meio de WHITE & RISSER (1964), suplementado com 2,4-D.

Outros autores como *YAMAMOTO et alii* (1986) e *ARORA & SINGH* (1978b) obtiveram proliferação de tecido em meio básico de *LISMAYER & SKOOG* (1965). A constituição dos sais deste último meio é idêntica ao MS, apresentando, contudo, variação na concentração das vitaminas e dos fitoreguladores usados.

Deve-se observar que, em relação ao meio MS, os meios W e WR possuem menor concentração de N-inorgânico, (Tabela 5, 6 e 7), o qual, como se sabe, é necessário para o crescimento das células e o seu metabolismo, levando à diferenciação e ao desenvolvimento.

Nos meios de *WHITE* (1963) e *WHITE & RISSER* (1964), o nitrogênio está somente na forma nítrica. Sabe-se que o nitrato deve ser reduzido à amônia, a qual é então metabolizada (reações de aminação e transaminação). A redução de nitrato a amônia é catalizada pela enzima redutase nitrato a qual exige como fator íons molibdênio, que nao estão presentes no meio WR. Além disso, no meio WR, o cobre e o cobalto estão ausentes. Íons cobre são necessários para várias reações enzimáticas, entre elas as responsáveis pela respiração celular. O cobalto, por sua vez, é necessário para reações de síntese de vitaminas do complexo B.

BILDERBACK et alii (1976) obteve maior atividade proteolítica de papaina em calos desenvolvidos em solu

ção salina de *WHITE* (1964) suplementado com peptona ou utilizando solução salina de *MURASHIGE & SKOOG* (1962).

Deste modo, as soluções salinas de *MURASHIGE & SKOOG* (1962) e de *LINSMAYER & SKOOG* (1965), mostram-se mais completas e adequadas para o cultivo "in vitro" de tecidos de mamão.

4.3. CULTURA DE CALOS

4.3.1. INTERAÇÃO 2,4-D/CINETINA

Os explantes foram cultivados "in vitro" em presença de diferentes interações dos reguladores de crescimento (2,4-D e cinetina). Nesses meios de cultura os segmentos de hipocótilos desdiferenciaram-se em calos.

O desenvolvimento dos calos foram acompanhados em intervalos de 20, 40 e 50 dias, dando-se notas de zero a quatro, zero sendo atribuído às culturas sem desenvolvimento, e quatro para bom desenvolvimento, isto é, calos maiores.

A Figura 2 mostra as médias dos dados (notas), comparando-se as diferenças de desenvolvimento, nas épocas de avaliação, nos diferentes ambientes de crescimento

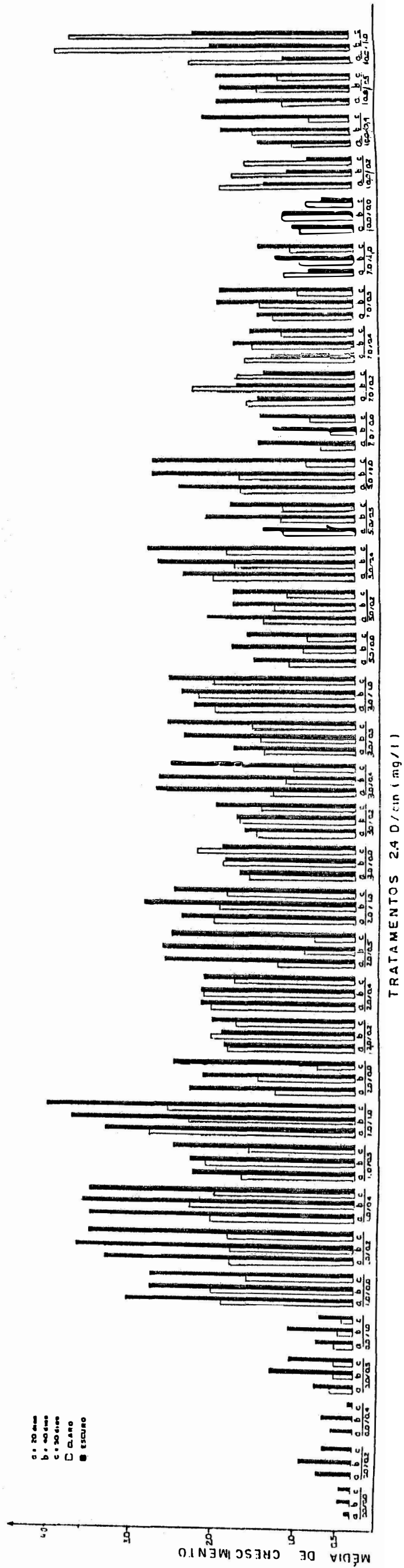


FIGURA 2. Médias de crescimento (notas, de calos obtidos em diferentes concentrações de 2,4-D/cinetina mantidos no claro e no escuro, avaliados aos 20, 40 e 50 dias após inoculação .

(luz e escuro).

É visível a diferença no crescimento dos calos nos tratamentos montados no escuro e na luz. Dos 36 tratamentos, apenas 4 apresentaram melhor desenvolvimento em presença de luz, (2,4-D/cinetina: mg/ℓ): 3,0/0,0; 10,0/0,2 ; 10,0/1,0 e 7,0/0,2 mg/ℓ. Os calos crescidos no escuro demonstraram aparência friável, excelentes para estabelecimento de cultura em suspensão, pois aumenta a percentagem de células simples ou pequenos aglomerados (DODDS & ROBERTS, 1982).

O experimento demonstrou a necessidade da auxina 2,4-D para o desenvolvimento dos calos. Nos tratamentos utilizando somente cinetina, o crescimento foi mínimo, mas utilizando somente auxina houve formação e crescimento de calo, apresentando melhores resultados nas concentrações mais baixas como 1,0 e 2,0 mg/ℓ.

Interações de auxina/citocinina apresentaram maior crescimento de calo. *ARORA & SINGH (1978a)* observaram que, na ausência de auxina no meio de cultura, não ocorre iniciação da formação de calo, sendo a cultura de calo de mamão altamente dependente de auxina. A citocinina não demonstrou ser crítica para a iniciação do calo, mas pareceu controlar o subsequente crescimento dos mesmos.

É interessante notar que os melhores resultata

dos obtidos nos tratamentos foi com a menor concentração da auxina 2,4-D (1,0 mg/l) e dentro das concentrações de citocinina os melhores resultados foram obtidos com as maiores quantidades de cinetina (1,0 mg/l).

Na maioria dos tratamentos, os calos apresentaram crescimento máximo entre os 20 e 40 dias em cultura. A partir desse período, os calos começaram a necrosar. A interação que determinou melhor desenvolvimento (1,0 mg/l de 2,4-D e 1,0 mg/l de cinetina) apresentou crescimento mesmo 50 dias após inoculação. Nas Figuras 3 e 4 é apresentada uma visão geral dos tratamentos mantidos no claro e no escuro, respectivamente.

O tempo de estabelecimento da cultura de mão geralmente é muito rápido. *ARORA & SINGH (1978a)* obtiveram proliferação de calo em 80% das culturas no terceiro e quarto dias após a inoculação. Em *Carica candamarcensis* o início da formação de calo variou entre 7-8 dias (*JORDAN et alii, 1983*). *LITZ & CONOVER (1980)*, obtiveram calos friáveis de *C.stipulata* utilizando sais de MS com BAP (0,5 mg/l) e NAA (0,2 mg/l). *LITZ & CONOVER (1978a)* descrevem que os calos iniciaram sua formação nas pontas dos explantes após 10 dias em cultura. Em meio MS, suplementado com cinetina e NAA, *YIE & LIAW (1977)* obtiveram calos, também após um período de dez dias.

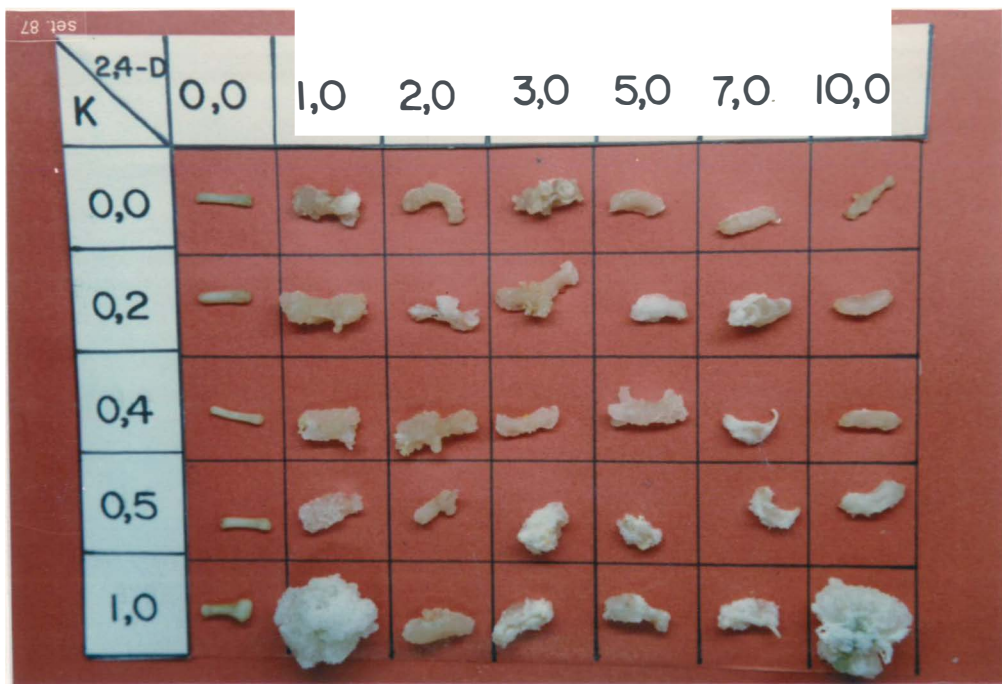


Figura 3. Aspecto dos calos desenvolvidos no claro em diferentes interações de 2,4-D/cinetina aos 42 dias após a inoculação.



Figura 4. Aspecto dos calos desenvolvidos no escuro em diferentes interações de 2,4-D/cinetina aos 42 dias após inoculação.

Nas Tabelas 9 e 10 estão os resultados de massa de matéria fresca, massa de matéria seca, umidade e quantidade de nitrogênio total dos tratamentos mantidos no claro e no escuro, respectivamente. Os tratamentos foram comparados, verificando-se que culturas mantidas no escuro apresentavam calos com massa de matéria fresca maior (866,6 mg, em média) que os calos mantidos no claro (741,9 mg). O tratamento 1,0 mg/l de 2,4-D e 1,0 mg/l de cinetina apresentou melhor crescimento em ambos ambientes de crescimento.

A interação 10,0 mg/l de 2,4-D e 1,0 mg/l de cinetina apresentou maior crescimento que todos os outros tratamentos, sendo este crescimento no claro, 2,5 vezes superior ao no escuro. Estes calos possuíam aparência bastante distinta dos demais, eram compactos e de coloração bem mais clara. *ARORA & SINGH (1978a)* descreveram que para se obter o mesmo crescimento de calo com 2,4-D, ao invés de ácido naftalenoacético (NAA), há necessidade de quantidade dez vezes maior de 2,4-D. Os pesquisadores sugerem que o tecido de mamão não é capaz de utilizar tão efetivamente o 2,4-D e IAA, pois estas auxinas não são suficientemente móveis no meio ou então por serem inativadas mais rapidamente.

Os calos apresentaram semelhante percentagem média de umidade, 93,2%. As interações com melhor crescimento possuem percentagem de umidade maior, quando mantidos no

TABELA 9. Massa de matéria fresca (mg), massa de matéria seca (mg), umidade (%), nitrogênio-total (%) e proteína (%). Média das repetições dos calos mantidos no claro.

2,4-D/cin. mg/l	Mat.fresca mg	Mat.seca mg	Umidade %	N-total %	Proteína %
0,0/0,0	230	20	91,3	4,38	27,40
0,0/0,2	230	20	91,3	4,18	26,13
0,0/0,4	175	20	85,7	6,30	39,40
0,0/0,5	180	10	94,4	3,93	24,58
0,0/1,0	205	10	92,7	5,30	33,09
1,0/0,0	465	50	88,2	2,18	13,60
1,0/2,0	910	60	93,4	2,51	15,67
1,0/0,4	975	50	94,4	2,31	14,44
1,0/0,5	940	50	94,7	2,17	13,56
1,0/1,0	2140	160	93,2	2,31	14,44
2,0/0,0	390	30	93,6	2,56	15,99
2,0/0,2	790	70	91,1	2,30	14,44
2,0/0,4	1020	70	93,1	1,42	8,88
2,0/0,5	100	10	90,0	2,82	17,61
2,0/1,0	720	60	91,7	2,30	14,44
3,0/0,0	1110	90	91,9	2,54	15,85
3,0/0,2	620	50	91,1	2,70	16,90
3,0/0,4*	-	-	-	-	-
3,0/0,5	485	30	93,8	1,83	11,44
3,0/1,0	770	50	93,5	1,15	7,22
5,0/0,0	245	20	91,8	2,49	15,59
5,0/0,2	300	20	93,3	2,47	15,41
5,0/0,4	708	40	97,5	1,86	11,62
5,0/0,5	550	30	94,5	1,73	10,79
5,0/1,0	500	50	90,0	2,10	13,10
7,0/0,0	157	10	93,6	2,33	14,54
7,0/0,2	1163	20	98,0	3,07	19,19
7,0/0,4	974	70	92,8	2,25	14,08
7,0/0,5	600	40	93,3	2,25	14,08
7,0/1,0	355	20	94,6	2,46	15,38
10,0/0,0	240	40	83,3	4,36	27,24
10,0/0,2	390	50	87,2	2,29	14,28
10,0/0,4	280	40	85,7	2,24	14,01
10,0/0,5	500	45	92,0	2,48	15,47
10,0/1,0	6550	360	94,5	5,26	32,92

* O tratamento (3,0mg/l 2,4-D/0,2 mg/l cinetina) foi perdido por contaminação bacteriana.

TABELA 10. Massa de matéria fresca (m g), massa de matéria seca (mg), umidade (%), nitrogênio total (%) e proteína (%). Média das repetições dos calos mantidos no escuro.

2,4-D/cin. mg/ℓ	Mat.fresca mg	Mat.seca mg	Umidade %	N-total %	Proteína %
0,0/0,0	226	10	95,6	4,48	27,97
0,0/0,2	465	30	93,5	2,62	16,36
0,0/0,4	228	10	95,6	3,33	20,83
0,0/0,5	876	50	94,3	3,61	22,54
0,0/1,0	600	50	91,7	2,79	17,43
1,0/0,0	1130	60	93,8	1,72	10,74
1,0/0,2	2000	100	95,3	2,28	14,26
1,0/0,4	2300	100	95,4	2,34	14,61
1,0/0,5	595	20	96,6	1,15	7,20
1,0/1,0	3190	180	94,3	2,34	14,61
2,0/0,0	1020	65	93,6	1,97	12,32
2,0/0,2	760	30	94,7	1,89	11,81
2,0/0,4	430	20	95,3	1,86	11,63
2,0/0,5	1140	80	93,2	1,89	11,80
2,0/1,0	695	25	96,4	1,74	10,90
3,0/0,0	1030	100	90,3	2,59	16,20
3,0/0,2	380	50	86,8	1,66	10,36
3,0/0,4	350	10	97,1	1,99	12,46
3,0/0,5	780	40	94,9	1,83	11,44
3,0/1,0	1130	70	94,7	1,77	11,09
5,0/0,0	580	80	87,1	2,49	15,59
5,0/0,2	900	40	96,1	1,89	11,80
5,0/0,4	1740	120	93,1	2,54	15,85
5,0/0,5	540	40	92,6	1,86	11,62
5,0/1,0	1230	80	93,5	1,75	10,92
7,0/0,0	340	50	84,7	2,98	18,64
7,0/0,2	220	10	95,5	1,86	11,63
7,0/0,4	490	60	87,8	1,92	12,00
7,0/0,5	955	80	91,6	2,37	14,79
7,0/1,0	250	30	88,0	2,15	13,42
10,0/0,0	337	30	91,1	2,90	18,12
10,0/0,2	335	40	88,1	1,63	10,18
10,0/0,4	1130	110	90,7	2,82	17,61
10,0/0,5	500	40	92,0	1,99	12,46
10,0/1,0	2625	160	93,9	3,80	23,75

escuro.

Com relação a nitrogênio total e proteína, os tratamentos crescidos no claro apresentaram, em média, maior percentagem (2,6%) que no escuro (2,2%). Observou-se, no claro e no escuro uma quantidade bastante elevada dos compostos acima no tratamento 2,4-D/cinetina (1,0 mg/ℓ e 1,0 mg/ℓ) comparada com os outros.

4.3.2. INTERAÇÃO 2,4-D/ÁGUA DE CÔCO

O experimento foi analisado pelos mesmos métodos que os do item anterior (4.3.1). Na Figura 5, estão demonstradas as médias das notas de 0 a 4, nas diferentes épocas de avaliações (20, 40 e 50 dias) das culturas crescidas em ambiente claro e escuro.

Comparando os dois experimentos (2,4-D/cinetina) e 2,4-D/água de côco observa-se que neste último experimento as culturas mantidas no claro apresentaram maior desenvolvimento de calo. Somente nas concentrações mais altas de 2,4-D (7 e 10 mg/ℓ) apresentaram maior crescimento no es-

Os melhores resultados foram obtidos nas con

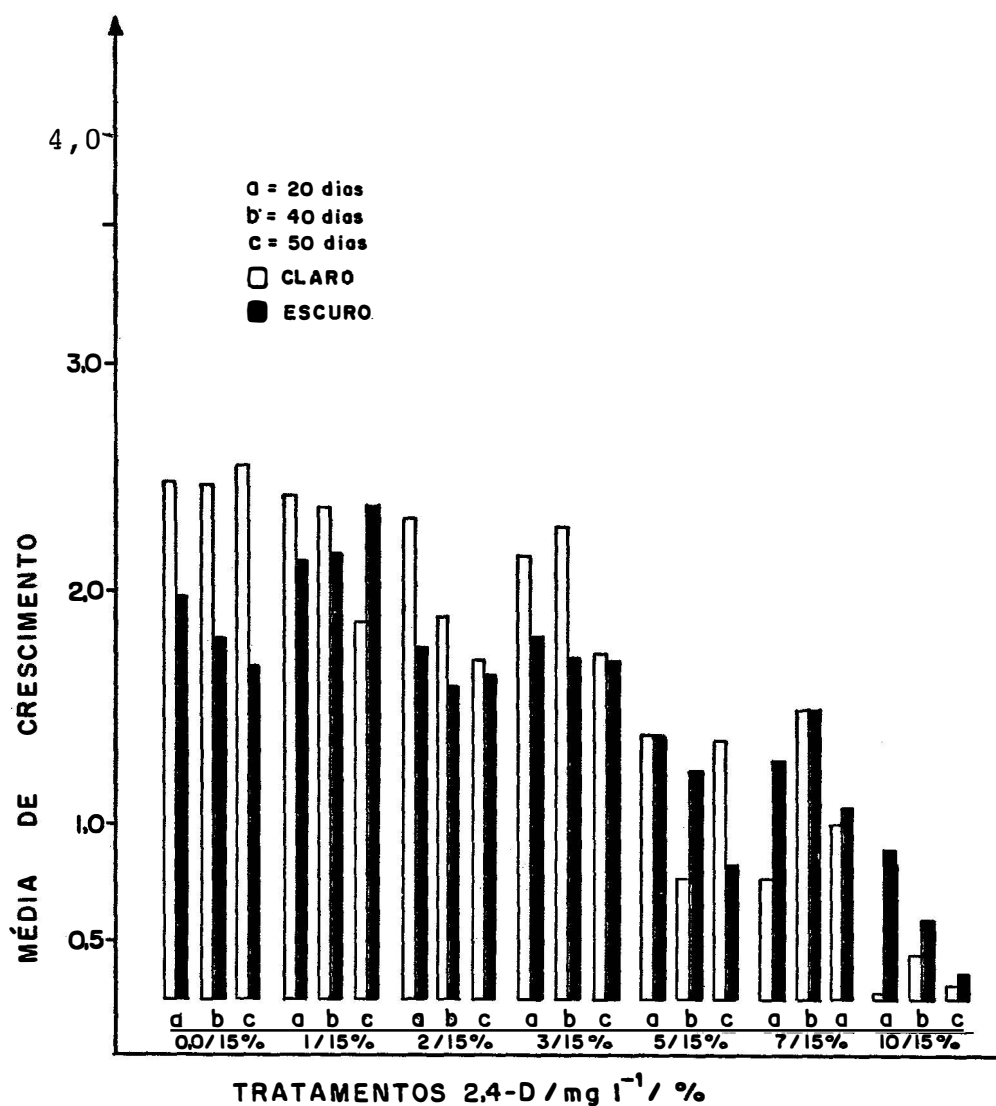


FIGURA 5. Médias de crescimento (notas) de calos obtidos em diferentes concentrações de 2,4-D com água de côco (15%) mantidos no claro e escuro, avaliados aos 20, 40 e 50 dias após inoculação.

centrações mais baixas de 2,4-D, sendo que os tratamentos sem 2,4-D, e na presença de 1,0 mg/ℓ demonstraram resultados semelhantes na média de crescimento.

Em geral, o crescimento médio de calo deste experimento foi inferior comparado com o tratamento 1,0 mg/ℓ de 2,4-D mais 1,0 mg/ℓ de cinetina do experimento anterior (2,4-D/cinetina) em ausência de água de côco.

Observou-se no tratamento sem 2,4-D que o período para iniciar formação do calo foi menor (3-4 dias). Utilizando-se diferentes quantidades de 2,4-D, o crescimento foi diminuindo proporcionalmente ao aumento das concentrações, possivelmente devido a quantidade de auxina no meio ter sido superior a necessidade, tornando-se tóxica ao tecido.

LITZ & CONOVER (1982) obtiveram cultura de calo de óvulos híbridos de *C.papaya* x *C.cauliflora* em meio de WHITE (1963) suplementado com glutamina e água de côco (20%) sômente e MEDORA *et alii* (1984) observaram que o crescimento de calo decresce 34% na ausência de água de côco no meio de WHITE (1963) apenas suplementado com peptona.

A Figura 6 descreve os resultados referentes à massa de matéria fresca e massa de matéria seca nos calos desse experimento. A percentagem de umidade, nitrogênio total e proteínas, nas diferentes interações de 2,4-D (0-1,0-2,0-3,0-5,0-7,0-10,0 mg/ℓ) com água de côco (15%) mantidos no claro e no escuro estão representados na Tabela 11.

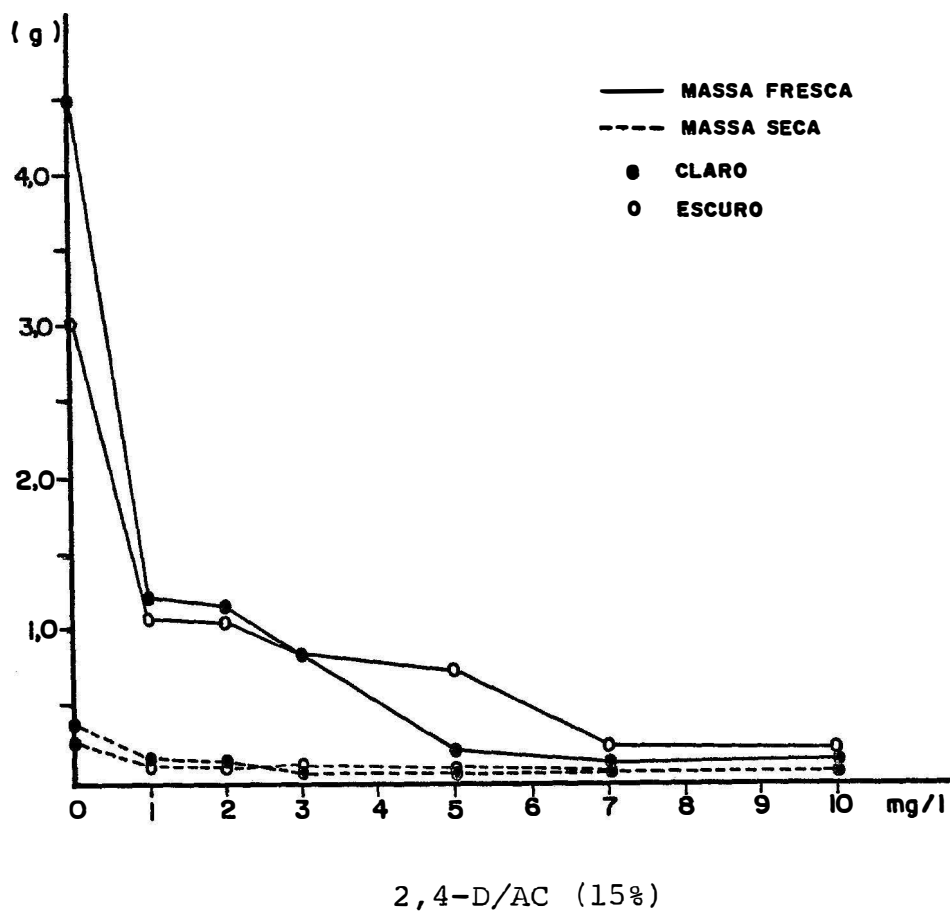


FIGURA 6. Massa de matéria fresca e massa de matéria seca em gramas dos calos mantidos no claro e no escuro (Experimento 2,4-D/AC (15%).

TABELA 11. Teor de umidade (%), nitrogênio total (%) e proteína (%) dos calos mantidos no claro e escuro do experimento 2,4-D/Água de côco (15%).

2,4-D/AC (mg/l) / (15%)	Umidade (%)	N-total (%)	Proteína (%)
-----claro-----			
0,0	92,6	4,08	25,53
1,0	91,5	1,83	11,44
2,0	90,3	2,03	12,68
3,0	91,4	1,83	11,44
5,0	92,3	3,12	19,48
7,0	83,3	*	*
10,0	77,8	3,55	22,21
-----escuro-----			
0,0	91,8	4,08	25,53
1,0	91,6	2,37	14,79
2,0	91,4	1,83	11,44
3,0	90,6	2,00	12,50
5,0	90,4	1,61	10,04
7,0	95,0	3,17	19,81
10,0	94,7	2,44	15,26

* Não havia material suficiente para ser analisado.

Nas Figuras 7 e 8 está demonstrada uma visão do aspecto dos calos desenvolvidos nestes meios, mantidos no claro e no escuro.

Referente à massa de matéria fresca e matéria seca, observa-se um acentuado crescimento nos calos mantidos no claro. A percentagem de nitrogênio total decresceu com o aumento da concentração de 2,4-D em ambos os ambientes de crescimento.

4.3.3. INTERAÇÃO NAA/CINETINA

Neste experimento analisando diferentes interações de NAA e cinetina fêz-se somente uma avaliação do crescimento, aos 30 dias após inoculação, dando-se notas de 0 a 4 com o mesmo critério dos experimentos anteriores (4.3.1 e 4.3.2), sendo que 10 repetições foram mantidas no claro; fotoperíodo 14/10 horas (claro/escuro) a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}C$ e 10 repetições foram mantidas no escuro. Os resultados das notas médias por tratamento estão apresentados na Figura 9.

Visualiza-se na Figura 9 que as interações



Figura 7. Aspecto dos calos desenvolvidos no claro em diferentes interações de 2,4-D/AC (15%) 42 dias após inoculação.

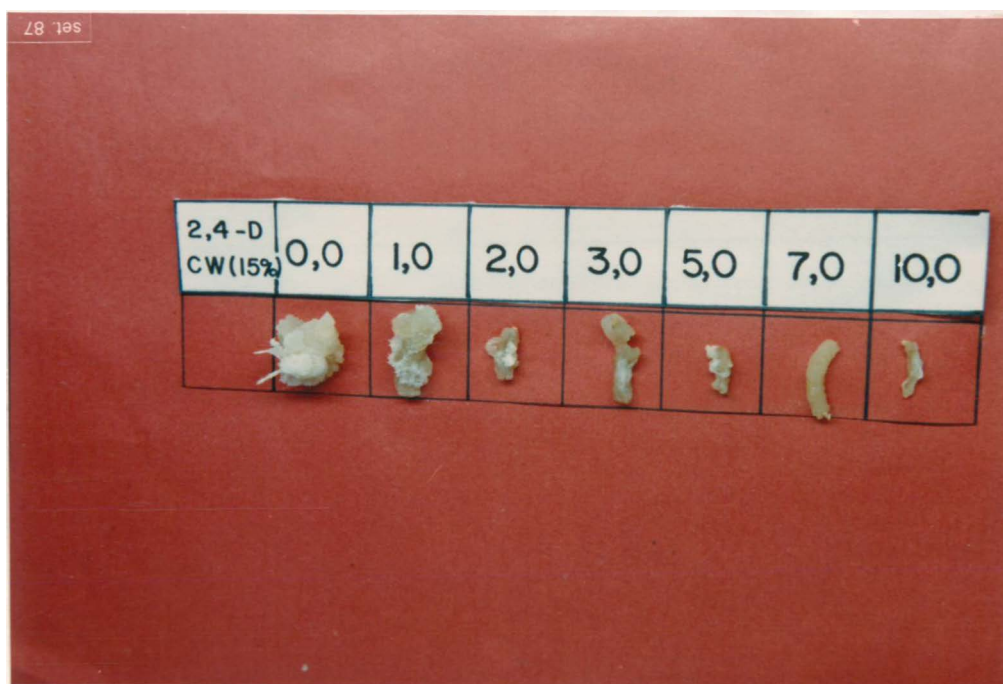


Figura 8. Aspecto dos calos desenvolvidos no escuro em diferentes interações de 2,4-D/AC (15%) aos 42 dias após inoculação.

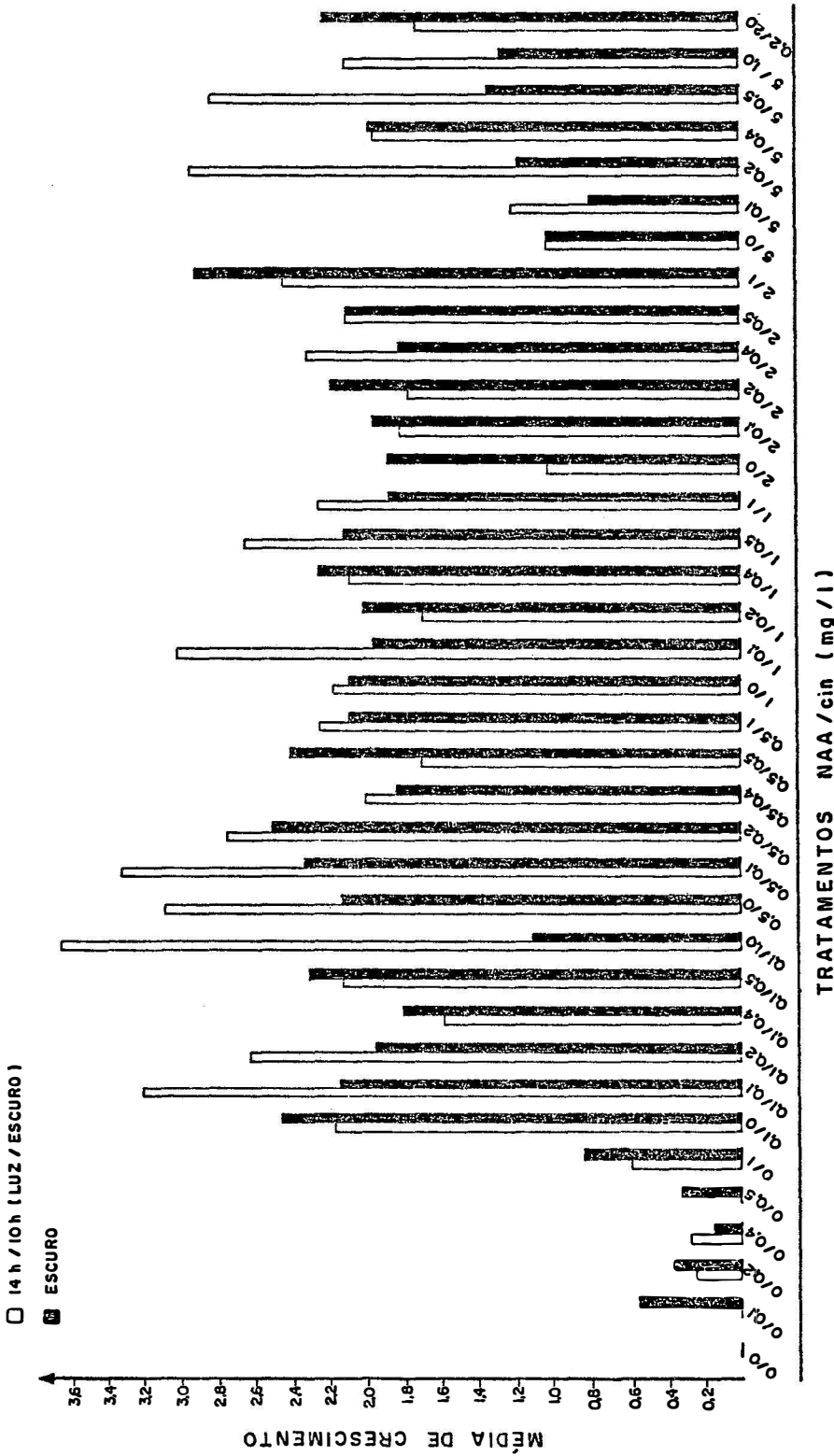


Figura 9. Média de Crescimento (notas) de calos crescidos em diferentes concentrações de NAA/Cinetina, mantidos no claro e no escuro, (35 dias após Inoculação).

que apresentaram maiores crescimentos de calos foram as mantidos no claro. As interações com melhor crescimento foram 0,1/1,0 - 0,5/1,0 - 0,1/0,1 NAA (mg/l)/cinetina (mg/l).

Houve formação de raízes na maioria dos tratamentos como mostra a Figura 10 e a Tabela 12. É interessante notar que não houve formação de raízes na interação que resultou em maior desenvolvimento de calo (1,0 mg/l de NAA e 1,0 mg/l de cinetina) e geralmente as raízes formadas eram curtas e grossas.

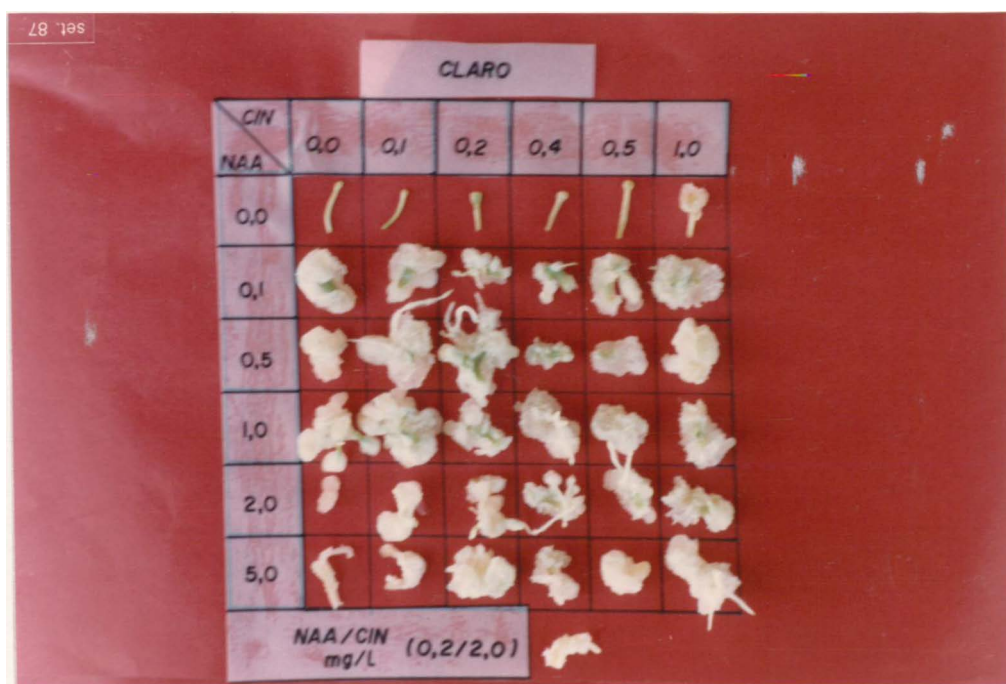


FIGURA 10. Aspecto dos calos desenvolvidos no claro em diferentes interações de NAA/cinetina aos 35 dias após inoculação.

Na Tabela 12 estão mostrados os resultados de nitrogênio total e proteínas (%) nas diferentes interações do experimento nos frascos mantidos no claro e no es curo.

Segundo *ARORA & SINGH (1978a)*, a iniciação de calos é dependente de auxina exógena, indicando que não ocorre sua biossíntese. Entretanto, cinetina não é crítica para a iniciação de calos, mas pareceu controlar o crescimento. Aqueles autores notaram que há possibilidade de haver citocinina suficiente para proliferação do tecido, mas o nível endógeno pode ser menor que o adequado para o crescimento dos calos.

Discordando dos resultados obtidos por *ARORA & SINGH (1979 a, c)* que observaram melhores resultados com a auxina NAA na iniciação de calos do que com 2,4-D ou IAA, foi constatado no presente experimento iniciação e crescimento de calo com 2,4-D, além disso, quando NAA foi utilizado houve formação de raízes, como mostra a Figura 10.

ARORA & SINGH (1978a) observaram que em presença de relação alta de NAA/citocinina ocorria diferenciação de raiz e que estas, em contato com o meio de cultura, desdiferenciavam em calos. Pela Tabela 12, pode-se verificar que concentrações mais altas de NAA a diferenciação em raiz foi mais efetiva no claro.

TABELA 12. Percentagem de raiz* nitrogênio total e proteína, dos calos mantidos no claro e no escuro. Experimento NAA/cinetina. (*foi baseado no n° de calos que desenvolveram tais raízes comparado com o n° total de calos dentro de cada tratamento)

NAA/Cin. mg/l	-----Claro-----			-----Escuro-----		
	Raiz	N-total %	Proteína	Raiz	N-total %	Proteína
0,0/0,1	-	2,04	12,77	-	*	*
0,0/0,1	-	1,07	6,70	20,0	0,89	5,50
0,0/0,2	-	*	*	-	*	*
0,0/0,4	-	0,91	5,71	-	*	*
0,0/0,5	-	0,71	4,73	-	*	*
0,0/1,0	-	2,21	13,84	-	1,04	6,52
0,1/0,0	16,7	2,20	13,75	-	2,06	12,86
0,1/0,1	42,9	2,54	15,89	100,0	3,54	22,14
0,1/0,2	75,0	2,46	15,36	57,1	1,67	10,45
0,1/0,4	16,7	2,21	13,84	42,9	1,91	11,87
0,1/0,5	25,0	2,07	12,95	50,0	2,09	13,04
0,1/1,0	-	2,20	13,75	-	1,61	10,09
0,5/0,0	33,4	2,16	13,48	50,0	2,43	15,18
0,5/0,1	60,0	3,54	22,14	66,7	1,99	12,41
0,5/0,2	75,0	1,97	12,32	33,4	2,21	13,84
0,5/0,4	16,7	1,30	8,13	-	2,13	13,30
0,5/0,5	35,7	2,07	12,95	60,0	1,80	11,25
0,5/1,0	25,0	1,91	11,96	33,4	1,01	6,34
1,0/0,0	33,4	2,21	13,84	33,4	*	*
1,0/0,1	66,7	2,14	13,39	33,4	2,06	12,86
1,0/0,2	16,7	2,00	12,50	57,1	2,21	13,84
1,0/0,4	28,6	1,79	11,16	50,0	1,84	11,51
1,0/0,5	-	1,93	12,05	44,4	2,47	15,45
1,0/1,0	16,7	1,39	8,66	-	2,23	13,93
2,0/0,0	-	2,04	12,76	-	2,07	12,95
2,0/0,1	62,5	0,89	5,54	-	1,96	12,23
2,0/0,2	66,7	1,14	7,14	16,0	2,09	13,04
2,0/0,4	66,7	2,10	13,13	20,0	*	*
2,0/0,5	66,7	2,10	13,13	-	1,73	10,80
2,0/1,0	-	0,91	5,71	-	2,29	14,29
5,0/0,0	33,4	*	*	-	1,21	7,59
5,0/0,1	-	1,41	8,93	-	0,43	2,68
5,0/0,2	20,0	1,86	11,61	-	2,34	14,64
5,0/0,4	33,4	1,49	9,29	-	2,00	12,50
5,0/0,5	-	1,59	9,91	-	1,78	11,16
5,0/1,0	28,6	1,69	10,54	-	1,19	7,41
0,2/2,0	-	2,19	13,66	-	1,83	11,43
Média		1,89	11,79		1,96	12,23

* Não houve material suficiente para ser analisado.

A presença de citocinina no meio parece aumentar o efeito da auxina também presente. *LITZ & CONOVER* (1977) obtiveram produção de calos utilizando NAA (0-5 2,0 mg/l) com cinetina e BAP. *LITZ & CONOVER* (1980) obtiveram crescimento de calo de *C. stipulata* em meio de *WHITE* (1963) suplementado com NAA e BAP. *MEDORA et alii* (1979) obtiveram ótimo crescimento de calo no meio de *WHITE* (1963) com 2,4-D concluindo que BAP inibia o crescimento.

ARORA & SINGH (1978 a,b) e *YIE & LIAW* (1977), suplementaram seus meios com cinetina (1-2 mg/l) e *DeBRUIJNE et alii* (1974) encontraram melhor produção de calo com 2-iP

Os calos de mamão obtidos no presente experimento geralmente são de coloração levemente amarelada e de aspecto textural esponjoso.

4.4. EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NO CRESCIMENTO DE CALOS

Segmentos de hipocótilos de mamão (*Carica papaya* L.) com aproximadamente 1 cm de comprimento foram irradiados com raio gama (^{60}Co) nas doses: 0,0-1,0 - 2,5-5,0 7,5-10,0 Krads e imediatamente inoculados em meio fresco de *MURASHIGE & SKOOG (1962)*, como descrito no item 3.3.

O desenvolvimento dos calos foi acompanhado a partir do 14º dia da inoculação em intervalos de 7 dias, dando-se nota de 0 a 4 (observações visuais) para crescimento, sendo a nota 0 atribuída aos frascos sem desenvolvimento e 4 ao maior crescimento de calos. Com a média das notas de cada tratamento (doses de radiação) construiu-se um histograma, como mostra a Figura 11.

Observa-se na Figura 11 que no 14º dia após a irradiação, explantes irradiados com 5,0 Krads apresentavam maior desenvolvimento de calo, mostrando crescimento superior ao controle (0,0 Krad). Ao 21º dia após irradiação, o melhor crescimento foi observado utilizando 1,0 Krad. Utilizando 7,5 Krads observa-se que a taxa de crescimento entre o 14º e o 21º dia diminuiu com o tempo e 10,0 Krads apresentou crescimento sempre inferior aos de

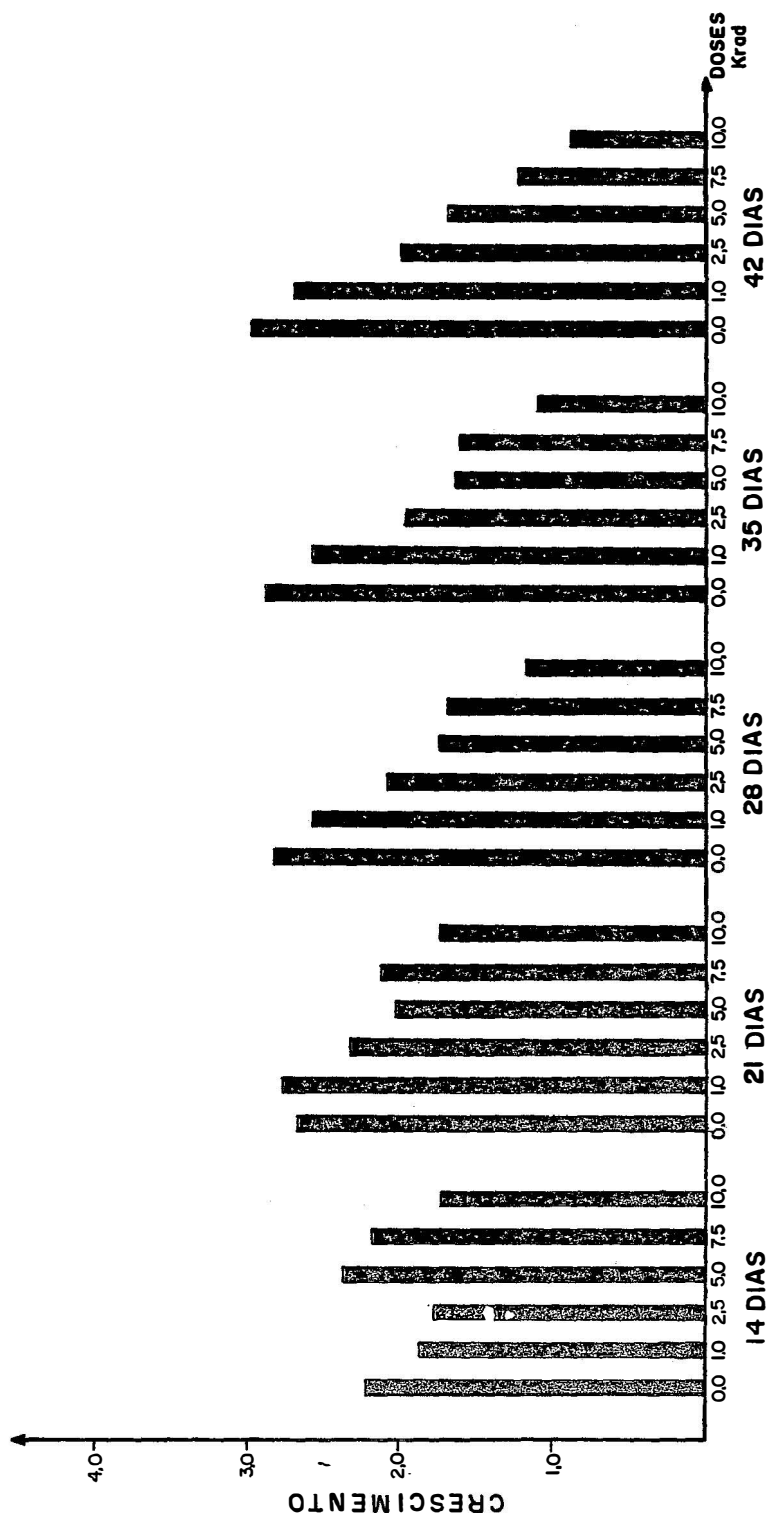


Figura 11. Crescimento de calos de Mamão Irrradiados com diferentes doses de Radiação Gama. Média de Notas (0-4).

mais tratamentos (doses de irradiação).

Aos 42 dias é bastante evidente o efeito inibidor da irradiação ionizante no crescimento celular. A Figura 11 demonstra que aos 28 dias o crescimento é inversamente proporcional às doses.

SLAVINSKI JR (1984) obteve resultados semelhantes irradiando com raios gama *Pediastrum boryanum*, uma microalga. Células irradiadas com 5 Krads apresentavam pico de crescimento aos 14 dias e com 1,0 Krad o maior crescimento ocorreu aos 20 dias após irradiação; com 10,0 Krads o crescimento foi sempre inferior ao controle (0,0 Krad).

Através da Figura 12, pode-se observar que a testemunha (0,0 Krad) apresenta crescimento mesmo no 42º dia da inoculação enquanto as doses 1,0-2,5 e 5,0 Krad apresentaram visível crescimento até o 21º dia após irradiação, ocorrendo logo em seguida uma queda no crescimento.

É interessante observar a recuperação do crescimento a partir do 35º dia, principalmente nas doses 1,0-2,5 e 5,0 Krad. Nas doses 7,5 e 10,0 Krad o crescimento foi decrescendo com o tempo, após irradiação.

HOLSTEN et alii (1965); SKOK et alii (1965) e *BAJAJ (1970)* demonstraram que utilizando baixas doses de radiação ionizante em plantas, tecidos ou células, estas

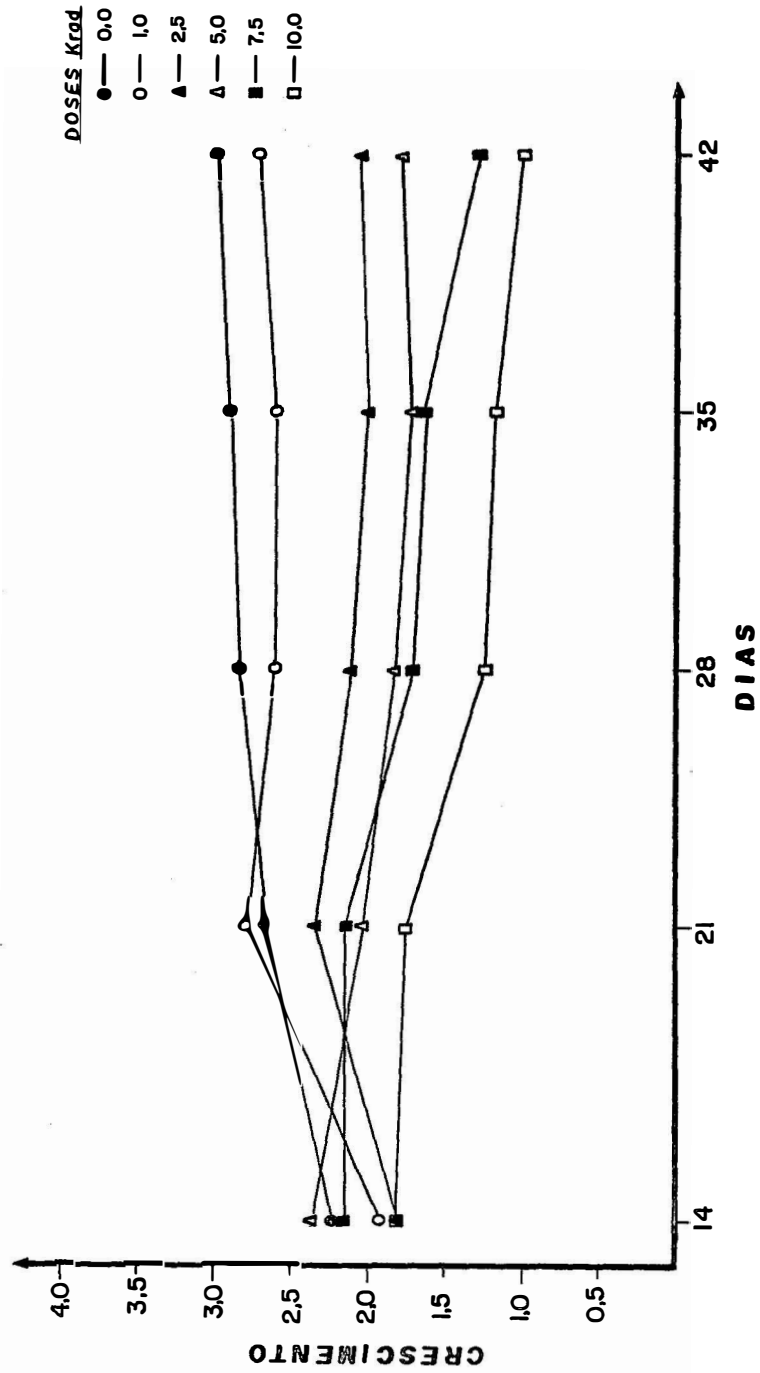


Figura 12. Sequencia de Crescimento dos Calos (notas) em diferentes intervalos de tempo (dias) após irradiação (0,0-1,0-2,5-5,0 - 7,5-10,0 Krads).

apresentam maior taxa de crescimento. WERRY & STOFFELSEN (1981) também observaram estímulo no crescimento de células de *Haplopappus* quando irradiados com doses baixas e demonstraram que o crescimento era ocasionado por alongação celular.

VERMA & HUUSTEE (1971b) constataram formação de "células gigantes" quando cultura em suspensão de amendoim (*Arachis hypogae* L.) foram irradiadas com raios gama (5 a 500 Krads) e observaram que a divisão celular era completamente inibida, não ocorrendo síntese de DNA. EVANS (1965) irradiando células meristemáticas de *Vicia faba*, obteve retardamento no ciclo mitótico, verificando que as células entravam em intérfase, mas raramente ocorria mitose.

Nota-se na Figura 13 um acentuado aumento na massa de matéria fresca das células irradiadas com 1,0 Krad decrescendo continuamente com aumento das doses, enquanto a massa de matéria seca apresentou-se constante entre 5,0 e 10,0 Krad.

Irradiando células de *Haplopappus* com 0,25 e 0,5 Krad WERRY & STOFFELSEN (1981) obtiveram aumento de massa de matéria fresca e não constataram aumento na massa de matéria seca, concluindo que o tamanho das células aumentava, mas não ocorria aumento no número de células. Resultados semelhantes foram obtidos por SCHIAVUZZO (1986).

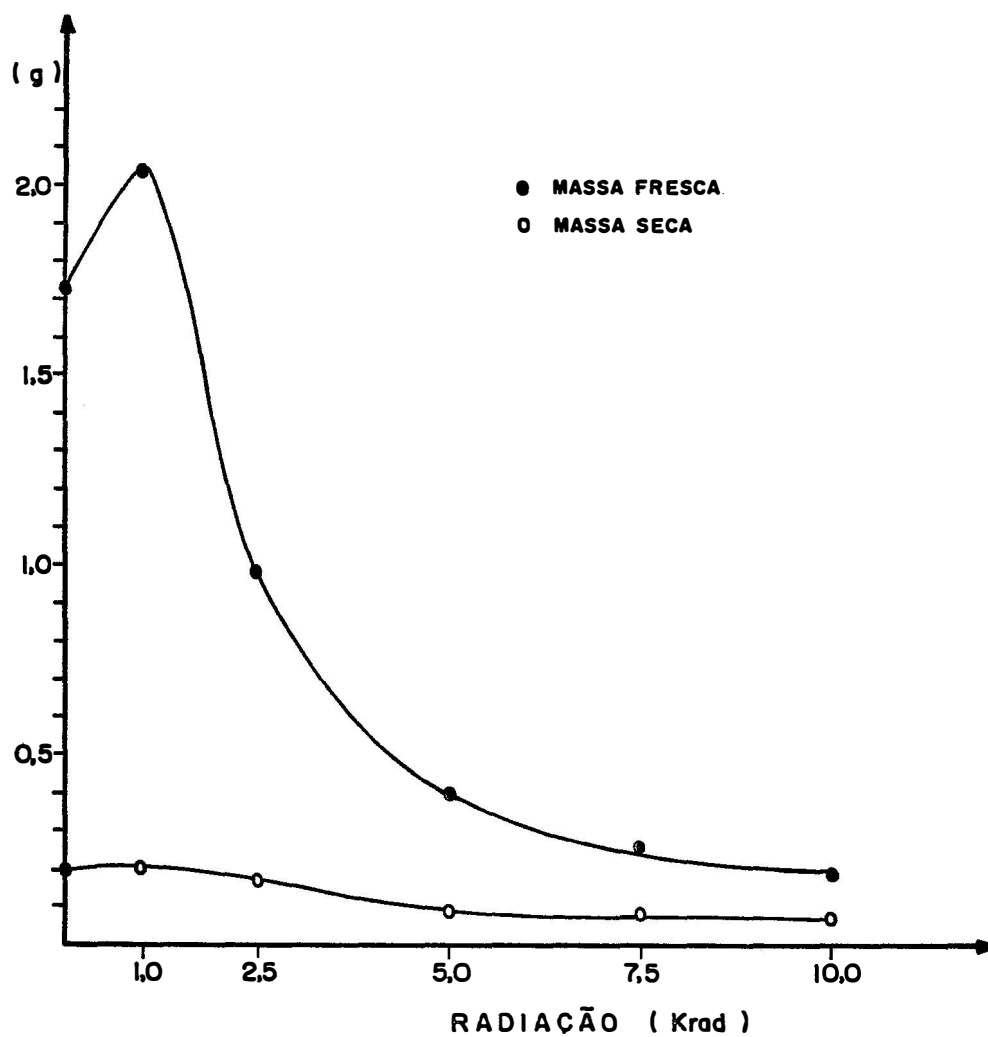


FIGURA 13. Valores da massa de matéria fresca e massa de matéria seca em gramas de calos de mamão irradiados mantidos 42 dias em cultura.

Nos resultados apresentados na Figura 13 podemos visualizar um leve aumento na massa de matéria seca quando explantes de mamão foram irradiados com 1,0 Krad. Este crescimento pode ser explicado, devido a possibilidade de nem todas as células terem sido atingidas pela radiação e terem mantido a capacidade de multiplicar-se. VERMA & HUUSTEE (1971b) verificaram o aparecimento de células "gigantes" e normais após a irradiação indicando que os danos da radiação ocorrem ao acaso, o aparecimento dos dois tipos de células depende do estado fisiológico das células no momento da radiação.

BAJAJ (1970) obteve aumento de massa de matéria seca nas células de feijão irradiadas com 0,5 Krad e o mesmo resultado foi obtido por HOLSTEN *et alii* (1965) em células de cenoura (*Daucus carota* L.). Utilizando doses de 1,0 e 10,0 Krad BAJAJ (1970) obteve decréscimo no crescimento. O fato de células de mamão apresentarem crescimento com até 2,5 Krad pode ser devido a possibilidade de células de mamão serem mais radioresistentes a doses mais altas ou, segundo SHAMSI & SOFAJI (1980), diferenças na taxa de dose influi nos resultados dos efeitos da radiação.

De acordo com WERRY & STOFFELSEN (1981), a taxa de dose é um importante fator que influencia no estímulo do crescimento destacando que os efeitos prejudiciais da radiação são menos severos quando a radiação é aplicada à

taxa de doses menores, provavelmente devido ao fato de aumentar as possibilidades das células se recuperarem dos efeitos letais.

As determinações de massa de matéria fresca e massa de matéria seca foram realizadas aos 42 dias da inoculação. Nesta época observou-se estímulo do crescimento (Figura 12) o qual pode ter influenciado nos resultados. *INOUE et alii 1980* e *INOUE & HASEGAWA (1982)* demonstram que lesões genéticas causadas por radiações podem ser recuperadas e a divisão celular também.

CROCOMO et alii (1982) e *FERREIRA (1983)* apresentam dados e discutem a reversão dos efeitos deletérios da radiação gama em células de cana de açúcar pela ação de reguladores de crescimento, como cinetina e ácido inodolacético.

VERMA & HUUSTEE (1971a) acreditam que o DNA é o primeiro sítio de dano da radiação devido a inibição da mitose. *HABER et alii (1961)* demonstraram a ocorrência de RNA e síntese de proteína na ausência de divisão celular em plantas de trigo originadas de sementes irradiadas. *LARD (1964)* observaram síntese protéica após a irradiação e verificaram que as proteínas sintetizadas neste período eram diferentes das proteínas das células que não sofreram irradiação, levando a erros no metabolismo e subsequente

morte das células.

Na Figura 14 pode-se observar que houve aumento na percentagem de nitrogênio total até a dose de 2,5 Krad, decaindo a percentagem com doses crescentes de radiação. Pode-se também observar que somente 10,0 Krad apresentou menor percentagem de nitrogênio total que a testemunha (0,0 Krad).

BAJAJ (1970) encontrou aumento gradual de nitrogênio total com aumento das doses de radiação em feijão, podendo ser devido a mudanças quantitativas de N-proteico ou aumento de produtos do catabolismo.

O aumento no teor de açúcares solúveis totais nos tratamentos com maiores doses de irradiação, pode ter sido devido, de acordo com *SCHIAVUZZO (1986)*, à degradação de polissacarídeos estruturais. Além disso, como enfatiza essa autora, a liberação de açúcares redutores pode indicar que, num esforço de sobrevivência, as vias de produção de energia aceleram a hidrólise de carboidratos complexos até monossacarídeos e estes não puderam ser aproveitados por outras vias, devido a danos causados no material celular.

Quando células são irradiadas e desenvolvem-se em meio fresco não irradiado, apresentam-se menos afetadas que as crescidas em meio de cultura irradiado. *HOLSTEN*

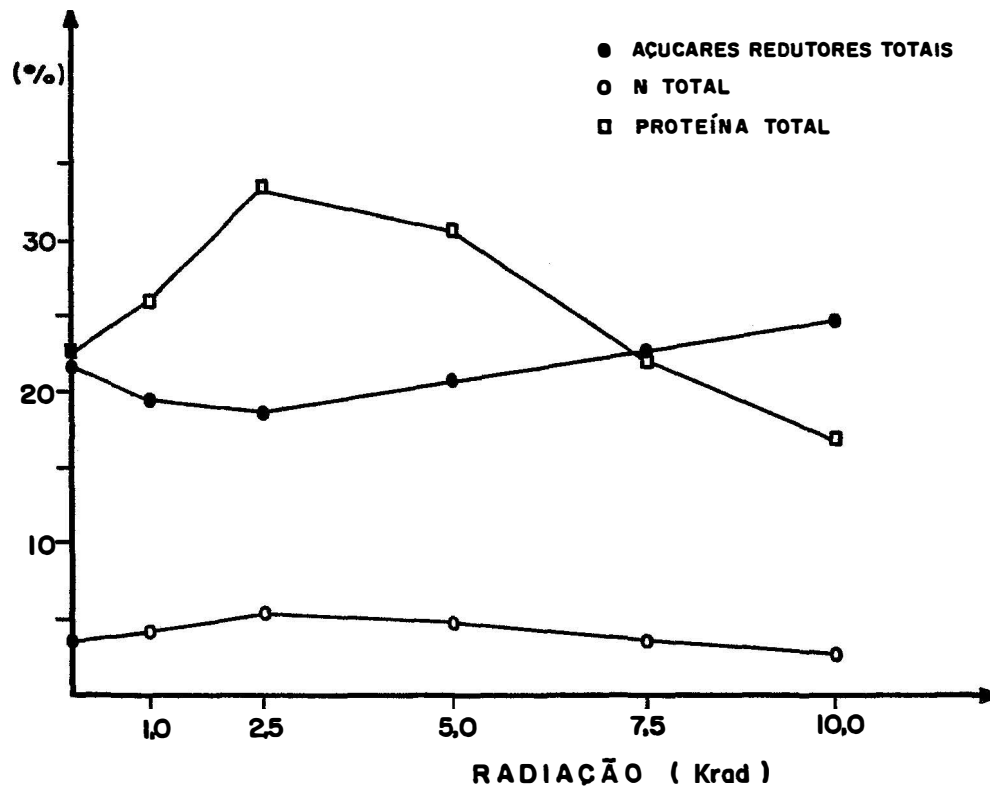


FIGURA 14. Percentagem de nitrogênio total, proteínas e açúcares solúveis totais em calos de mamão irradiados com diferentes doses de radiação gama.

et alii (1965) observaram ocorrência de variações quantitativas nos constituintes químicos do meio, principalmente na sacarose.

Visualmente, conforme aumentava-se as doses de radiação, os calos apresentavam-se escurecidos mostrando áreas de necrose que se acentuavam com o decorrer do tempo. Resultados semelhantes foram observados por *BAJAJ et alii* (1970) em células de feijão, por *FERREIRA* (1983) e *SCHIAVUZZO* (1986) ambos em calos de cana-de-açúcar. De acordo com *SCHIAVUZZO* (1986), esses resultados seriam devido aos efeitos diretos da radiação sobre as auxinas que podem ter se oxidado, ou inibido algumas etapas do seu metabolismo ou até pela ação de polifenóis.

Na Figura 15 pode-se visualizar características do crescimento de calos de mamão irradiados com diferentes doses de radiação gama.

BAJAJ et alii (1970) verificaram que a friabilidade dos calos é grandemente influenciada pela dose de radiação, observando que em doses acima de 2 Krad os calos de feijão tornavam-se menos friáveis. Semelhante resultado foi encontrado nos nossos calos de mamão: a medida que a dose era aumentada, diminuía a friabilidade.

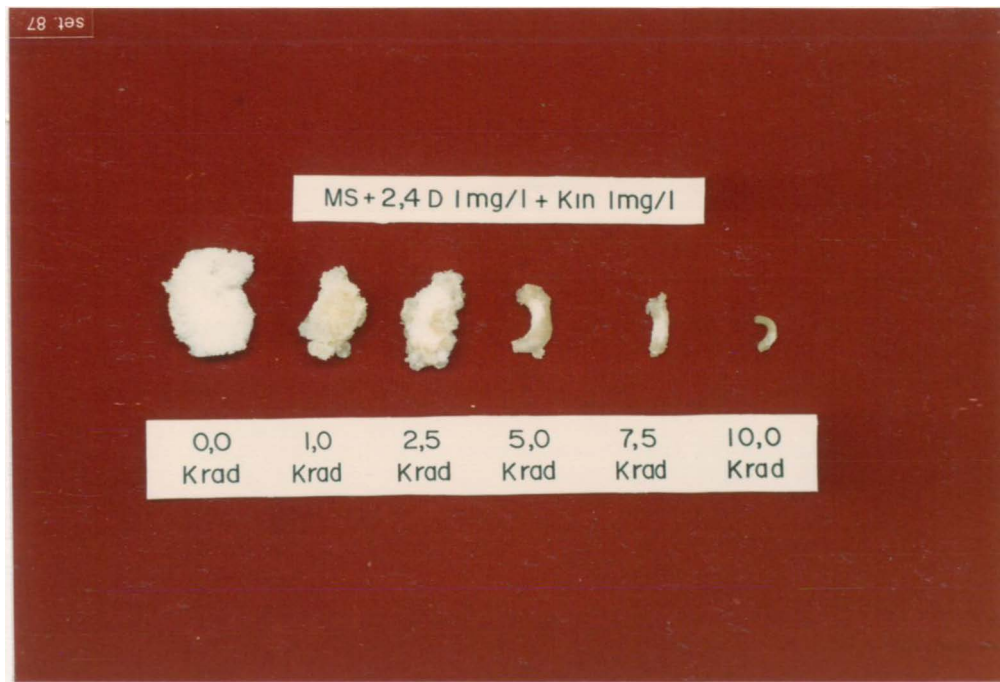


Figura 15. Crescimento de calos de mamão 42 dias após serem inoculados com diferentes doses de radiação gama

4.5. REGENERAÇÃO DE PLANTAS

Procurando estudar a influência da água de côco (15%) e da glutamina (400 mg/ℓ) autoclavada ou filtrada em milipore, o experimento 1 foi conduzido como descrito no ítem 3.7.

Não foi verificado nenhuma diferença nos tratamentos utilizando glutamina filtrada ou autoclavada. A glutamina é uma fonte de nitrogênio orgânico e não mostrou ser essencial para o desenvolvimento de calos e regeneração de plantas. O mesmo resultado foi verificado em relação a caseína, possivelmente devido ao meio de *MURASHIGE & SKOOG (1962)* como descrito no ítem 3.3. apresentar alta concentração de nitrogênio nas formas amoniacal nítrica suficientes para o desenvolvimento de calos e organogênese, quando comparado com o meio de *WHITE (1963)*.

LITZ & CONOVER (1981 b,c; 1982) utilizaram glutamina (400 mg/ℓ) autoclavada suplementando o meio de *WHITE (1963)* para a obtenção de embriogênese somática em cultura de óvulos de *C. papaya* com *C. cauliflora*.

Organogênese de parte aérea foi observada entre 60 a 90 dias após inoculação dos explantes, sendo que os tratamentos contendo BAP (0,8 mg/ℓ) e IAA (1,0 mg/ℓ) apre

sentaram melhores resultados, seguidos dos tratamentos com BAP (0,5 mg/l) e NAA (0,2 mg/l). Tratamentos suplementados com água de côco, demonstraram melhores resultados. A glutamina e a caseína não influenciaram nos resultados.

Os calos formados no Experimento 1, e no ensaio utilizando 2,4-D (1,0 mg/l) e cinetina (1,0 mg/l) (item 3.4.1.) foram subcultivados em diferentes meios de cultura como descrito no Experimento 2 (item 3.7.). A Figura 16 demonstra os resultados obtidos neste experimento.

No Experimento 2, é marcante a influência da água de côco na regeneração de plantas de mamão. No tratamento utilizando apenas solução salina MS com a suplementação descrita na Tabela 5, apresentou percentagem de regeneração menor do que 10% enquanto que o tratamento adicionado de água de côco (15%) aumentou para 50% o nº de plantas apresentando regeneração. Apesar da água de côco ser uma fonte complexa, constituída por diferentes carboidratos, vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento ela é considerada um componente indefinido devido a nem todos os frutos possuírem a mesma constituição, variando muito com a idade do fruto e as condições nutritivas da planta.

Obteve-se aproximadamente 85% de organogênese utilizando BAP (1,0 mg/l) e IAA (1,0 mg/l) com AC (15%). En

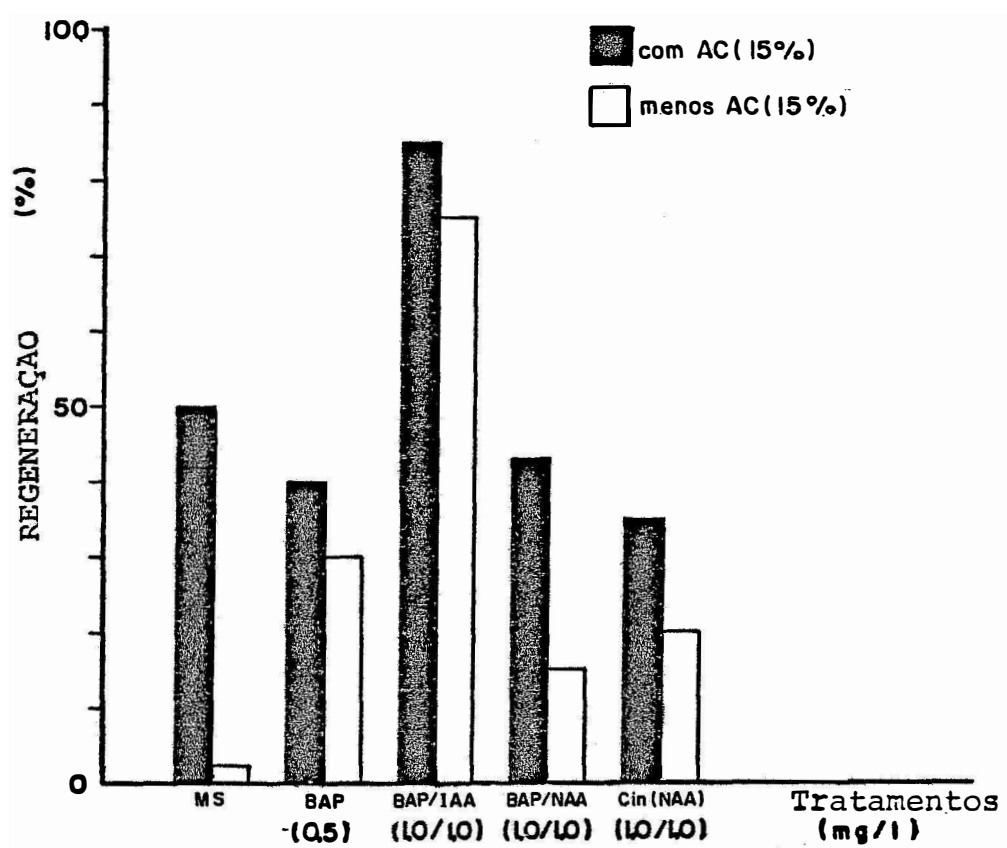


FIGURA 16. Percentagem de regeneração de plantas de mamão a partir de calos.

quanto *ARORA & SINGH (1978b)* obtiveram 89,4% de regeneração de plantas com cinetina (0,2 mg/l) e NAA (5,0 mg/l) foi obtido no experimento menos que 30%, utilizando cinetina (1,0 mg/l) e NAA (1,0 mg/l).

Comparando-se o tempo para indução de organogênese, observou-se que 30 a 40 dias após os calos terem sido transferidos para os tratamentos do experimento 2, houve início de regeneração de plantas, enquanto organogênese indireta (explante → calo → organogênese) no experimento 1 foi superior a 80 dias. *ARORA & SINGH (1978b)* salientam a necessidade de transferir o calo de mamão do meio de indução de calo para um meio de indução de regeneração contendo cinetina e NAA. Tecidos de *Carica* spp. apresentam alto potencial morfogênético (*CONOVER, 1979*).

YIE & LIAW (1977) observaram brotações de ápices 2 a 3 semanas após a transferência de calos para meio com IAA (0,05 mg/l) e cinetina (1,0 mg/l) ou somente cinetina (2,0 mg/l).

A Figura 17 mostra a sequência de organogênese encontrada em calos de mamão mantidas no meio de cultura contendo BAP (1,0 mg/l) e IAA (1,0 mg/l) e a Figura 18 apre



Figura 17. Sequência do desenvolvimento de ápices vegetativos de mamão a partir de calos, (organogênese).



Figura 18. Detalhe da Organogênese.

senta um detalhe da formação de ápices vegetativos em calo mantido no mesmo meio (Figura 17).

Observa-se também, na Figura 18, que a morfologia das folhas das partes aéreas regeneradas dos calos apresentam-se alongadas e não palmatilobadas, característica da planta de mamão (*Carica papaya*).

A variabilidade existente em plantas regeneradas da cultura de células é de grande valor no melhoramento de plantas (LARKIN & SCOWCROFT, 1981).

Variantes somaclonais tem demonstrado algum impacto no melhoramento de cana-de-açúcar (Nickell & Heinz, 1973, citados por LARKIN & SCOWCROFT, 1981), e batata (SHEPARD *et alii*, 1980). Produção de variantes somaclonais poderiam ser selecionados objetivando resistência ao vírus do mosaico do mamoeiro, o maior fator limitante da produção.

NICKELL, L.G.; HEINZ, D.J. Potential of cell and tissue culture techniques as aids in economic plant improvement. In: Genes, Enzymes, and Populations (Ed.:Srb, A.M.), New York; Plenum, 1973. pp.109-128.

4.6. MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação tem como objetivo a multiplicação clonal de plantas com boas características agrônômicas em curto espaço de tempo, livres de patógenos como bactérias, fungos e vírus. A região do ápice caulinar que compreende os dois primórdios foliares, devido ao seu crescimento contínuo e a falta de conexão vascular com os tecidos basais do caule, normalmente é livre de infecção.

O mamão (*Carica papaya* L.) é uma planta dióica ou hermafrodita (PURSEGLOVE, 1968), somente plantas fêmeas e hermafroditas são produtivas. Possui polinização aberta, havendo alta variação genética. Como as plantas são geralmente propagadas por sementes, a cultura não se apresenta com uniformidade, havendo muitas variações nas características dos frutos principalmente em relação a tamanho, forma, sabor e côr.

LITZ & CONOVER (1978a) destacam a necessidade do desenvolvimento de tecnologia para rápida propagação clonal de germoplasmas com bons níveis de tolerância ao vírus do mosaico do mamoeiro.

Observou-se que ápices caulinares com aproximadamente 1 mm inoculados em meio básico de MURASHIGE &

SKOOG (1962) (Tabela 5) com os tratamentos descritos no item 3.3., após 20 dias apresentavam-se com a base túrgida, o que também foi observado por *YIE & LIAW (1977)* formando-se gemas meristemáticas, tendo início brotações de parte aérea.

MEDHI & HOGAN (1976) estabeleceram cultura de ápices de plântulas de mamão em meio MS contendo cinetina mas não observaram múltipla formação de brotações. *YIE & LIAW (1977)* obtiveram crescimento proliferativo da parte aérea também utilizando meio MS contendo IAA (0,05 mg/ℓ) e cinetina (5,0 mg/ℓ) (denominados YL₁ , YL₂) e constituídos de IAA (0,05 mg/ℓ) e BAP (0,5 mg/ℓ). Os autores observaram formação de aproximadamente 8 gemas por ápice caulinar após 4 semanas. Após o que, o tecido começava a necrosar e as plantas apresentavam menor vigor.

Observou-se que utilizando as interações de fitoreguladores sugeridas por *YIE & LIAW (1977)* no meio YL₁ ocorreu apenas formação de calo, sendo que nenhuma brotação foi observada, já o meio YL₂ apresentou brotações, mas houve indução de calos; o resultado pode ser observado na Figura 19.

LITZ & CONOVER (1977) também utilizaram meio básico MS, adicionando NAA (2,0 mg/ℓ) com cinetina (1,0 mg/ℓ) (meio denominado LC₁) e outro meio com NAA (0,1 mg/ℓ) acrescido de BAP (0,5 mg/ℓ) (meio denominado LC₂). Foram

obtidas plantas em ambos os meios, sendo que o meio LC_1 apresentou proliferação mais rápida. Estimaram a possibilidade de se obter 20 milhões de plantas no período de um ano a partir de um explante.

Utilizando as sugestões de *LITZ & CONOVER (1977)* obtivemos formação de plantas apenas no meio LC_2 , que apesar de não ter ocorrido indução de calo, o número de brotações de plantas foi muito baixo, como pode se observar na Figura 19.

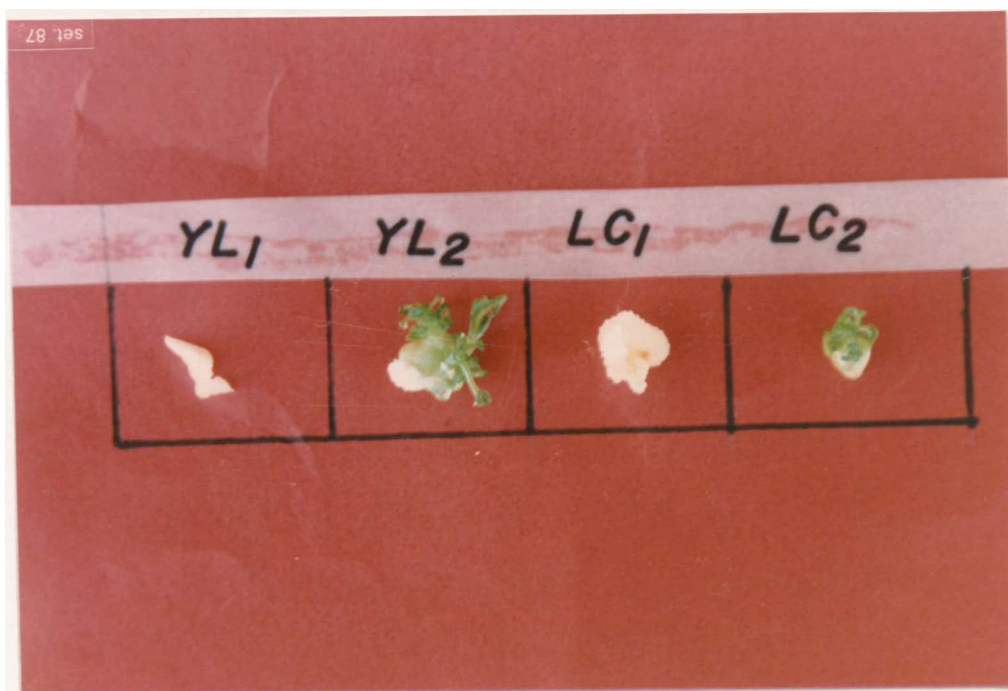


Figura 19. Micropropagação de mamão em meio de Cultura YL_1 ; YL_2 ; LC_1 e LC_2 .

YIE & LIAW (1977) concluíram que alta concentração de citocinina inibia a formação de gemas e crescimento de parte aérea, enquanto que aumentando a concentração de IAA ocorria indução de calos. Observando os tratamentos realizados concluiu-se que baixos teores de auxinas (NAA e IAA) induziram calos com exceção do tratamento LC₂ usando NAA (0,1 mg/l).

Observando o efeito de diferentes concentrações da citocinina benzilaminopurina na indução de gemas em ápices caulinares, verificou-se que utilizando 0,2 mg/l ou 0,5 mg/l ocorria alta proliferação de parte aérea. Partes aéreas desenvolvidas em meio com 0,5 mg/l de BAP apresentaram maior vigor. As folhas apresentavam-se com coloração verde mais intensa e apresentavam maior taxa de sobrevivência na individualização e enraizamento.

Na Figura 20 pode-se observar que nos tratamentos testemunha e BAP (0,1 mg/l) houveram apenas crescimento da gema apical, não ocorrendo proliferação de gemas.

Pode-se observar pela Figura 20, que o desenvolvimento de gemas utilizando-se BAP (1,0 e 2,0 mg/l) foi menor, possivelmente por estas concentrações terem ultrapassado a necessidade endógena da cultura, tornando-se inibitórias à indução de proliferação de parte aérea.

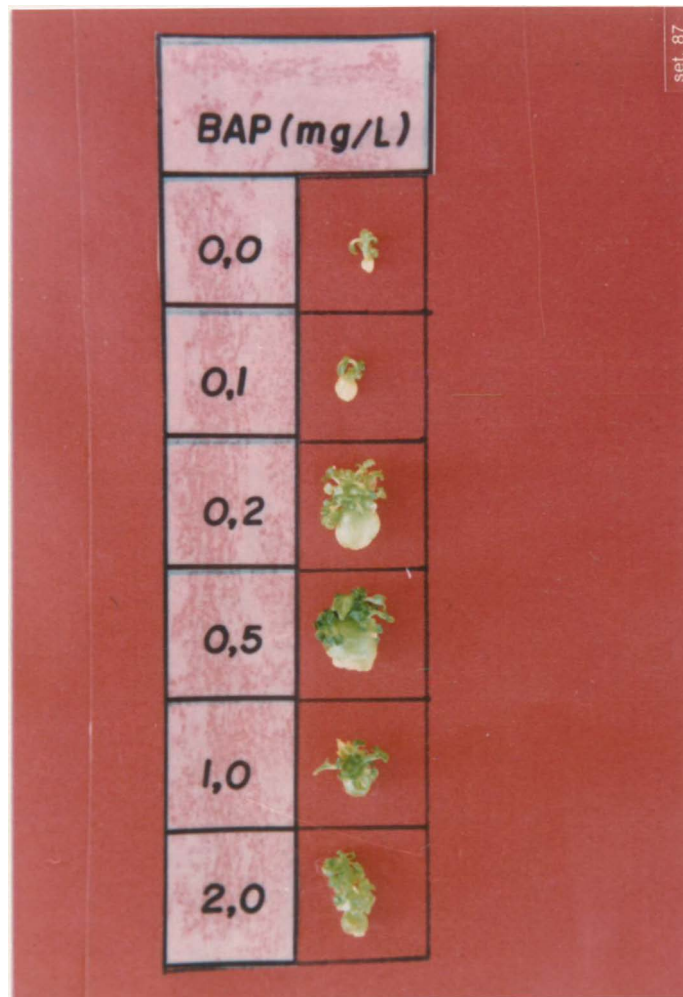


Figura 20. Desenvolvimento de ápices caulinares em diferentes concentrações de BAP (0,0- 0,1- 0,2- 0,5- 1,0 e 2,0) mg/l.

Utilizando-se BAP (0,5 mg/l), foi observada formação de aproximadamente 50 brotações de parte aérea, a partir de um ápice caulinar num período de 60 dias da inoculação do explante. A sequência do desenvolvimento de ápices caulinares estão apresentados na Figura 21. Pode-se observar o grande número de plantas formadas a partir de um único ápice caulinar.



Figura 21. Sequência de desenvolvimento de ápices caulinares em meio de cultura com BAP (0,5 mg/l).

LITZ & CONOVER (1978a) desenvolveram um protocolo de micropropagação de plantas de mamão utilizando como explantes ápices caulinares de plantas adultas crescidas no campo, porque as plantas seriam melhor conhecidas principalmente quanto ao sexo.

O mamoeiro não apresenta ramificações e a retirada do ápice muitas vezes pode levar a planta a morte. Se o objetivo é a propagação de plantas selecionadas, a perda da fonte de explantes pode ser prejudicial. Neste sentido *RAJEEVAN & PANDEY (1986)* desenvolveram uma metodologia para propagação clonal de mamão a partir de gemas laterais de plantas adultas crescidas no campo.

De acordo com *LITZ & CONOVER (1978b)* plantas estaminadas respondem mais rapidamente do que plantas pistiladas e apresentam maior proliferação dos tecidos. Observaram também que a idade da planta mãe e a presença de contaminantes bacterianos e/ou vírus influenciam no tempo de estabelecimento da cultura.

4.7. ENRAIZAMENTO

Partes aéreas regeneradas de ápices caulinares e/ou a partir de calos foram individualizadas e inocu

ladas em meio de cultura com diferentes concentrações de IBA: 0,0 - 0,2 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 3,0 mg/ℓ.

Obteve-se melhor formação de raiz utilizando 0,2 mg/l de IBA. As raízes apresentavam-se normais, longas e demonstravam formação de raízes secundárias, como pode-se observar na Figura 22.



FIGURA 22. Desenvolvimento de raízes em plantas de mamão "in vitro".

Observou-se em alguns frascos formação de raízes pleiotrópicas (para cima). Utilizando 2,0 de mg/l IBA, alguns frascos que apresentaram formação de estruturas como raízes quando se desdiferenciavam em calos, em contato com o meio de cultura.

São bastante controvertidos os resultados obtidos para indução de raízes em cultura de tecidos de mamão. *MEDHI & HOGAN (1976)*, obtiveram formação de raízes e calos utilizando IBA nas concentrações entre 5 a 30 mg/l e observaram que algumas das raízes formadas apresentavam geotropismo negativo. *LITZ & CONOVER (1978a)* testaram diferentes concentrações de IBA (0,1 a 1,0 mg/l) e NAA (0,1 a 3,0 mg/l) e obtiveram melhor desenvolvimento de raiz com 1,0 mg/l de NAA. *RAJEEVAN & PANDEY (1983)* observaram que raízes, induzidas pela presença de NAA no meio de cultura, mostravam-se grossas e anormais, levando a parte aérea à senescência, mas quando utilizavam IBA (2,0 mg/l), as raízes apresentavam-se bem formadas e suportavam a parte aérea na transferência para vasos. *RAJEEVAN & PANDEY (1986)*, obtiveram formação de raiz em 60% dos frascos utilizando IBA (4 mg/l); verificaram brotações secundárias e terciárias, mas a parte aérea não se desenvolveu. Estes autores sugerem a possível necessidade de se fazer 3 a 4 subculturas, o que levaria a um rejuvenescimento da parte aérea, aumentando o grau de competência regenerativa.

ARORA & SINGH (1982b) demonstraram que em baixa taxa cinetina/NAA ocorria diferenciação de raiz, mas quando o meio de cultura apresentava altas concentrações de NAA, as raízes em contato com o meio desdiferenciavam-se em calos. LITZ & CONOVER (1982) obtiveram formação de raízes em plantas híbridas do cruzamento entre *C. papaya* x *C. cauliflora* com interações entre NAA (0,01 a 0,5 mg/l) e BAP (0,05 e 0,2 mg/l).

As plantas após apresentarem sistema vascular bem desenvolvido foram transferidas para vasos plásticos, com vermiculita autoclavada e umedecida com os sais de MURASHIGE & SKOOG (1962), para aclimatação. Após a transferência, foram cobertos com saco plástico imitando uma câmara úmida, onde as plantas permaneceram por 20 dias. Após a retirada dos sacos plásticos, as plantas continuaram mais 20 dias na sala de crescimento e em seguida foram transferidas para casa de vegetação.

A Figura 23, mostra aspecto das plantas mantidas em sala de crescimento.

RAJEEVAN & PANDEY (1983), após analisarem diversos tipos de substratos para aclimatação das plantas obtidas "in vitro", obtiveram os melhores resultados de adaptação em areia, solo e esterco ou areia, solo e vermiculita. Observaram alta mortalidade das plantas devido a quebra da

parte aérea na região do colo (região entre o caule e a raiz), provavelmente causado pelo fungo *Phytophthora parasitica* Dastur, que causa "danping-off" em plantas de viveiro. No Brasil, este fungo ataca somente o colo da planta, mas, em outras regiões como no Hawai ele ataca frutos, caules e folhas (CHALFOUN & LIMA, 1986).

RAJEEVAN & PANDEY (1983), concluíram que o controle umidade para evitar condições que proporcionariam a ocorrência do fungo *Phytophthora*, é mais importante do que o tipo de substrato usado.



Figura 23. Aspecto das plantas após 30 dias em sala de crescimento, (Aclimação).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na manipulação "in vitro" de células e tecidos de mamão (*Carica papaya* L.), nas condições do presente trabalho, permitem as seguintes conclusões:

- . Diferentes auxinas (2,4-D; NAA; IAA) apresentam diferentes respostas no desenvolvimento de calos de mamão sendo que explantes em presença de 2,4-D demonstraram melhor crescimento de calo.
- . Para crescimento de calos, 2,4-D (1,0 mg/l) e cinetina (1,0 mg/l) mostraram ser a melhor interação de fitoreguladores.
- . Calos de mamão, apresentam elevado potencial morfogenético em meio de cultura sólido.
- . Benzilaminopurina foi essencial no controle da morfogênese de calos.

- . Doses acima de 5,0 Krad de radiação gama tem efeito de de letério no crescimento de calos.
- . O efeito deletério da radiação gama em baixas doses de radiação pode ser revertido após 42 dias em células de mamão cultivadas "in vitro".
- . Através da micropropagação, utilizando-se BAP (0,5 mg/l) obteve-se plantas intactas a partir de um ápice caulinar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.M.R. & CARVALHO, S.L.C. Ocorrência do vírus do Mosaico do Mamoeiro no Estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 3:65-69, 1978.
- AMMIRATO, P.V. & STEWARD, F.C. Indirect effects of Irradiation; Morphogenetic Effect of Irradiated Sucrose. *Developmental Biology*, New York, 19:87-106, 1969.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1975-1985, Rio de Janeiro.
- ARORA, I.K. & SINGH, R.N. Growth Hormones and in vitro Callus Formation of Papaya. *Scientia Horticulturae*, Netherlands, 8:357-61, 1978a.
- ARORA, I.K. & SINGH, R.N. In vitro Plant Regeneration in Papaya. *Current Science*, Bangalore, 42 (22):867-8, 1978b.
- ARORA, I.K. & SINGH, R.N. Research Note Callus initiation in the propagation of Papaya (*Carica papaya* L.) in

vitro. *Journal of Horticultural Science*, London, 53:
151, 1978c.

BAJAJ, Y.P.S. Effect of Gamma-irradiation on Growth, RNA,
Protein and Nitrogen Contents of Bean Callus Cultures
Annual Botany, London, 34:1089-96, 1970.

BAJAJ, Y.P.S.; SAETTLER, A.W.; ADAMS, M.W. Gamma Irradiatii
on Studies on Seeds, Seedlings and Callus Tissue Culture
of *Phaseolus vulgaris* L.. *Radiation Botany*, New York,
10:119-124, 1970.

BARBOSA, F.R. & PAGUIO, O.R. Vírus da Mancha Anelar do Ma-
moeiro; Incidência e Efeito na Produção do Mamoeiro.
(*Carica papaya* L.). *Fitopatologia Brasileira*, Brasíl
lia, 7(3):365-73, 1982.

BENZA, J.C.; CARRASCO, V.B.; RODRIGUEZ, J.B. Status Del Me-
joramiento Del Papayo en La Molina, Peru.
Agronomia Tropical, Maracay. XVII(4):381-9, 1967.

BEWLEY, J.D. & BLACK, M. Physiology and Biochemistry of
Seeds. In: _____. *Relation to Germination*. Berlin,
Springer-Verlag, 1978. V.1., cap. 4 e 5.

BILDERBACK, D.; BILDERBACK, D.E.; MEDORA, R.; MELL, G. Proo

- teases from Papaya Tissue Cultures. *Plant Physiology*. Lancaster, 57:67, 1976.
- BOKX, J.A. Hosts and Electron Microscopy of Two Papaya viruses. *Plant Disease Reporter*. Washington, 49(9):742-6, 1965.
- CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. *Sementes; Ciência, Tecnologia e Produção*. 2.ed. Campinas, Fundação Cargill, 1983. 429p.
- CARVALHO, V.N.R. & PONTE, J.J. Doenças do Mamoeiro ocorrentes no Estado do Ceará, Brasil. *Fitossanidade*, Fortaleza, 6/9(Único):106-8, 1985.
- CHALFOUN; S.M. & LIMA, R.D'A. Doenças causadas por Fungos e Nematóides em Mamoeiro. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 12(134):40-4, 1986.
- CHAN, H.T. Papaya. In: _____. *Handbook of Tropical Foods*, New York, 1983. p.469-88.
- CHAN, H.T. & KWOK, S.C.M. Importance of Enzyme Inactivation prior to Extraction of Sugar from Papaya. *Journal of Food Science*, Illinois, 40:770-1, 1975.

- CHAN, H.T. & TANG, C.S. The Chemistry and Biochemistry of Papaya. In: INGLETT, G.E. & CHAROLAMBOUS, G. *Tropical Foods*. New York, Academic Press, 1979. V.1., p.33-55.
- CHAUHAN, Y.S. & SINGH, R.P. Morphological Studies in Saf flower (*Carthamus tinctorius* Linn.) with Special reference to the Effect of 2,4-D and Gamma rays - I. Vegetative shoot apex. *Radiation Botany*, New York, 15:68-77, 1975.
- CONOVER, R.A. A Program for Development of Papayas tolerant to the Distortion Ringspot Virus. *Proceedings Florida State Horticultural Society*, Tallahassee, 89:229-31, 1976.
- CONOVER, R.A. Yellow Strap Teaf, a New Disease of Florida Papayas. *Proceedings of Florida State Horticultural Society*, Tallahassee, 92:276-7, 1979.
- COOK, A.A. & ZETTLER, F.W. Susceptibility of Papaya Cultivars to Papaya Ringspot and Papaya Mosaic Viruses. *Plant Disease Reporter*, Washington, 54(10):893-5, 1970.
- COSTA, A.S. & CARVALHO, A.M. O Problema da Resistência ao Mosaico do Mamoeiro. *Revista Sociedade Brasileira de Fitopatologia*, Piracicaba, 4:37-8, 1971.
- COSTA, A.S.; CARVALHO, A.M.; KAMADA, S. Constatado o Mosaico

do Mamoeiro em São Paulo. *O Agrônômico*, Campinas, __
21(3/4):38-43, 1969a.

COSTA, A.S.; CARVALHO, A.M.; KAMADA, S.; CAMARGO, I.J.B. Es
tudos sobre o Mosaico do Mamoeiro em São Paulo. *Revista*
Brasileira de Fitopatologia, Piracicaba, 3:55-6, 1969b.

CROCOMO, O.J.; FERREIRA, J.H.; BANDEL, G.; GONÇALVES, A.N.;
SCHIAVUZZO, M.A. Biochemistry and Cytological Aspects of
the Development of Irradiated Sugarcane Cells and Tissu-
es. In: *International Congress of Plant Tissue and Cell*
Culture, 5., Tokyo, 1982. *Proceedings*. A. Fujiwara,
1982. p. 129-30.

CROCOMO, O.J. & OCHOA-ALEJO, N. Cultura de Tecidos Vegetais.
In: *Encontro de Geneticistas Paulistas*, 3., Jaboticabal,
1983. *Anais*. Jaboticabal, ed., 1983. p. 27-82.

DEGANI, N. Radiation Induced Organogênisis Effects of Irra-
diated Medium and its Components on Tobacco Tissue Cul-
ture. *Radiation Botany*, New York, 15:363-6, 1975.

DODDS, J.H. & ROBERTS, L.W. Cell Suspension Cultures. In:
_____. *Experiments in Plant Tissue Culture*. New
York, Cambridge University Press, 1982. p.54-63.

- DOUGLAS, G.C. Effects of Gamma Radiation on Morphogenesis and Mutagenesis in Cultured Stem explants of Poplar. In: *Nuclear Techniques and in vitro Culture for Plant Improvement*. Vienna, AIEA, 1986. p. 121-8.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBES, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, Washington, 28:350-6, 1956.
- DUBUC-LEBREUX, M.A. & VIETH, J. Effects des rayons ⁶⁰Co sur des tigelles de *Gerbera jamesonii* Irradiées in vitro. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 65:261-7, 1987.
- EVANS; H.J. Effects of Radiations on Meristematic Cells. *Radiation Botany*, New York, 5:171-82, 1965.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Production Yearbook*, Rome. V.30-9, 1975-1985.
- FERREIRA, J.H. Interação Radiação Gama X Reguladores de Crescimento no Desenvolvimento de Células e Tecidos de Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp.*) *in vitro*. Piracicaba, 1983, p. 69. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- FOSKET, D.E.; VOLK, M.J.; GOLDSMITH, M.R. Polyribosome formation in relation to Cytokin-Induced Cell Division in Suspension Cultures of *Glycine max* L. Merr. *Plant Physiology*, Washington, 60:554-62, 1977.
- GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. *Plant Propagation by Tissue Culture*; Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Hants, Exergetcs Limited, 1984. p.709.
- GIACOMELLI, M.; BELLIDONINI, M.L.; CERVIGNI, T. Effects of Kinetin on Barley leaves. *Radiation Botany*, New York, 17:375-84, 1967.
- GONÇALVES, D. & ISHII, M. Purification and Serology of Papaya Ringspot Virus. *Phytopathology*, Lancaster, 70:1025-32, 1980.
- GUNCKEL, J.E. & SPARROW, A.H. Ionizing Radiations: Biochemical, Physiological and Morphological Aspects of their effects on Plants. In: RUTTLAND, W. *Encyclopedia of Plant Physiology*, Berlin, Springer-Verlag, 1961. V. 16.
- HABER, A.H.; CARRIER, W.L.; FOARD, D.E. Metabolic Studies of Gamma-Irradiated Wheat Growing without Cell Division. *American Journal of Botany*, New York, 48:431-8, 1961.

HANDLER, H. & HUET, R. La Papaine. *Fruits*, Paris, 20(8):
411-5, 1965.

HARRISON, B.D. FINCH, J.T.; GIBBS, A.J.; HOLLINGS, M.;
SHEPHERD, R.J.; VALENTE, V. WETTER, C. Sixteen Group of
Plant Viruses. *Virology*, New York, 4:356-63, 1971.

HELL, K.G. Efeitos das Radiações Ionizantes em Culturas
de Tecidos Vegetais. *Simpósio sobre Culturas de Células*.
São Paulo, 1978. *Anais*. São Paulo, ACIESP, 1978. p.
101-6.

HELL, K.G. Efeito da Radiação Gama em Culturas de Tecidos
de *Nicotiana tabacum* L. cv. W-38. São Paulo, 1979. p.
101. (Livre Docência - Departamento de Biociências/USP)

HELL, K.G. Survival of *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin-
38. Plantas Regenerated from Gamma-Irradiated Tissue
Cultures. *Environmental and Experimental Botany*,
London, 23(2):139-42, 1983.

HELL, K.G.; HANDRO, W.; KERBAUY, G.B. Enhanced Bud formati-
on in -Irradiated Tissue of *Nicotiana tabacum* L. cv.
Wisconsin-38. *Environmental Experimental Botany*, London,
18:225-8, 1978.

HEYDECKER, W. Stress and Seed Germination: An Agronomic

view. In: KHAN, A.A. *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormency and Germination*. Amsterdam, Elsevier, 1977. p.237-82.

HOLSTEN, R.D.; SUGLL, M.; STEWARD, F.C. Direct and Indirect Effect of Radiation on Plant Cells: Their Relation to Growth and Growth Induction. *Nature*, London, 208(27): 850-6, 1965.

HOROVITZ, S. & JIMENES, H. Cruzamientos Interespecificos e Intergenericos en *Caricaceae* Y sus Implicaciones fito tecnicas. *Agronomia Tropical*, Maracay, 17:323-43, 1967.

INOUE, M. & HUYSTEE, R.B.V. Age-Dependent Effects of Gamma Exposure on form, Growth and Peroxidase Activity of Cultured Peanut Cells. *Environmental and Experimental Botany*, London, 24(1):53-62, 1984.

INOUE, M.; ITO, R.; TABATA, T.; HASEGAWA, H. Varietal Differences in the Repair of Gamma-Radiation Induced Lesions in Barley. *Environmental and Experimental Botany*, London, 20:161-8, 1980.

INOUE, M.; OKU, K.; HASEGAWA, H. Temperature Effect on the Repair of Gamma-Induced Lesions in Barley Seeds. *Environmental and Experimental Botany*, London, 22(4):415-26, 1982.

- IQBAL, J.; KUTACEK, M.; JIRACEK, V. Effects of Acute Gamma Irradiation on the Concentration of Amino Acids and Protein-Nitrogen in *Zea mays*. *Radiation Botany*, New York, 14:165-72, 1974.
- JENSEN, D.D. Papaya Ringspot Virus and its Insect Vector Relationships. *Phytopathology*, Lancaster, 39:212-200, 1949.
- JONARD, R.; BAYONOVE, J.; RAVELOMANA, D.; RIEDEL, M. Cytokinines et Radiorestaurations des Tissus vegetaux, Normaux et tumoraux. *Environmental and Experimental Botany*, London, 19:13-26, 1979.
- JORDAN, M.; CORTES, I.; MONTENEGRO, G. Regeneration of Plantlets by Embryogenesis from Callus Cultures of *Carica Candamarcensis*. *Plant Science Letters*, Amsterdam, 28:321-6, 1983.
- JORGENSEN, S.S. *Laboratory Manual. Some Methods used for Routine Chemical Analysis*. Piracicaba, Centro de Energia Nuclear Na Agricultura (CENA/USP), 1977. p.23.
- KLAMBT, D. Cytokinin Effects on Protein Synthesis of *in vitro* Systems of Higher Plants. *Plant Cell Physiology*, Nagoya, 17:73-6, 1976.

- KLEIN, R.M. & KLEIN, D.T. Post-Irradiation Modulation of Ionizing Radiation Damage to Plants. *The Botanical Review*, Lancaster, 37(4):397-437, 1971.
- KUSPE, S.S.; HENDRE, R.R.; MASCARENHAS, A.F.; JAGANAATHAN, V. Utilization of Tissue Culture to Isolate Interspecific Hybrids in *Carica* L. In: RAO, P.S.; HEBLE, M.R.; CHADHA, M.S. *Plant Tissue Culture, Genetic Manipulation, and Somatic Hybridization of Plant Cells*. Bombay, IAEA, 1980. p.198-205.
- LANA, A.F. Transmission and Properties of viruses Isolated from *Carica papaya* in Nigeria. *Journal of Horticultural Science*, London, 55(2):191-7, 1980.
- LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. Somaclonal Variation a Novel Source of Variability from Cell Cultures. *Theoretical Apply Genetics*, Berlin, 60:197-214, 1981.
- LEKEU, J.P.M. Producción de Papaina; Usos y Perspectivas de Mercado sobre Enzimas Industriales Hacia 1990. In: *La Biotecnología en el Grupo Andino Año 2000*. Caracas, 1987, *Proceedings*. Lima, Associação Internacional de la Papaina. 1987. p.13.
- LIMA, J.A.A. & GOMES, M.N.S. Identificação de *Papaya Ringspot Virus* em Fortaleza, Ceará. *Fitossanidade*, Fortaleza,

1(2):56-9, 1975.

LINSMAYER, E.M. & SKOOG, F. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum*, Kobenhavn, 18:100-27, 1965.

LITZ, R.E. Papaya. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. *Handbook of Plant Cell Culture*, New York, Mac Millan Publishing Company, 1984. V.2, p.349-68.

LITZ, R.E.; & CONOVER, R.A. Tissue Culture Propagation of Papaya. *Proceedings of Florida State Horticultural Society*, Tallahassee, 90:245-6, 1977.

LITZ, R.E. & CONOVER, R.A. *In vitro* Propagation of Papaya. *Hortscience*. St. Joseph, 13(3):241-2, 1978a.

LITZ, R.E. & CONOVER, R.A. Recent Advances in Papaya Tissue Culture. *Proceedings Florida State Horticultural Society*, Tallahassee, 91:180-1, 1978b.

LITZ, R.E. & CONOVER, R.A. Development of systems for obtaining Parasexual *Carica* Hybrids. *Proceedings Florida State Horticultural Society*, Tallahassee, 92:281-3, 1979.

LITZ R.E. & CONOVER, R.A. Somatic Embryogenesis in Cell Cul-

- tures of *Carica stipulata*. *HortScience*, St. Joseph, 15
(6):733-5, 1980.
- 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 American*
Society Horticulturae Science, Geneva, 106(6) :792-4,
1981a.
- LITZ, R.E. & CONOVER, R.A. IN VITRO Polyembryony in *Carica*
papaya ovules. *HortScience*, St. Joseph, 16(3):459,1978b.
- LITZ, R.E. & CONOVER, R.A. *In Vitro* Polyembryony in *Carica*
papaya L. ovules. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*,
Jena, 104:285-8, 1981c.
- LITZ, R.E. & CONOVER, R.A. *In Vitro* Somatic Embryogenesis
and Plant Regeneration from *Carica papaya* L. ovular
Callus. *Plant Science Letters*, Amsterdam, 26:153-8,
1982.
- LITZ, R.E.; O'HAIR, S.K.; CONOVER, R.A. *In Vitro* Growth of
Carica papaya L. cotyledons. *Scientia Horticulturae*
Amsterdam, 19:287-93, 1983.
- LUNA, J.V.U. Variedades de Mamoeiro. *Informe Agropecuário*,
Belo Horizonte, 12(134):14-8, 1986.

- MAGUIRE, J.D. Seed Quality and Germination. In: KHAN; A. A. *The Physiology and Biochemistry of Seeds Dormency and Germination*. Amsterdan, Elsevier, 1977. p.219-36.
- MANICA, I. *Fruticultura Tropical*. 3-Mamão. São Paulo, Editora Ceres, 1982. p.255.
- MANOHAR, M.S. & HEYDECKER, W. Effects of Water Potential on Germination of Pea Seeds. *Nature*, London, 202:22-4, 1964.
- MARIN, S.L.D. & GOMES, J.A. *Sexagem do Mamoeiro e sua Aplicação no Desbaste de Plantas*. *Circular Técnica*. Vitória EMBRAPA, 1985. p.22.
- MEDHI, A.A. & HOGAN, I. Tissue Culture of *Carica papaya* L. *HortScience*. St. Joseph, 11(3):311, 1976.
- MEDINA, J.C. Cultura. In: MEDINA, J.C.; GARCIA, J.L.M.; SALAMÓN, E.A.G.; VIEIRA, L.F.; RENESTO, O.V.; FIGUEIREDO; N.M.S.; CAÑTO, W.L. *Mamão; Da Fruta ao Processamento e Comercialização*. Campinas, ITAL, 1980. p.7-106. (Série Frutas Tropicais, 7.).
- MEDORA, R.S.; BILDERBACK, D.E.; MELL, G.P. Effect of Media on Growth of Papaya Callus Cultures. *Zeitschrift fur*

Pflanzenphysiologie, Jena, 91:79-82, 1979.

MEDORA, R.S.; CAMPBELL, J.M.; MELL, G.P. Proteolytic Enzymes in Papaya Tissue Cultures. *Lloydia*, Cincinnati, 36 (2):214-6, 1973.

MEDORA, R.S.; MELL, G.P.; BILDERBACK, D.E. Effect of various Media on Growth and Protease Production in *Carica papaya* L. Callus Culture. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, Jena, 114:179-85, 1984.

MELO, W.J. A Papaina. In: *Simpósio Brasileiro sobre a Cultura do Mamoeiro*. 1. Jaboticabal, 1980. *Anais*. Jaboticabal, Editora Ceres, 1980. p.289-305.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and BioAssays with Tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum*, Kobenhavn, 15:473-97, 1962.

NAMBA, R. Situação das Doenças de Virus nos Trópicos. In: *Simpósio Brasileiro sobre a Cultura do Mamoeiro*, 2., Jaboticabal, 1988. *Anais*. Jaboticabal, 1988. (no prelo).

NAKASONE, H. Melhoramento Genético no Havaí. In: *Simpósio Brasileiro sobre a Cultura do Mamoeiro*, 2., Jaboticabal, 1988. *Anais*. Jaboticabal, 1988. (no prelo).

- PAGUIO, O.R. & BARBOSA, F.R. Constatação de "Papaya Ringspot Virus" no Estado de Pernambuco, *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 4:133, 1979.
- PANDEY, K.N. & SABHARWALL, P.S. Cell Division factors (cytokinins) from irradiated Plant Tissue. *Nature*, London, 271: 449-50, 1978.
- POLLARD, E. Ionizing Radiation: Effect on Genetic Transcription. *Science*, Washington, 146:927, 1964.
- PURSEGLOVE, J.W. Caricaceae. In: _____. *Tropical Crops; dicotyledons*. New York, Longmans, 1968. V.1., p.45-51.
- QUIOT-DOUINE, L.; PURSEFULL, D.E.; HIEBERT, E.; MEJIA, M.V. G. Serological Relationships and In Vitro Translation of an Antigenically Distinct Strain of Papaya Ringspot Virus. *Phytopathology*, Lancaster, 76(3):346-51, 1986.
- RAAJEEVAN, M.S. & PANDEY, R.M. Lateral Bud Culture of Papaya (*Carica papaya* L.) for Clonal Propagation. *Plant Cell and Organ Culture*, Netherlands, 6:181-8, 1986.
- RAAJEEVAN, M.S. & PANDEY, R.M. Propagation of Papaya Through Tissue Culture. *Acta Horticulturae*, Hague, 131:131-9. 1983.

REZENDE, J.A.M. Mosaico ou Mancha Anular do Mamoeiro: Qual a melhor designação no Brasil? *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 9:455-65, 1984.

REZENDE, J.A.M. Tentativas de Premunização para o Controle do Mosaico do Mamoeiro. Piracicaba, 1985. p.64. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

REZENDE, J.A.M.; COSTA, A.S.; MARTINS, A.L.M.; TULMANN NETO, A.; SOARES, N.B. Segregação de Tolerância ao Vírus do Mosaico do Mamoeiro na Variedade IAC-98 observada em ensaios de Progenies. *Summa Phytopathologica*, Lancaster, 11:42-5, 1985.

ROMANI, R.J. & FISCHER, K. Mitochondrial Resistance to Massive Irradiation *in vitro* IV. Suppression and recovery in rate of Amino Acids Incorporation into Mitochondrial Protein. *Archives of Biochemistry Biophysics*, New York, 117:645, 1966.

SCHIAVUZZO, M.A. Respostas Bioquímicas e Citológicas de Células de Cana-de-Açúcar (*Saccharum* spp) à Radiação Gama Piracicaba, 1986. p.68. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- SHAMSI, S.R.A. & SOFAGY, S.A. Effects of Low Doses of Gamma Radiation on the Growth and Yield of Two Cultivars of Broad Bean. *Environmental and Experimental Botany*, London, 20:87-94, 1980.
- SHARP, W.R. & CROCOMO, O.J. *Applications of Nuclear Energy to the Study of Cellular and Developmental Biology*. Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, 1975. p.245. (A. Series V.1.).
- SHEPPARD, J.F.; BIDNEY, D.; SHAHIN, E. Potato Protoplasts in Crop Improvement. *Science*, Washington, 28:17-24, 1980.
- SHEPPARD, S.C. & EVENDEN, W.G. Factors Controlling of Response of Field Crops to very low doses of Gamma Irradiation of the Seed. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, 66:431-41, 1986.
- SIEGEL, S.M. & ROSEN, L.A. Effects of Reduced Oxygen Tension on Germination and Seedling Growth. *Physiologia Plantarum*, Kobenhavn, 15:437-44, 1962.
- SIMÃO, S. Mamoeiro. In: _____. *Manual de Fruticultura*, São Paulo, Editora Ceres, 1971. p. 313-38.

- SINGH, A.B. A New Disease of *Carica papaya* in India. *Plant Disease Reporter*, Washington, 53:267-9, 1969.
- SKOK, J.; CHORNEY, W.; RAKOSNIK Jr, J. An Examination of Stimulatory Effects of Ionizing Radiation in Plants. *Radiation Botany*, New York, 5:281-92, 1965.
- SKOOG, F. Growth and Organ Formation in Tobacco Tissue Culture. *American Journal of Botany*, New York, 31:19-24 , 1944.
- SLAVINSKI Jr, A.J. Effects of Gamma Radiation on the Growth and Form of *Pediastrum Boryanum*, *Environmental and Experimental Botany*, London, 20(3):247-52, 1984.
- TAVARES, A. Exportação. In: *Simpósio Brasileiro sobre a Cultura do Mamoeiro*, 2., Jaboticabal, 1988. *Anais*, Jaboticabal. (no prelo).
- TOLEDO, F.F. & MARCOS FILHO, J. *Manual das Sementes; Tecnologia da Produção*. Piracicaba, Editora Ceres, 1977. p. 224.
- YAMAMOTO, H.; TANAKA, S.; FUKUI, H.; TABATA, M. Enzymatic difference between lactifers and Cultured Cells of Papaya. *Plant Cell Reporters*, Berlin, 5:269-72, 1986.

- YEH, S.D. & GONSALVES, D. Evaluation of Induced Mutants of Papaya Ringspot Virus for Control by Cross Protection
Phytopathology, Lancaster, 74(9):1086-91, 1984.
- YIE, S.T. & LIAW, S.I. Plant Regeneration from Shoot Tips and Callus of Papaya. *In Vitro*, Gaiphersberg, 13(9):564-8, 1977.
- VASIL, V. & HILDEBRANDT, A.C. Differentiation of Tobacco Plants from single Isolated Cells in Microculture,
Science, Washington, 150: 889-92, 1965.
- VERMA, D.P.S. & HUYSTEE, R.B.V. Aberrant Recovery of Protein Synthesis after Massive Irradiation of *Arachis hypogaea* L. Cells *in vitro*. *Radiation Reserch*, New York, 48:531-41, 1971a.
- VERMA, D.P.S. & HUYSTEE, R.B.V. Induction of Gigant Cells, in Suspension Cultures of *Arachis Hypogaea* L. By Massive Irradiation. *Radiation Research*, New York, 48:518-30, 1971b.
- VOSE, P.B. Radiation and other Induced Mutation in Plant Breeding. In: _____ *Introdution to Nuclear Techiniques in Agronomy and Plant Biology*. New York, Pergamon Press, 1980. p.361-85.

- WERRY, P.A.T.J. & STOFFELSEN, K.M. Radiation Stimulated Increase of Planting Efficiency of free Plant Cells. *Theoretical Apply Genetics*, Berlin, 59:391-3, 1981.
- WHITE, P.R. *The Cultivation of Animal and Plant Cells. 2.*, New York, Ronald Press Company, 1963. p.228.
- WHITE, P.R. & RISSER, P.G. Some Basic Parameters in the Cultivation of Spruce Tissues. *Physiologia Plantarum*, Kobenhavn, 17:600-19, 1964.
- ZERPA, D.M. Citologia de Híbridos Interspecíficos en *Carica*. *Agronomia Tropical*, Maracay, VIII(4):135-44, 1959.
- ZETTLER, F.W.; EDWARDSON, J.R.; PURSIFULL, D.E. Ultramicroscopic Differences in Inclusions of Papaya Mosaic Virus and Papaya Ringspot virus Correlated with Differential Aphid Transmission. *Phytopathology*, Lancaster, 58:332-5, 1968.