

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL**

**DRIELLY STEPHANIA GOUVEA**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO MAMOEIRO  
HERMAFRODITA UENF/CALIMAN 01**

**São Mateus - ES  
Junho de 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO MAMOEIRO  
HERMAFRODITA UENF/CALIMAN 01**

**DRIELLY STEPHANIA GOUVEA**

Dissertação apresentado à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para obtenção do título de mestre em Agricultura Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre

**São Mateus - ES**

**Junho de 2016**

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)  
(Divisão de Biblioteca Setorial do CEUNES - BC, ES, Brasil)

---

G719e Gouvea, Drielly Stephania, 1987-  
Embriogênese somática do mamoeiro hermafrodita  
UENF/Caliman 01 / Drielly Stephania Gouvea. – 2016.  
56 f. : il.

Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre.  
Coorientador: Wagner Campos Otoni.  
Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário  
Norte do Espírito Santo.

1. Embriogênese somática. 2. Carica papaya. 3. Plantas -  
Propagação in vitro. 4. Explante. 5. Auxina. I. Alexandre, Rodrigo  
Sobreira. II. Otoni, Wagner Campos. III. Universidade Federal do  
Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. IV.  
Título.

CDU: 63

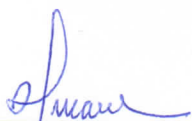
---

# “EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO MAMOEIRO HERMAFRODITA UENF/CALIMAN 01”

**DRIELLY STEPHANIA GOUVEA**

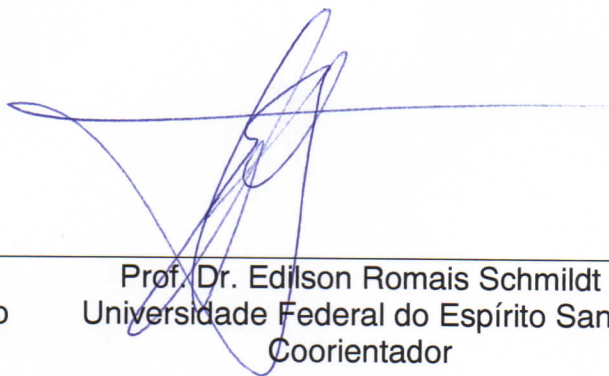
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Aprovada em 28 de junho de 2016.



---

Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador



---

Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Coorientador



---

Prof. Dr. Omar Schmildt  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Coorientador



---

Prof. Dr. João Paulo Bestete de Oliveira  
Instituto Federal do Espírito Santo  
Examinador Externo

A minha família, mãe Geralda Gouvea, pai Geraldo Gouvea e irmão Lucas, pela fé e confiança depositados em mim, e por terem sido a base de tudo o que construí ao longo da minha vida.

Aos meus amigos por estarem ao meu lado em mais essa jornada, tornando o caminho mais agradável e cada momento em uma experiência única a ser lembrada.

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que permitiu que tudo isso fosse possível.

A universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), e ao programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, pela oportunidade de realização do curso e pelo crescimento acadêmico e profissional nessa instituição.

Àqueles que são o alicerce dessa conquista: meus pais, que sempre me apoiaram e atribuíram valores para alcançarmos o sucesso dignamente. Obrigada pelo amor incondicional e dedicação constante!

Ao meu irmão, pelo carinho e amizade.

Ao Professor Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre, pelos ensinamentos, pela orientação indispensável no curso, pela amizade e, principalmente, pelo exemplo de profissional ético, dedicado e apaixonado pelo que faz.

Ao co-orientador, Professor Dr. Wagner Campos Otoni, pela valiosa contribuição prática e teórica, abrindo as portas da Universidade Federal de Viçoso para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Professor Dr. Edilson Romais Schmildt pela contribuição nas análises estatísticas e ao professor Omar Schmildt pelas relevantes contribuições no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas de Laboratório de Cultura de Tecidos II, do Bioagro – UFV, pelo auxílio técnico, convivência agradável e momentos de descontração, dentro e fora do ambiente de trabalho.

Aos amigos Bruna, Kristhiano, Victor Hugo, Marcelo, Andressa, Matheus, Guilherme e Lucas, pelo constante incentivo, bom humor e cumplicidade dando-me forças nas horas de luta, apoio nas horas difíceis e alegria nas vitórias.

Muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

DRIELLY STEPHANIA GOUVEA, filha de José Geraldo de Gouvea e Geralda Lúcia da Silva Gouvea, nasceu na cidade de Viçosa, MG, em 18 de Dezembro de 1987. No ano de 2008 ingressou na terceira turma do curso de Agronomia da Universidade Federal do Espírito Santo no Centro Universitário Norte do Espírito Santo, onde se graduou em bacharelado no ano de 2013. No período de graduação, teve experiência na área de olericultura, especificamente com alface e almeirão na área de sistemas orgânicos de produção. E trabalhos com fruticultura tropical, com pimenta-do-reino realizando pesquisas na área de propagação e produção dessa espécie. Em 2014, ingressou no Programa de Pós-graduação de Mestrado em Agricultura Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, onde se obteve o título de mestre em Agricultura Tropical, trabalhando com propagação de plantas por meio da técnica de embriogênese somática, submetendo-se à defesa de dissertação em 28 de junho de 2016.



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Importância econômica.....	5
2.2. Propagação do mamoeiro.....	7
2.3. Embriogênese somática.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Material vegetal.....	16
3.2. Estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i> .....	17
3.3. Indução da embriogênese somática.....	18
3.4. Maturação dos embriões somáticos.....	18
3.5. Germinação dos embriões cotiledonares.....	19
3.6. Análise estatística.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1. Indução da embriogênese somática.....	21
4.2. Maturação dos embriões somáticos.....	25
4.3. Germinação dos embriões cotiledonares.....	29
5. CONCLUSÕES.....	33
REFERÊNCIAS.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{M}$ :	micromolar
2,4-D:	2,4 ácido diclorofenoxiacético
4-CPA:	ácido 4-clorofenoxiacético
ABA:	ácido abiscísico
ANA:	ácido naftaleno acético.
CA:	carvão ativo
cv.:	Cultivar
DIC:	delineamento inteiramente casualizados
Dicamba:	ácido 3,6-dicloroanísico
ES:	embrião somático
FC:	folhas cotiledonares
GA <sub>3</sub>	ácido giberélico
LEAs:	<i>late embryogenesis abundant</i>
MI:	meio de indução
MG:	meio de germinação
MM:	meio de maturação
MS:	meio Murashige e Skoog
Picloram:	ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
PEG:	polietilenoglicol
pH:	potencial hidrogênioônico
TDZ:	tiazuron (N-fenil-N-1,2,3-tiazol-5-tiuréia)

## RESUMO

GOUVEA, Drielly Stephania; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; junho de 2016; **Embriogênese somática do mamoeiro hermafrodita UENF/Caliman 01**; Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre, Co-orientadores: Edilson Romais Schmidt, Omar Schmidt, Wagner Campos Otoni.

A embriogênese somática é o processo de desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas. Objetivou-se com este trabalho analisar a eficiência de reguladores de crescimento nas diferentes fases da embriogênese somática indireta a partir de plantas *in vitro* do mamoeiro hermafrodita híbrido UENF/Caliman 01. Discos foliares destas brotações foram inoculadas em meio de indução (MI): meio MS (Murashige; Skoog, 1962), com concentração total de sais, e suplementado com auxinas, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)(6; 9; 12; 15 e 18  $\mu\text{M}$ ) e ácido 4-clorofenoxiacético (4-CPA)(19; 22; 25; 28 e 31  $\mu\text{M}$ ). Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizados (DIC), com cinco repetições, e cinco explantes por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Skott-Knott em nível de 5% de significância. Ao transcorrer, 90 dias da indução, visualizou-se a formação de alguns embriões somáticos nos calos friáveis formados. As concentrações da auxina 2,4-D, foram inibitórias, ocorrendo somente a formação de calos de coloração marrom-clara, os quais tiveram resultados inferior a 20% na formação de embriões somáticos, enquanto a suplementação com 4-CPA resultou em 96% de calos embriogênicos para a concentração de 25  $\mu\text{M}$ . Os calos embriogênicos, foram

transferidos para o meio de maturação (MM): MS sem regulador de crescimento; ABA – ácido abscísico ( $0,5 \mu\text{M}$ ); ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + CA – carvão ativo ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ); ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + CA ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ); ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + PEG – polietilenoglicol ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ) durante 30 dias. Foram observadas diferenças significativas entre os meios de maturação testados, uma reação positiva em relação a quantidade de embriões desenvolvidos e os efeitos de cada tratamento. O meio de maturação constituído de ABA  $0,5 \mu\text{M}$  + CA  $30 \text{ g L}^{-1}$  foi o mais eficiente no desenvolvimento de embriões somáticos cotiledonares. Estes embriões cotiledonares maduros, foram inoculados em meio de germinação (MG): MS sem regulador de crescimento; GA<sub>3</sub> ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ); GA<sub>3</sub> ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e GA<sub>3</sub> ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ).

**Palavras-chave:** *Carica papaya* L., propagação *in vitro*, explante hermafrodita, auxinas sintéticas.

## ABSTRACT

GOUVEA, Drielly Stephania; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; june 2016; **Somatic embryogenesis of the hermaphrodite papaya UENF/Caliman 01**; Advisor: Rodrigo Sobreira Alexandre, Co-advisors: Edilson Romais Schmildt, Omar Schmildt, Wagner Campos Otoni.

The Somatic embryogenesis is the process of development of embryos from somatic cells. The objective of this work to analyze the growth regulators efficiency in different stages of indirect somatic embryogenesis from in vitro plants of hermaphrodite papaya hybrid UENF / Caliman 01. Leaf discs of these shoots were inoculated in induction (MI): MS basal medium (Murashige, Skoog, 1962) with a total concentration of salts and supplemented with auxins 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (6; 9; 12; 15; 18  $\mu\text{M}$ ) and 4-chlorophenoxyacetic acid (4-CPA) (19; 22; 25; 28 and 31  $\mu\text{M}$ ). The treatments were arranged in a completely randomized design (CRD) with five repetitions, five explants per repetition. The data were submitted to analysis of variance by F test and means were compared by Skott-Knott test at the 5% level of significance. During 90 days of induction, visualized training some somatic embryos formed in friable callus. The concentrations of 2,4-D auxin were inhibitory, occurring only the formation of light-brown callus colored, which were lower than 20% results in the formation of somatic embryos, whereas supplementation with 4-CPA resulted in 96% embryogenic callus for the concentration of 25  $\mu\text{M}$ . The embryogenic calli were transferred to the maturation medium (MM): MS without growth regulators; ABA - abiscísico acid (0,5  $\mu\text{M}$ ); ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) + CA - activated charcoal (15 g L<sup>-1</sup>); ABA (0,5

$\mu\text{M}$ ) + CA ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ); ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + PEG - polyethylene glycol ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ) for 30 days. Significant differences were observed among the tested maturation media, a positive reaction to the amount of developed embryos and the effect of each treatment. The maturation medium consisting of  $0,5 \mu\text{M}$  ABA CA +  $30 \text{ g L}^{-1}$  was the most efficient in the development of cotyledonary somatic embryos. These mature cotyledon embryos were inoculated in germination (MG): MS without growth regulators; GA<sub>3</sub> ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ); GA<sub>3</sub> ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) and GA<sub>3</sub> ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ).

**Key words:** *Carica papaya* L., *In vitro* propagation, hermaphrodite explant, synthetic auxins.

## 1. INTRODUÇÃO

A fruticultura é umas das atividades agrícolas brasileira de maior influência socioeconômicas, com destaque para a cultura do mamoeiro (*Carica papaya* L.), na qual o Brasil é o segundo maior produtor mundial (FAO, 2013), perdendo apenas para a Índia. A espécie é cultivada em quase todo o território nacional, sendo os principais produtores: Bahia, Espírito Santo, Ceará, Minas Gerais e Rio Grande do Norte (IBGE, 2014). Porém, em critérios de produtividade e exportação, o Espírito Santo se sobrepõe e ocupa o primeiro lugar, com 12.911 ton exportadas no ano de 2014, gerando mais de 20 milhões de dólares em receita (MDIC, 2015).

Em nível nacional, a produção no Espírito Santo contribui com 25% do valor da produção nacional, no estado concentra-se na região norte (IBGE, 2014). Essa segunda posição na classificação dos maiores produtores de frutas se deve aos municípios de Pinheiros, Montanha e Boa esperança. Além desses municípios, o estado possui na cidade de Linhares, a empresa Caliman Agrícola S/A, uma das maiores produtoras de mamão do estado.

Os mamoeiros explorados no Brasil ginoico-andromonoicos (hermafroditas) conforme o tamanho e a origem dos frutos podem ser classificados em dois grupos distintos: o grupo 'Solo' e grupo 'Formosa'. As variedades do grupo 'Solo' são representadas por linhagens, enquanto os genótipos comerciais do grupo 'Formosa' correspondem a híbridos  $F_1$ . As variedades do grupo 'Solo' mais cultivadas são o 'Sunrise Solo' e o 'Golden', entretanto também se cultivam materiais selecionados a partir destes, feito pelos próprios produtores ou empresas, ao qual são denominadas

de seleções, como o 'Sunrise Solo BS', 'Golden THB' e 'Aliança Solo'. Quanto ao genótipo do grupo 'Formosa', cultivam-se os híbridos 'Tainung 01', ou 'UENF/Caliman 01' e a variedade 'Rubi Incaper 511' (COSTA et al., 2013). Dentre os híbridos citados, 'UENF/Caliman 01' têm grande destaque, por ser desenvolvido no Brasil, em parcerias entre a Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF) e a Empresa Caliman Agrícola® (FERREGUETTI, 2003).

O Calimosa é um híbrido obtido do cruzamento entre um progenitor do grupo Formosa e um progenitor do grupo Solo. Apresenta características fenotípicas do grupo Formosa, produzindo frutos alongados nas plantas hermafroditas (FERREGUETTI, 2003). Com o aumento na disponibilidade de novos híbridos e linhagens dessa fruteira, faz necessária a realização de estudos sobre potencial de cultivo, bem como de previsibilidade de produção e adaptação a ambientes favoráveis e desfavoráveis (OLIVEIRA et al., 2014).

Um dos fatores fundamentais na produtividade do mamoeiro é a produção de mudas de qualidade, pois está ligada, diretamente, ao potencial de produção e à qualidade dos frutos, já que sua propagação, embora possa ser feita assexuadamente através da enxertia, estaquia ou cultura de tecidos, ainda ocorre exclusivamente pela via seminífera (FRANCISCO et al., 2010).

Comercialmente, a cultura do mamoeiro é propagada via seminífera, colocando duas ou três sementes por cova, sendo que uma grama de sementes contém cerca de 60 sementes, no plantio de um hectare necessita cerca de 130 g, utilizando 2 ou 3 sementes por cova resulta em aproximadamente 300 a 400g de semente no plantio previsto, para compensar falhas na germinação e sexagem. O cultivo é prejudicado também por problemas devido à sua heterozigose característica e natureza dióica (MALABADI et al., 2011). Tendo em vista os problemas gerados pela propagação seminífera e a ausência de um método prático e barato para a determinação sexual precoce, torna-se necessária a busca por alternativas na produção em larga escala de plantas hermafroditas de *C. papaya* (SCHMILDT et al., 2007).

Técnicas biotecnológicas têm sido investigadas e utilizadas como alternativas para a propagação de sementes convencional, incluindo a embriogênese somática, em que, os embriões somáticos são usados para estudos de regulação do desenvolvimento embrionário, e também como ferramenta para a propagação vegetativa em grandes proporções, o que representa um potencial



significativo para a produção bem sucedida de plântulas mais homogêneas, livres de contaminantes e que têm características agrônômicas superiores (SCHMILDT et al., 2007).

A embriogênese somática tem apresentado inúmeros benefícios em relação aos métodos tradicionais de propagação, como a multiplicação em larga escala de genótipos superiores, a obtenção de um grande número de propágulos (embriões somáticos) em pequenos espaços físicos, a sincronização da produção das mudas, a possibilidade de armazenamento dos propágulos por um longo período de tempo via criopreservação, a produção de sementes sintéticas, eliminando assim, etapas do processo, como a de aclimatização, além da possibilidade de um alto grau de automatização (TITON et al., 2007).

O processo embriogênico somático consiste em células haplóides ou somáticas que se desenvolvem por meio de diferentes estádios embriogênicos, as mesmas fases da a embriogênese zigótica, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Apresenta grande potencial como sistema modelo para estudos de eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares e bioquímicos em plantas superiores, apresentando aplicações biotecnológicas, tais como produção de sementes sintéticas, micropropagação e transformação genética (CASTRO et al., 2010). Para que ocorra a embriogênese somática, a obtenção do genótipo selecionado também é fundamental, e requer um sistema de propagação vegetativa eficiente.

A cultura de tecidos de plantas é uma técnica que utiliza pequenos fragmentos de tecido vivo (explantes) isolados de uma planta, os quais são cultivados assepticamente em um meio nutritivo previamente definido. A embriogênese somática indireta requer a determinação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas determinadas, dependendo da ação de reguladores de crescimento, não apenas para a retomada da atividade mitótica, mas também para a determinação do estado embriogênico (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986)

O uso dessas técnicas na cultura do mamão é amplamente relatado na literatura, no entanto há diversos fatores que influenciam nas respostas à embriogênese somática, sendo um dos principais deles a escolha do genótipo, pois há diferentes potenciais embriogênicos para uma mesma espécie. Além do genótipo, estes passos são regulados com precisão por muitos fatores, incluindo o nível de

açúcar no meio, o tipo e concentração de reguladores de crescimento, fotoperíodo, gelificantes, tempo de exposição e indução e meio de maturação que estimula a embriogênese somática (ELMEER, 2013).

Entre as dificuldades apresentadas, a falta de sincronização nos processos de maturação, o surgimento de anomalias, redução no custo de produção dentre outras, faz necessárias as avaliações de potenciais respostas embriogênicas *in vitro* para cada genótipo. Considerando a ausência de informações sobre o mamoeiro híbrido UENF/Caliman01, e sua importância comercial, é de grande relevância uma análise sobre o processo de embriogênese somática capazes de originar indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz, e os efeitos de diferentes concentrações de auxinas sintéticas como 2,4-D e CPA dessa cultivar.

Dessa forma, objetivou-se neste trabalho avaliar as fases da embriogênese somática no mamoeiro, híbrido Calimosa a partir de discos foliares de brotações de plantas adultas, em diferentes concentrações das auxinas 2,4-D e 4-CPA.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Importância econômica

A importância econômica da família *Caricaceae* reside grandemente na produção de frutos por parte de sua principal espécie, *C. papaya*, amplamente cultivada na região dos trópicos (DAMASCENO JUNIOR et al., 2015). Em território brasileiro essa planta é cultivada em quase sua extensão, mas passou a ter importância econômica significativa no país a partir da década de 70, com a introdução do mamão ‘Havaí’ do grupo Solo.

Para a fruticultura, o cultivo do mamoeiro é umas das atividades agrícolas de maior influência socioeconômicas, destacam-se como os maiores produtores mundiais, Índia, Brasil, Indonésia e República Dominicana. Em 2013, a produção mundial foi de 12,5 milhões de toneladas e o Brasil responde a 12, 6% dessa produção (FAO, 2013). A espécie é cultivada em quase todo o território nacional, atualmente, o estado da Bahia ocupa a primeira posição com aproximadamente 794,565 mil toneladas, seguido do Espírito Santo (399.790 ton), Ceará (98.773 ton), Minas Gerais (90.052 ton) Rio Grande do Norte (69.956 ton) (IBGE, 2014). Os principais países importadores de mamão brasileiros são Portugal, Espanha, Holanda, Reino Unido, Alemanha e Estados Unidos (MIDC, 2015)

A região Nordeste destaca-se como principal produtora de mamão no Brasil. No quesito exportações, o estado do Espírito Santo responde por 50% do total (SERRANO; CATTANEO, 2010) é o segundo maior produtor Brasileiro de mamão e

o principal polo exportador. A produção no Espírito Santo concentra-se na região norte, destaque para o município de Linhares, principal produtor encarregado de 70% das exportações do fruto. A alta qualidade do fruto produzido no estado e dentro das exigências do mercado norte-americano é um resultado do amplo trabalho desenvolvido na área de pesquisa, assistência técnica e extensão rural (INCAPER, 2010).

Embora o Brasil se destaque como segundo maior produtor mundial de mamão, ainda existe restrições quanto as opções para a escolha de variedades e/ou híbridos comerciais para o plantio. Existe uma variabilidade genética limitada, com as plantações comerciais, evidenciando, assim, a necessidade de desenvolvimento de novos genótipos (RAMOS et al., 2012).

Essa busca por novos genótipos e melhoramento genético vêm sendo atendidas por Centros e Instituições federais e estaduais, universidades, além das ações da iniciativa privada. No Brasil, atualmente, as pesquisas de maior relevância na área de melhoramento genético do mamoeiro têm sido realizadas pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, em Campos dos Goytacazes, no estado do Rio de Janeiro; o Centro Nacional de Pesquisa Mandioca e Fruticultura (EMBRAPA/CNPMPF) na Bahia, pelo Instituto Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural – Incaper e pelo Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), no estado do Espírito Santo.

Um exemplo importante no desenvolvimento de novos genótipos foi obtido em 2002, pela UENF em parceria com a Empresa Caliman Agrícola S.A., em Linhares-ES, em trabalhos de melhoramento genético da cultura teve como resultado nove híbridos registrados de mamoeiro (UENF/Caliman 01 a UENF/Caliman 09) desenvolvidos no laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da Uenf. Com destaque para UENF/Caliman 01 – ‘Calimosa’, primeiro híbrido nacional, que nos anos seguintes ao desenvolvimento trouxe uma economia correspondendo milhões ao ano para o país. Apresenta características intermediárias entre o grupo Solo e o grupo Formosa, como: maior intensidade na coloração e firmeza de polpa, avermelhada, a polpa mais doce devido ao aumento da síntese e acúmulo de sólidos solúveis e maior uniformidade no peso e tamanho dos frutos, o que é tipicamente intermediária (HERINGER et al., 2013). Em 2010, foi

lançada a variedade do grupo “formosa” ‘Rubi Incaper 511’, fruto de vários anos de pesquisa conduzida no Incaper (SERRANO; CATTANEO, 2010).

A obtenção de linhagens e híbridos é possível porque o mamoeiro pode ser autopolinizado sem expressiva perda de vigor (DANTAS; LIMA, 2001). Para que esses fins sejam alcançados, estratégias de melhoramento devem ser empregadas, como a formação de populações base e a autofecundação de acessos segregantes com características de interesse agrônomico.

A demanda pela fruta fez crescer também, nos últimos anos, as áreas de cultivo que lentamente se direcionam ao semiárido, e, com isso, cresce a necessidade de novas variedades melhoradas para o cultivo, como o 4 híbrido ‘Calimosa’, que agora juntamente com o Tainung 01, já está como segundo genótipo mais plantado (LUZ et al., 2015). Porém faz se necessário maior aproveitamento do cultivar, ampliando estudos específicos que ainda são escassos, principalmente no que se refere a propagação.

## **2.2. Propagação do mamoeiro**

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) pode ser propagado por meio de sementes, estacas e cultura de tecidos. As lavouras comerciais de mamoeiro são convencionalmente propagadas por sementes. No entanto, o cultivo é prejudicado por problemas devido à sua natureza dióica, problemas de disseminação de doenças e de variabilidade genética decorrentes da polinização livre (BORGES et al., 2006; SCHMILDT et al., 2007; MALABADI et al., 2011).

Ademais, há a necessidade da sexagem, pois o sexo da planta só é determinado decorrente da primeira floração, não existindo nenhum procedimento de identificação precoce. Estas características impõem limitações consideráveis em trabalhos de melhoramento genéticos e são umas das principais razões para a falta de variedades adequadas desta importante cultura

O mamoeiro possui essencialmente três tipos de flores, masculino, feminino e hermafrodita, no qual o sexo determina o formato diferente dos frutos. No entanto, em cultivos comerciais, as plantas são de populações ginóico-andromonóicas, em

que são femininas ou hermafroditas. O desbaste das plantas indesejáveis ou improdutivas, consiste na identificação das plantas hermafroditas e eliminação das demais, permitindo assim aumento da produtividade e, conseqüentemente, da rentabilidade da cultura (MARIN; GOMES, 1985). Calcula-se para um hectare plantado com mamão no Brasil, em torno de 1800 (número de plantas por ha) x 2 mudas por cova desbastadas = 3600 plantas descartadas ao florescimento, num total de 5400 plantas.

Como não se reconhece o sexo das plantas no início do plantio, os agricultores recomendam plantar pelo menos três mudas por cova, o que aumenta consideravelmente os custos de produção, além de afetar o desenvolvimento das plantas hermafroditas em razão da competição por água, luz e nutrientes (CHAGAS, 2014). Em função do custo elevado, vários produtores optam por produzir suas próprias sementes, reproduzindo em suas lavouras materiais de baixo padrão de qualidade genética, permanecendo no campo cultivares sem expressão econômica, com risco de disseminação de doenças de grande severidade para a cultura (AZEVEDO; NETO, 2014).

A despeito de os primeiros trabalhos com hibridação, somente em 2001 foram lançadas e disponibilizadas no mercado sementes do primeiro híbrido nacional do grupo 'Formosa', fruto de parceria público-privada, denominado "Calimosa" e, mais recentemente, em 2011, foi lançada a público a primeira variedade do grupo 'Formosa', denominada 'Rubi Incaper 511' (RUGGIERO et al., 2011).

A propagação vegetativa é uma alternativa para a redução de alguns desses problemas. Possibilita fixar imediatamente as combinações mais favoráveis de caracteres importantes, as composições químicas específicas, as interações genéticas superiores e o alto nível de heterozigose (BISOGNIN, 2011).

A aplicação de técnicas de cultura de tecidos de plantas é uma das estratégias mais utilizadas na propagação vegetativa, o cultivo *in vitro* por exemplo, que utiliza pequenos fragmentos de tecidos vivo (explantes) isolados de uma planta, os quais são cultivados assepticamente em um meio nutritivo previamente estabelecidos. Dentre os principais usos da cultura de tecidos tem-se a reprodução de plantas *in vitro* visando a produção de mudas de alta qualidade, a recuperação de plantas livres de vírus (limpeza clonal), a conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas (conservação de germoplasma), a produção de haplóides e duplos (TORRES et al., 1998).

No mamoeiro, o cultivo *in vitro* é influenciado por diversos fatores, tais como idade da planta, época de coleta dos explantes, tipo de explante e o genótipo, além disso, uma das grandes limitações da cultura de tecidos consiste na necessidade de ajustes no balanço de nutrientes, reguladores de crescimento e condições de cultura para cada cultivar maximizar o seu desenvolvimento *in vitro* (ARORA; SINGH, 1978). O sucesso do cultivo *in vitro* está diretamente relacionado com a manipulação isolada ou combinada de reguladores de crescimento, o cultivo *in vitro* sem reguladores de crescimento é quase impraticável (MELO et al., 2001; VIDAL et al., 2013).

Outra aplicação da cultura de tecidos é a embriogênese somática, a qual é um processo em que células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986). Representa uma alternativa para a propagação clonal massiva e também uma potencial solução para os problemas de propagação em campo especialmente na área frequente transmissão de doenças e manutenção de cultivares que tenham sido selecionados por suas características genéticas importantes (KARIM; AHMED, 2010).

A embriogênese somática representa uma ferramenta muito influente na biotecnologia para a propagação de espécies com longo ciclo reprodutivo ou baixa produção de sementes e de plantas geneticamente modificadas com características melhoradas. A embriogênese somática, também é um modelo versátil para estudar os mecanismos celulares e moleculares da padronização do embrião da planta. A morfologia e regulação molecular da embriogênese somática se assemelham aos da embriogênese zigótica e começar com o estabelecimento da assimetria apical-basal (SMERTENKO; BOZHKOVA, 2014).

A determinação da forma preferencial de propagação também é essencial para a escolha do método de melhoramento mais adequado, pois existem métodos específicos para os diferentes sistemas reprodutivos (DIAS; KAGEYAMA, 1982). Os objetivos principais dos programas de melhoramento de mamão incluem o aumento no rendimento e produtividade, resistência a fatores de estresse biótico e abiótico e características de qualidade melhorada (DHEKNEY et al., 2016).

### 2.3. Embriogênese somática

A embriogênese somática, conhecida também como embriogênese adventícia ou assexuada. Trata-se de um processo característico das plantas vasculares, pelo qual células ou tecidos somáticos se desenvolvem até a formação completa de uma planta, através de uma série de estágios embriogênicos semelhantes àqueles observados na formação de embriões zigóticos (RODRIGUEZ; WETZSTEIN, 1998).

O embrião somático é similar ao zigóticos, apresenta um sistema vascular fechado, ou seja, sem conexão com os tecidos adjacentes, e independentes do explante que lhe deu origem (SCHUMANN et al., 1995; GUERRA et al., 1999).

Culturas embriogênicas são produzidas em meio de indução através de duas vias, direta ou indireta. Na embriogênese direta, os embriões somáticos originam-se dos explantes sem formação de estágios intermediários de calo, a partir de “células pré-embriogênicas determinadas”. Na embriogênese somática indireta, os embriões somáticos se formam a partir de um calo, apresenta células em diferentes estágios de diferenciação, “células embriogênicas induzidas” e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, as quais podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (SHARP et al., 1982; DHEKNEY et al.; 2016). Os estágios de desenvolvimento pró-embriônicos e embriônicos são: globulares, cordiforme, torpedo e cotiledonar, o que acontece em ambos os estágios.

A sobrevivência e crescimento de uma planta completa depende das condições nas etapas iniciais, fase de indução e maturação, quando os embriões são formados, amadurecem e germinam. Logo, para obter a propagação em massa de plantas por meio da embriogênese somática, é importante que se compreendam e estabeleçam os fatores críticos que ocorrem durante o processo.

O material genético, o estado fisiológico, tipo de explante, concentrações endógenas de hormônios nos explantes, condições de cultivo como fotoperíodo, intensidade e qualidade da luz, concentrações do meio basal, reguladores de crescimento, agente gelificantes e pH do meio, são importantes fatores que afetam o processo de embriogênese somática.

A calogênese e embriogênese somática é o resultado de uma reestruturação dos tecidos, ocorrida principalmente em função das condições de cultivo como alta



concentração de reguladores de crescimento, níveis de sacarose e regime de escuro nos fatores de meio de cultura e de estresse.

Reguladores de crescimento muitas vezes necessária para induzir a maioria dos embriões somáticos em espécies de plantas (SIVANESAN et al., 2015). A concentração de sacarose pode influenciar nos processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos, uma vez que o seu metabolismo, em plantas, é regulado por um grupo de genes (sacarose sintase e sacarose invertase), cujas respostas são moduladas de acordo com a variação da sua concentração (Koch 1996). E como medida de prevenção da oxidação de compostos fenólicos liberados pelos explantes, pois, inibe o crescimento do mesmo (MELO et al., 2001). Dentre algumas citadas por Grattapaglia e Machado (1998) ressalto carvão ativado e incubação inicial dos explantes no escuro.

O processo de embriogênese somática requer a indução embriogênica, na qual se dá pela exposição dos explantes a determinadas concentrações de auxina durante um período de tempo variável, dependendo da espécie, genótipo analisado ou mesmo tipo de explante. Basicamente as auxinas são as substâncias responsáveis pelo processo de indução, atuando na desdiferenciação e rediferenciação das células dos explantes (KOEHLER, 2013; DHEKNEY et al., 2016).

Dentro da cultura de tecidos, no processo de propagação vegetativa de material genético selecionado até o uso da embriogênese somática, vários protocolos foram desenvolvidos para a produção de embriões em alta frequência, a partir de diferentes tipos de explantes de mamoeiro como: hipocótilo, gema axilar, caule, óvulo, embrião zigótico e explantes de raiz (LITZ; CONOVER, 1980; CHEN et al., 1987; FITCH; MANSARDT, 1990; FITCH, 1993; JORDAN; VELOZO, 1997; ASCENCIO-CABRAL et al., 2008; ANANDAN et al., 2012; ABREU et al., 2014; RAZALI; DREW, 2014).

Como técnica de propagação, a embriogênese somática apresenta-se como uma ferramenta indicada na obtenção de mudas clonais, pela possibilidade de propagação em larga escala e considerado como uma ajuda eficaz em estudos de transformação genética. Assim, a embriogênese somática pode ajudar a aumentar a produção global de mamão por clonagem cultivares elite que produzem frutas de alta qualidade (HERINGER et al., 2013).

O estabelecimento de protocolos para a embriogênese somática do mamoeiro é importante por permitir a multiplicação massal de plantas hermafroditas, diminuindo a importação de sementes híbridas que apresentam preço elevado no mercado internacional (ALMEIDA et al., 2001).

Comparando-se às demais técnicas de propagação *in vitro*, a embriogênese somática apresenta algumas vantagens: a) alta taxa de multiplicação; b) permite alto grau de automatização; c) pode ser utilizada como ferramenta integrada a programas de melhoramento genético, em especial quando associada a técnicas de criopreservação e engenharia genética (GUERRA et al., 1999); d) possibilita a transferência de genes, razão pela qual tem sido utilizada como ferramenta em estudos de desenvolvimento das plantas (ZIMMERMAN, 1993); e) propagação clonal e melhoramento, tanto pela fusão de protoplastos como pela transformação genética.

Porém, a principal limitação observada pelos pesquisadores na utilização da embriogênese somática é a variação somaclonal quando se realiza sucessivos subcultivos, o que afeta o desenvolvimento das plantas produzidas (LAKSHMANAN et al., 2005).

De modo geral, o processo de embriogênese somática ocorre em três fases distintas: indução, maturação e germinação, sendo necessárias diferentes condições de cultura para a obtenção de sucesso em cada fase.

As etapas iniciais são consideradas críticas, segundo Guerra et al. (1999), a fase de indução e o controle da embriogênese somática podem ser afetados por uma série de fatores, tais como, fonte e estágio fisiológico do explante, genótipo da planta-mãe, formulação do meio básico, agentes gelificantes, níveis e período de tempo em que os reguladores de crescimento são mantidos na cultura.

As células somáticas em sua maioria, não são embriogênicas e a fase da indução é requerida para a aquisição da competência embriogênica (DODEMAM et al., 1997). É o resultado da ativação de células responsivas contendo receptores para determinado regulador de crescimento, entre os reguladores de crescimento, as auxinas, principalmente o 2,4-D, são essenciais na aquisição da competência embriogênica, culminando na desdiferenciação e rediferenciação das células dos explantes.

A ES tem sido frequentemente iniciada em meio contendo altos níveis de auxinas, na qual estão envolvidas na indução e iniciação de embriões somáticos

(KOMAMINE et al., 1992; GUERRA et al., 1999). Porém, para iniciar a via de organização embriogênica, há a necessidade de remoção das auxinas do meio. Sua presença contínua induz a síntese de proteínas necessárias para iniciar a formação do embrião somático até o estágio globular e inibir a sua diferenciação para os demais estágios de desenvolvimento embrionário (ZIMMERMAN, 1993).

Diversas auxinas têm sido utilizadas para indução, dentre elas destacam-se o 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), Dicamba (ácido 3,6-dicloroanísico), ANA (ácido naftalenoacético), Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), CPA (ácido 2,4,5-clorofenoxiacético) (RENUKDAS et al., 2003; GARCIA et al., 2007; FARZANA et al., 2008; MOURA; MOTOIKE, 2009; SIMÕES et al., 2010; RAMOS, 2011;). Acredita-se que as auxinas sintéticas em altas concentrações têm efeito na indução da embriogênese somática relacionada à sinalização e como um componente que gere estresse (FEHER et al., 2003).

A eficácia da embriogênese somática depende da capacidade de morfogênese do explantes colocado em meio, competência embriogênica, o que necessita de maiores estudos para a definição do sinal que inicia esse processo. Células podem tornar-se competentes para embriogênese somática, desde que a interação entre fatores endógenos e exógenos, como a concentração e o tipo de regulador de crescimento utilizado, esteja balanceada, desencadeando uma série de eventos moleculares que podem afetar a expressão do gene e determinar a diferenciação de embriões somáticos (NOLAN et al., 2014; CARVALHO et al., 2015).

Esses genes podem ser divididos em dois grupos: promotores e repressores da embriogênese somática, sendo que entre os promotores o melhor caracterizado é o SERK (Embriogênese Somática Quinase Receptor) isolado de células embriogênicas de várias espécies, dentre elas, cenoura (SCHMIDT et al., 1997), *Bracchiaria* spp. (KOEHLER, 2010), *Ananascomosus* (MA et al., 2012) e *Cyclamenpersicum* Mill (SAVONA et al., 2012).

A maturação, é uma fase crítica no desenvolvimento do embrião somático, há variações como a paralisação da germinação e o embrião adquire tolerância a dessecação. Os embriões somáticos são submetidos a alterações morfológica e bioquímicas, tais como a deposição de armazenamento de produto, as quais são essenciais para o desenvolvimento da planta subsequente (MÁRQUEZ-MARTIN et al., 2011).

Faz-se necessária a retirada da auxina do meio e a adição de promotores de maturação. A estratégia empregada consiste em interromper os ciclos repetitivos de divisão celular e fornecer os estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para a diferenciação celular, originando, dessa forma, grande número de embriões somáticos maduros, de alta qualidade e aptos a se tornarem plantas (GUERRA et al., 1999). Como produtos desse segundo ciclo, são obtidos embriões somáticos maduros passíveis de germinação *in vitro* e *ex vitro* ou que podem, ainda, ser utilizados para produção de sementes sintéticas (STEINER et al., 2008).

As principais substâncias promotoras de maturação são o ácido abscísico (ABA); agentes osmóticos, como polietilenoglicol (PEG), carboidratos, hexitois e carvão ativado, cruciais para a progressão do desenvolvimento normal dos embriões somáticos e à sua conversão em plântulas (LAKSHMANAN, 2005; CALIC-DRAGOSAVAC et al., 2010).

As condições de maturação sofrem influência de diferentes fatores, com destaque para: genótipo do explante, estágio de desenvolvimento das massas pró-embriogênicas, tipos e concentrações de reguladores de crescimento, osmolaridade e composição do meio de cultura, frequência de subcultivos e idade das culturas.

Em mamoeiro cv. Co7, a maturação de embriões somáticos apresentou correlação positiva com o aumento da concentração de ABA, a maturação resulta em embriões somáticos pouco desenvolvidos e frequentemente anormais, apresentando baixa capacidade para a germinação e desenvolvimento da planta (ANANDAN et al., 2012). O ABA regula vários processos fundamentais, como a síntese e deposição de proteínas de reserva, e a eliminação do suspensor das massas proembriogênicas (DODEMAN et al., 1997).

O PEG é um agente osmótico não plasmolizante, que não penetra nas células vegetais, a adição desse agente osmótico ao meio de cultura reduz a disponibilidade de água, simulando as condições de desenvolvimento zigótico, promovendo a histodiferenciação do embrião (STASOLLA; YEUNG, 2003).

Os efeitos benéficos do CA sobre morfogênese são associados principalmente à adsorção de substâncias tóxicas, compostos fenólicos e ao excesso de fitohormônios, vitaminas, etileno e demais substâncias que podem comprometer o crescimento vegetal, incluindo aqueles que emanam de tecidos cultivados ou de origem, também, vem sendo utilizado para otimizar e regular o crescimento de

plantas *in vitro*, (LAMEIRA et al., 1997; PERERA et al., 2008; MARTÍNEZ, et al., 2015).

Embriões somáticos podem ser transferidos para diferentes meios de germinação, que pode ser suplementado com ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (KAYIM; KOC, 2006; ABREU et al., 2014; NUÑO-AYALA et al., 2012); com diferentes combinações de citocininas e auxinas (CLARINDO et al., 2008; SUN et al., 2011), ou desprovido de reguladores de crescimento (SIMÕES et al., 2010; TEXEIRA et al., 2011; PINHEIRO et al., 2012), para que ocorra a conversão em plântulas. O sucesso dessa etapa, que culmina com a formação de plântulas normais, é dependente da formação de embriões normais no processo de maturação (DETONI, 2013).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na sala de cultura do Laboratório de Melhoramento Genético, no Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), localizado no município de São Mateus-ES e no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG.

#### 3.1. Material vegetal

As plantas matrizes foram obtidas a partir da semeadura do mamoeiro *Carica papaya* L. híbrido UENF/Caliman 01, cultivadas em vasos de 12 L, na casa de vegetação. As sementes utilizadas foram cedidas pela empresa Caliman Agrícola S.A., localizada no município de Linhares-ES. Estas plantas foram sexadas quando atingiram a floração ( $\pm$  5 meses), onde manteve as hermafroditas. Destas plantas adultas hermafroditas, foram coletados, aos 6 meses os explantes (segmentos apicais de brotações laterais) de 0,5 cm de comprimento e encaminhados ao Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) no CEUNES/UFES. Segmentos apicais de brotações laterais de plantas hermafroditas do mamoeiro híbrido UENF/Caliman 01 foram induzidos a organogênese direta na obtenção de brotações axênicas *in vitro*.

No LCT em câmara de fluxo laminar, os explantes foram submetidos a desinfestação, com álcool 70% por 30 segundos, em seguida, hipoclorito de sódio a 1% por 15 minutos, que após cada procedimento de desinfestação os explantes foram lavados três vezes em água destilada.

### **3.2. Estabelecimento e multiplicação *in vitro***

Os segmentos apicais foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura de estabelecimento, com concentração total de sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), mio-inositol ( $100 \text{ mgL}^{-1}$ ), sacarose ( $30 \text{ gL}^{-1}$ ), ágar ( $6,5 \text{ g L}^{-1}$ , MERCK®) e suplementados com  $0,024 \text{ }\mu\text{M}$  de cinetina (6-furfurilaminopurina) e  $0,000499 \text{ }\mu\text{M}$  de ANA (ácido  $\alpha$ -naftaleno acético) (SCHMILDT et al., 2007). Os tubos de ensaios com os explantes foram mantidos em sala de crescimento no Laboratório de Melhoramento Genético - CEUNES/UFES, com temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas, sob fluxo de fótons fotossintéticos de  $90 \text{ }\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  obtido por lâmpadas de LED azul/vermelha no período de 30 dias.

Os explantes reativos foram então recultivados em meio de multiplicação, MS acrescidos de  $0,000499 \text{ }\mu\text{M}$  de ANA,  $0,0019 \text{ }\mu\text{M}$  de BA (6-benzilaminopurina) e  $0,27 \text{ }\mu\text{M}$  de sulfato de adenina, em fracos contendo 30 mL de meio e, mantidos em sala de crescimento, sob as mesmas condições ambientais citadas acima, no período de 30 dias, e subcultivado por duas vezes, a cada intervalo de 30 dias. No preparo dos meios de cultura, o pH foi ajustado para 5,7 antes da adição do ágar e, posteriormente, foi autoclavado a  $121^\circ\text{C}$ , 1,5 atm por 20 minutos.

Ao final desta etapa, os fracos devidamente vedados foram transportados para o Laboratório de Cultura de Tecidos II, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG.

### 3.3. Indução da embriogênese somática

Em câmara de fluxo laminar, no Laboratório de Cultura de Tecidos II, na UFV, discos foliares do mamoeiro UENF/Caliman 01, foram extraídas de brotações axênicas *in vitro*, e em seguida inoculadas em placas de Petri de poliestireno 90x15 mm (KASVI<sup>®</sup>) contendo 40 mL por placa de Meio de Indução (MI) de embriogênese somática, elaborado a partir do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com concentração total de sais, mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), ágar ( $6,5 \text{ g L}^{-1}$ , MERCK<sup>®</sup>) e suplementado com auxinas 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético (6; 9; 12; 15 e  $18 \text{ } \mu\text{M}$ ) ou 4-CPA - ácido 4-clorofenoxiacético (19; 22; 25; 28 e  $31 \text{ } \mu\text{M}$ ) conforme os tratamentos. O MI teve seu pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da adição do ágar.

Foram utilizadas cinco placas por tratamento, sendo colocados cinco explantes em cada placa. As placas foram incubadas no escuro, com temperaturas de  $27 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$  por 90 dias. Após esse período foram avaliadas a calogênese (%); calo embriogênico (%); calos não embriogênicos; frequência de ES por calo e média dos tipos de ES (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar).

### 3.4. Maturação dos embriões somáticos

Foram testadas a competência de maturação dos embriões somáticos obtidos a partir dos calos embriogênicos, durante o processo de indução, com idade entre 90 a 100 dias, contendo embriões em diferentes estádios de diferenciação, nos seguintes meios de maturação (MM): MS sem reguladores de crescimento (RC); MS + ABA - ( $0,5 \text{ } \mu\text{M}$ ); MS + ABA ( $0,5 \text{ } \mu\text{M}$ ) + CA - carvão ativo ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ); MS + ABA ( $0,5 \text{ } \mu\text{M}$ ) + CA ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) e MS + ABA ( $0,5 \text{ } \mu\text{M}$ ) + PEG – polietilenoglicol 6000 ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ).

Os calos embriogênicos utilizados nesta fase, tiveram origem da indução de embriões, de todas as concentrações testadas, que obtiveram embriões somáticos. Após a inoculação, as placas de Petri foram mantidas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas de luz, e temperatura a  $27 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ , sendo irradiada por fluxo



de fótons fotossintéticos de  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obtido por lâmpadas de LED azul e vermelha por 30 dias. Foram avaliadas a frequência de ES (ES calo<sup>-1</sup>) e ES germinados (%).

### 3.5. Germinação dos embriões cotiledonares

Embriões somáticos cotiledonares normais, selecionados com base no resultado do melhor meio de maturação (MS + ABA  $0,5 \mu\text{M}$  + CA  $30 \text{ g L}^{-1}$ ). Foram transferidos para placas contendo meios de germinação (MG): MS sem regulador de crescimento; MS +  $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}_3$ ; MS +  $1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}_3$  e MS +  $1,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}_3$ . As placas foram mantidas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas de luz, e temperatura a  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo irradiada por fluxo de fótons fotossintéticos de  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obtido por lâmpadas de LED azul e vermelha, até o desenvolvimento de raízes nos embriões. Foram avaliadas a porcentagem de germinação de embriões (protusão da raiz primária).

### 3.6. Análise estatística

Nos experimentos da fase de Indução utilizaram-se os calos provenientes dos discos foliares de acordo com as diferentes concentrações de 2,4-D e 4-CPA. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizados (DIC), com cinco repetições, e cinco explantes por repetição.

A fase de maturação foi realizada também em delineamento inteiramente casualizados, com cinco tratamentos e cinco repetições, no qual cada repetição equivale uma placa, resultante da fase de indução, selecionada ao acaso dentro de cada concentração.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Skott-Knott em nível de 5% de significância, feitos

agrupamentos das médias para cada auxina testada separadamente, realizados com o auxílio do Programa GENES (CRUZ, 2013).

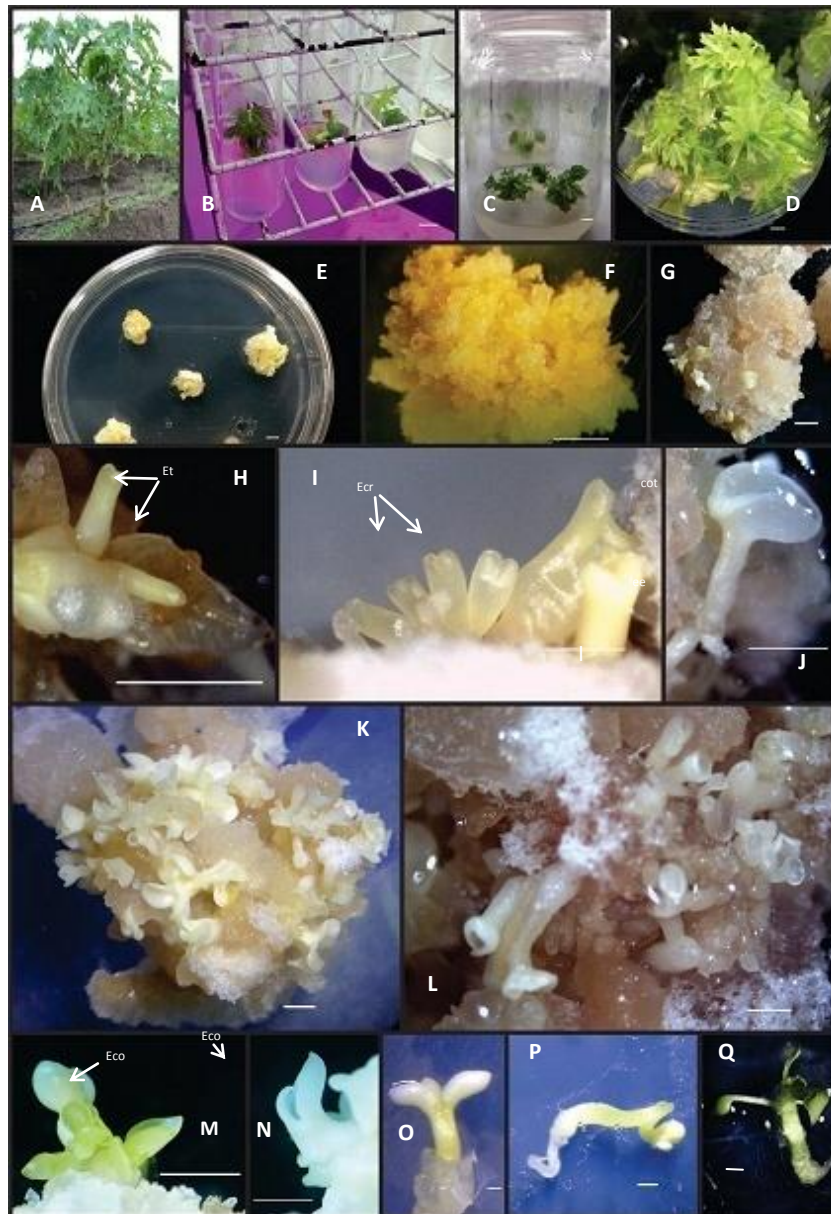
Ao final, a fase de germinação, embriões cotiledonares normais, foram avaliados em contagem integral dos embriões germinados, e feita uma estatística descritiva dos resultados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Indução da embriogênese somática

A obtenção de explantes utilizados na embriogênese somática do mamoeiro hermafrodita UENF/Caliman 01 iniciou-se com o estabelecimento *in vitro* de ápices de brotações laterais de plantas de seis meses de idade, após a sexagem (Figura 1A). Estes segmentos apicais se desenvolveram através do processo organogênico em brotações multicaulicas *in vitro* (Figura 1B-C). A embriogênese somática a partir de explantes foliares axênicos de brotações *in vitro* (Figura 1C) foi iniciada por meio indireto passando por uma fase de calo (Figura 1D) através de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e CPA (Tabela 1).

A calogênese a partir de explantes foliares do mamoeiro hermafrodita UENF/Caliman foi mais eficiente quando induzida com 2,4-D nas concentrações de 15 (88%) e 18  $\mu\text{M}$  (100%) e CPA em todas as concentrações, não diferindo estatisticamente entre si, com médias variando de 84 a 100% (Tabela 1). Entretanto, o CPA foi a auxina que proporcionou as maiores porcentagens de calos embriogênicos, nas concentrações de 25 (96%), 28 e 31 (94%), não havendo diferença estatística entre as mesmas (Tabela 1) e que, a maior frequência de ES calo<sup>-1</sup> (17,2) foi obtida com o 4-CPA na concentração de 25  $\mu\text{M}$  (Tabela 1).



**Figura 1.** Embriogênese somática a partir de explantes foliares axênicos de brotações *in vitro* domamoeiro hermafrodita híbrido UENF/Caliman 01. (A) Planta matriz, com 10 meses de cultivo. (B) Segmentos apicais de brotações laterais. (C e D) Brotações *in vitro* do mamoeiro hermafrodita híbrido UENF/Caliman 01. (E) Calos sendo formados em MI (40 dias). (F) Crescimento de calo friável. (G) Calos embriogênicos induzidos com 2,4-D, em MM ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) + CA (15 g L<sup>-1</sup>). (H) Embriões somáticos em estágio torpedo; (I) Embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. (J) Embrião cotiledonar normal em desenvolvimento. (K) Calo embriogênico induzido com 4-CPA, em MM ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) + CA (15 g L<sup>-1</sup>). (L) Embriões somáticos em MM. (M) Embrião normal germinado com folhas cotiledonares. (N e O) Embriões cotiledonares morfologicamente normais. (P) Embrião anormal germinado. (Q) Conversão de embrião cotiledonar em plântula. *Abreviações:* cot. cotilédones; ee. eixo embrionário; ECo. embrião somático cotiledonar; ECr. embrião somático cordiforme; EG. embrião somático globular; ET. embrião somático torpedo. Barra = 1 cm (A, B, C e D); 1,0 mm (E-O).

**Tabela 1.** Indução *in vitro* de discos foliares de brotações axênicas do mamoeiro hermafrodita híbrido UENF/Caliman 01 em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e 4-CPA, sobre a formação de calos, calos embriogênicos e não embriogênicos, e frequência de ES calo<sup>-1</sup>, após 90 dias de cultivo

Tratamentos	Características avaliadas			
	Calogênese (%)	Calos embriogênicos (%)	Calos não embriogênicos (%)	Frequência absoluta de ES
2,4-D [6µM]	36 b <sup>(1)</sup>	4 c	32 b	1,0 d
2,4-D [9µM]	44 b	8 c	36 b	2,0 d
2,4-D [12µM]	56 b	16 c	40 b	1,6 d
2,4-D [15µM]	88 a	12 c	76 a	2,4 d
2,4-D [18µM]	100 a	20 c	80 a	0,6 d
4-CPA [19µM]	96 a	28 b	68 a	6,4 c
4-CPA [22µM]	84 a	56 b	28 b	10,6 b
4-CPA [25µM]	100 a	96 a	4 b	17,2 a
4-CPA [28µM]	96 a	84 a	16 b	10,0 b
4-CPA [31µM]	100 a	84 a	16 b	6,2 c

<sup>(1)</sup>Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de agrupamento de médias de Scott-Knott.

Nuño-Ayala et al. (2012) ao induzirem embriões zigóticos maduros de *Jarilla heterophylla* (Caricaceae), em meio acrescido de 2,4-D (18,09 µM) verificaram efeito negativo sobre a produção de calos, análogo ao controle (0 µM), na qual encontraram aproximadamente 3,0 e 2,6 calos por explante, respectivamente. Almeida et al. (2001) observaram no híbrido Tainung 01 médias superiores de calos embriogênicos (41,7%) com o uso de 2,4-D (9,04 ou 45,24 µM). Sun et al. (2011) a partir de sementes imaturas do mamoeiro cv. Sunrise obtiveram 68,7% de frequência de calos em meio MS contendo 2,4-D (6,0 µM) + ANA (2,5 µM) + cinetina [6-furfurilamino purina] (4,0 µM). Detoni (2013) observou em folhas cotiledonares no mamoeiro Golden THB baixa eficiência do 2,4-D, ao contrário do uso do CPA (25 µM), que apresentou altas porcentagens de calos embriogênicos (91,67%) e número médio de embriões (65,75). Anandan et al. (2012) em embriões imaturos do mamoeiro cv. Co7, obtiveram percentual elevado (87%) de explantes produzindo calos, destes, 75,12% são embriogênicos, com o uso de 2,4-D (2,0 mg L<sup>-1</sup>), e uma diminuição na calogênese quando a concentração de 2,4-D foi aumentada de 4,0 a

12,0 mg L<sup>-1</sup> (47,4%). Uma baixa concentração de 2,4-D (9,05µM) é diretamente relacionada à alta frequência de resposta calogênica a partir de explantes foliares de *Carica papaya* L., em aproximadamente um mês de cultura, em que 74% dos explantes foliares converteram-se em calos embriogênicos friáveis (KOEHLER et al., 2013).

Células podem tornar-se competentes para a embriogênese somática, desde que a interação entre fatores endógenos e exógenos, como a concentração e o tipo de regulador de crescimento utilizado, esteja balanceada, desencadeando uma série de eventos moleculares que podem afetar a expressão de genes e determinar a diferenciação de embriões somáticos (NOLAN et al., 2014; CARVALHO et al., 2015).

A adição de auxinas ao meio de cultura pode aumentar a totipotência de células com habilidade para proliferar e regenerar embriões somáticos (GARCIA et al., 2011). Segundo Guerra et al. (2001), o genótipo da planta mãe doadora dos explantes juntamente com o tipo de auxina exercem papel fundamental na competência embriogênica. Usando como explantes, embriões zigóticos imaturos de *C. papaya* L., em meio suplementado com 2,4-D, por exemplo, foi suficiente para produzir calos altamente embriogênicos (KOEHLER, 2004; CLARINDO et al., 2008; ANANDAN et al., 2012; ABREU et al., 2014).

Em teste de indução com embriões zigóticos maduros de *Jarilla heterophylla*, Nuño-Ayala et al. (2012) mostraram que a presença de sulfato de adenina teve efeitos inibidores na geração de calos a partir de explantes iniciais, apresentando resultados de 14 embriões somáticos obtidos com a adição de sulfato de adenina, enquanto na ausência foram obtidos 74 embriões somáticos. Efeitos semelhantes podem ter ocorrido no presente trabalho, havendo necessidade de transferência das brotações induzidas em meio com o sulfato de adenina (Figura 1C), para meio isento de regulador de crescimento e a sua permanência por um determinado período de tempo, de forma que ocorra redução endógena desta citocinina, o que pode estar interferindo na baixa frequência de embriões somáticos do mamoeiro hermafrodita híbrido UENF/Caliman 01, quando induzido em meio auxínico.

## 4.2. Maturação dos embriões somáticos

A maturação é uma das fases importantes da embriogênese somática, e a adição de promotores de maturação tais como polietilenoglicol (PEG), ácido abscísico (ABA) e carvão ativado (CA) é crucial para a promoção da maturação dos embriões somáticos e à sua conversão em plântulas (CALIC-DRAGOSAVAC et al., 2010). O PEG é um agente osmótico de alto peso molecular que, quando utilizado em cultura de tecidos, reduz o potencial hídrico do meio de cultura e causa grande estresse hídrico às células. Segundo Pan e Jiang (2015) em mamoeiro os fatores de transcrição relacionado ao gene WRKY que estão envolvidos na resposta ao estresse hídrico são TF807.3, TF43.76, TF12.199 e TF12.62. Proteínas WRKY são uma família de reguladores de transcrição em plantas superiores, expressa em baixos níveis em caules, raízes, e pétalas, e expressa a níveis elevados em folhas, quase não detectável no desenvolvimento de sementes, e é fortemente expressa transientemente em óvulos fertilizados portadores de embriões no estágio torpedo final, indicando um papel específico durante a embriogênese (LAGACÉ et al., 2004; LING et al., 2011).

A expressão de genes GhWRKY durante desenvolvimento de fibras, senescência foliar, anteras e tecidos (raízes, caules, folhas e embriões) de *Gossypium raimondii* e *Gossypium hirsutum* sob estresse abiótico (hídrico e alagamento), foi observado que a maioria dos genes GhWRKY mostram expressão muito elevada, o que implica que genes WRKY funcionam na resposta ao estresse (DOU et al., 2014).

O padrão de expressão observado para ScWRKY1 em embriões de *Solanum chacoense* no estágio torpedo, sugerem que os fatores de transcrição da família pode ser WRKY, envolvido em eventos cruciais durante a embriogênese e o desenvolvimento da semente em plantas (LAGACÉ et al., 2004).

Com o intuito de identificar genes envolvidos na indução de embriões somáticos, Krassimira e Alexandrova (2002), na extração do RNA total de folhas de genótipos embrionários e não embrionários, utilizados para gerar fragmentos de cDNA diferentemente expresso, estes foram rastreados e dois genes relacionados a embriogênese somática foram identificados como DGE1 e DGE2. A análise do RNA-blot mostrou que as DGEs foram expressos na cultura de folhas embriogênicas, no

qual transcrições DGE1 foram identificados para embriogênese direta e indireta, enquanto DGE2 somente para embriogênese direta. Um segmento de 90aa DGE1 mostrou 81% de identidade com a proteína de ligação de DNA WRKY21 de *Arabidopsis thaliana* que continha um WRKY domínio e uma sequência de direcionamento nuclear, para DGE2 a sequência inteira não tinha homologia com quaisquer sequências contidas no banco de genes. Indicam que DGE1 e DGE2 são genes relacionados com a embriogênese somática com possíveis funções nucleares reguladoras. De acordo com a comparação homológica entre WRKY de mamão e de outras plantas feita por Pan e Jiang (2015) sugere que a homologia elevada das WRKY sem mamoeiro pode ter funções semelhantes com os seus genes homólogos em outras espécies.

No presente trabalho, a adição apenas do ABA ou ABA + PEG no meio de cultura resultou em baixa frequência de ES  $\text{calo}^{-1}$  (6,6) mesmo nos embriões obtidos a partir da auxina 4-CPA (Tabela 2).

**Tabela 2.** Maturação de embriões somáticos do mamoeiro hermafrodita híbrido UENF/Caliman 01 obtidos de discos foliares de brotações axênicas *in vitro* a partir da indução em 2,4-D (6; 9; 12; 15 e 18  $\mu\text{M}$ ) e 4-CPA (19; 22; 25; 28 e 31  $\mu\text{M}$ ), após 120 dias de cultivo

Auxinas	Meio de maturação (MM)	Calos embriogênicos (%)	Frequência absoluta ES $\text{calo}^{-1}$ (120 dias MM)
2,4-D	MS completo	12 b <sup>(1)</sup>	4,0 e
	MA+CA	16 b	2,0 e
	MS+ABA	16 b	1,6 e
	MS+ABA+CA	12 b	2,4 e
	MS+ABA+PEG	8 b	6,0 e
CPA	MS completo	68 a	9,4 c
	MA+CA	60 a	21,4 b
	MS+ABA	84 a	9,6 c
	MS+ABA+CA	68 a	36,6 a
	MS+ABA+PEG	68 a	6,6 d

<sup>(1)</sup>Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de agrupamento de médias de Scott-Knott.

Vale et al. (2014) obtiveram 40 embriões somáticos cotiledonares por calo ao usarem PEG (6%) na maturação de embriões de mamoeiro híbrido UENF/Caliman 01. Segundo estes autores, as proteínas na faixa de 34-87 KDa



foram mais abundantes com PEG 6% em relação ao controle, sugerindo que essas proteínas podem ser fundamentais no processo de maturação servindo como marcadores bioquímicos para a embriogênese somática deste híbrido. Entretanto, no presente trabalho a máxima frequência de ES calo<sup>-1</sup> (36,6) aos 120 dias foi obtida em meio MS de maturação com ABA (0,5 µM) + CA (15 g L<sup>-1</sup>) (Tabela 2 Figura 1K, L). Verifica-se, portanto, ação pronunciada do CA aumentando em 73,77% a frequência dos ES calo<sup>-1</sup> (Tabela 2). O efeito do CA está associado a adsorção de substâncias tóxicas, como compostos fenólicos entre outros metabólitos, os quais são responsáveis pela inibição da morfogênese, processo decorrente da divisão e diferenciação celular (FRIDBORG et al., 1978; MARTÍNEZ et al., 2015). Segundo Detoni (2013), calos embriogênicos do mamoeiro Golden THB em meio de maturação suplementado com ABA (0,5 µM) + CA (15 g L<sup>-1</sup>) é muito eficiente tanto para elevar a frequência de ES calo<sup>-1</sup> quanto para inibir a germinação precoce.

O ABA, auxilia na formação e maturação de um grande número de embriões somáticos, de alta qualidade e aptos a se tornarem plantas (GUERRA et al., 1999). Na ausência de ABA, a maturação resulta em embriões somáticos pouco desenvolvidos e frequentemente anormais, apresentando baixa capacidade para a germinação e desenvolvimento da planta (DETONI, 2013).

A interação positiva do ABA e CA foi observado na conífera abeto da Noruega (*Piceaabies* L., Karst.), em que, essa combinação aumentou os rendimentos de embriões somáticos cotiledonares, o número de genótipos que formam embriões cotiledonares, além de reduzir o custo de produção de embriões. Esses embriões aumentaram de tamanho, apresentaram regiões apicais maiores, tornaram-se mais semelhantes com os zigóticos quanto a forma e, apresentaram percentuais mais elevados do desenvolvimento do epicótilo na germinação (PULLMAN et al., 2005).

As concentrações dos componentes de maturação também são cruciais para os estádios de desenvolvimento embrionário. Calos embriogênicos provenientes de indução com 4-CPA, cultivados em meio de maturação (MS+ABA+CA) apresentaram mais alto desempenho no desenvolvimento dos embriões em todos os estágios, com maiores números de embriões somáticos formado por calo (Tabela 3, Figura 1 K, L).

Embriões globulares foram observados na 12<sup>a</sup> semana de indução (Tabela 3). Nuño-Ayala et al. (2012) em *Jarilla heterophylla*, obtiveram o mesmo resultado,

de formação de embriões globulares na 12<sup>a</sup> semana em meio de indução suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> sacarose, 0,4 g L<sup>-1</sup> de glutamina e 0,40 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, sem a adição de qualquer auxina no meio de cultura. Verma et al. (2016), em MM suplementado com ABA, obtiveram desenvolvimento favorável de embriões globulares, de coloração branca e amarelo pálido, com maior progressão destes em cotilédonares posteriormente. Segundo estes autores, estes embriões cotilédonares, que inicialmente eram na cor branca, tornaram-se verdes e foram submetidos a germinação, características iguais as constatadas no presente trabalho. Anandan et al. (2012) trabalhando com meio líquido, suplementado com ABA (10,5 mgL<sup>-1</sup>), resultou num rendimento superior de embriões no estágio cotilédonar, e na ausência ou em menores concentrações de ABA obtiveram produção menor de embriões, em que, a maioria dos quais eram anormais.

**Tabela 3.** Número médio de embriões somáticos do mamoeiro hermafrodita híbrido UENF/Caliman 01 obtidos por explante foliar de brotações axênicas *in vitro* a partir de 2,4-D (6; 9; 12; 15 e 18 µM) e 4-CPA (19; 22; 25; 28 e 31 µM), em diversos estádios desenvolvimento, após 120 dias de cultivo

Auxinas	Meio de maturação (MM)	Estádio embriogênico			
		Globular	Cordiforme	Torpedo	Cotilédonar
2,4-D	MS completo	0,2 d <sup>(1)</sup>	0,0 d	0,2 d	0,0 d
	MS+CA	0,8 d	0,0 d	1,2 d	0,0 d
	MS+ABA	1,2 d	0,0 d	0,4 d	0,0 d
	MS+ABA+CA	0,6 d	0,6 d	1,2 d	0,0 d
	MS+ABA+PEG	0,0 d	0,0 d	0,6 d	0,0 d
CPA	MS completo	1,6 d	2,6 c	4,0 c	1,4 c
	MS+CA	5,0 b	5,0 b	6,6 b	4,8 b
	MS+ABA	2,8 c	0,8 d	4,2 c	1,6 c
	MS+ABA+CA	10,4 a	8,6 a	10,0 a	7,6 a
	MS+ABA+PEG	2,6 c	0,6 d	2,2 d	1,2 c

<sup>(1)</sup>Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de agrupamento de médias de Scott-Knott.

No mamoeiro UENF/Caliman 01, o desenvolvimento de embriões cotilédonares apresentou reações favoráveis quando provenientes de indução com 4-CPA (Figura 1M, N, O), em respostas ao MM suplementado com ABA e CA registrando a maiores médias (7,6) em meio MS de maturação com ABA + CA, e

(4,6) com CA (Tabela 3). Verma et al. (2016), obtiveram excelente desempenho com MM, suplementado com AIA(2 mgL<sup>-1</sup>) + TDZ (2 mgL<sup>-1</sup>) + ABA (100 mgL<sup>-1</sup>) em explantes foliares de açafrão (*Crocus sativus*), em que houve maior proliferação e desenvolvimento de embriões na fase cotiledonar. Comportamento favorável também foi encontrado por Ju et al. (2014) com adição de 0,5% de CA no MM, o que aumentou significativamente a percentagem de maturação (87,52%), se comparado a ausência de CA (35,51%). Martínez et al. (2015), observaram com a espécie *Quercus rubra* que a combinação do meio basal de Murashig e Skoog (1962) contendo 0,4% CA, 3% de sacarose, e 20µM de tiosulfato de prata, foi a mais adequada para a produção de embriões cotiledonares ( $\bar{X}$ = 149,2) e para a sua subsequente germinação (88,9%).

O meio de maturação com PEG 6000 (60 g L<sup>-1</sup>) causou redução no desenvolvimento de embriões somáticos em todos os estágios (Tabela 3). Heringer et al. (2013), avaliando a maturação de embriões zigóticos imaturos do mamoeiro híbrido UENF/Caliman 01, em meio com PEG 3350 (60 g L<sup>-1</sup>), obtiveram as maiores respostas de maturação (83,3%), o maior número de embriões somáticos por calo (78). Na cv. Golden THB o aumento das concentrações de PEG 6000 reduziu a normalidade dos embriões somáticos, em aproximadamente 54%, ao comparar com a ausência na máxima concentração estudada de 70 g L<sup>-1</sup> (CHAGAS, 2014). A formação de anormalidades morfológicas nos embriões somáticos foi observada em todos os meios estudados no presente trabalho, tais como monocotilédones, multicotilédones e cotilédones fundidos (Figura 1O). Variações como estas foram também observadas no desenvolvimento de embriões somáticos de mamoeiro cv. Improved Sunrise Solo line 72/12 (KOEHLER, 2004), cv. Golden (ANANDAN et al., 2012), cv. Golden THB (DETONI, 2013), cv. Golden e geração F<sub>2</sub> do híbrido UENF/Caliman 01 (VALE et al., 2014).

#### **4.3. Germinação dos embriões cotiledonares**

A partir das análises dos resultados obtidos na fase de maturação, foram selecionados apenas os embriões cotiledonares do melhor meio de maturação (MM:

MS+ABA+CA) (Tabela 3, Figura 1M, N), que foram transferidos para meio de germinação suplementado com concentrações (0,5; 1,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup>) de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). Os tratamentos foram realizados em 40 embriões cotiledonares, dispostos aleatoriamente 10 unidades em cada meio MS com três diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> e em meio sem regulador de crescimento.

No período de 30 dias, os embriões foram classificados em germinados e não germinados, obtendo valores de 6 e 34, respectivamente. A ausência de regulador de crescimento não resultou em germinação de embriões somáticos cotiledonares do mamoeiro hermafrodita híbrido UENF/Caliman 01. E mesmo quando ao meio foi acrescido GA<sub>3</sub>, a germinação dos embriões somáticos foi baixa com percentual de 20% em 0,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, e 40% em 1,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, em que a conversão em plântulas viáveis foi praticamente nula (Figura 1 P, Q).

Uma série de resultados, em plantas de diferentes espécies, sugere que o GA<sub>3</sub> estimula genes que estão envolvidos, principalmente, no alongamento e divisão celular (ZIMMERMAN et al., 1993). Segundo Chen et al. (2006) a germinação é acompanhada pelo aumento da regulação de um número de genes de resposta ao estresse e transportador de membrana, e, como esperado, esverdeamento está associada com a sobre-regulação de diversos genes que codificam os componentes fotossintéticos e cloroplastos.

Em *Curcuma amada* Roxb. (mango gengibre), avaliando os efeitos do GA<sub>3</sub> e o fotoperíodo na fase de germinação em sementes sintéticas a partir de embriões maduros. A máxima germinação foi de 74,99% em meio contendo 0,25 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> mantidas no escuro, a germinação foi também inibida em maiores concentrações de GA<sub>3</sub>, houve também influencia das concentrações de nutrientes na germinação dessas sementes sintéticas, no qual as maiores porcentagens de germinação foram obtidas em MS ½ força, contendo 0,25 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> e 3% de sacarose (RAJU et al., 2016).

Essa constatação sugere que as concentrações do GA<sub>3</sub> empregada para este genótipo de mamoeiro, pode intervir desfavoravelmente a germinação dos embriões, havendo necessidade de redução endógena de nutrientes do meio MS, ou mesmo do ABA anteriormente usado na maturação dos embriões somáticos, que inclusive induz a produção de LEAs o que confere a tolerância a dessecação dos embriões, podendo estabelecer dormência fisiológica nestes embriões. Seus genes

são expressos em fases tardias da embriogênese, e pode ser induzida quando embriões somáticos e zigóticos são tratados com ABA (IKEDA-IWAI et al., 2002).

Em *Arabidopsis thaliana* foi identificado 51 genes que codificam proteínas LEA e, estes são classificados em nove grupos distintos, em que mostram expressão para a produção de LEA em resposta a sinalização pelo ABA e/ou a baixa temperatura (HUNDERTMARK, et al., 2008; YOSHIDA, et al., 2014). Negin e Moshelion (2016) confirmam, após o tratamento com ABA, que genes são regulados positivamente, e estes incluem aqueles que codificam LEAs, fatores de transcrição e osmoprotetores, bem como de energia e de genes relacionados com o metabolismo. As proteínas podem ser utilizadas como marcadores para a ES, relacionando assim estágios embrionários e suas alterações nos perfis protéicos com o desenvolvimento embrionário (CAMPALANS et al., 2000).

Em mamoeiro, observa-se baixa germinação, produção de calos na base da radícula do embrião e a ocorrência de mudas hiperídricas (ASCENCIO-CABRAL et al., 2008). Estes autores, ao testarem agentes gelificantes ao meio de cultura encontraram uma alternativa para minimizar os problemas citados acima, com o uso do Bactoagar<sup>®</sup> (7,5 gL<sup>-1</sup>) em que, obtiveram germinação de 41%, superior ao encontrado com ágar<sup>®</sup> (7,0 gL<sup>-1</sup>) e Fitigel<sup>®</sup> (3,0 gL<sup>-1</sup>) que foi de 10 e 23% germinação, respectivamente, originando plântulas livres de anomalias. Os resultados do presente trabalho, corroboram com os obtidos por Ascencio-Cabral et al. (2008), onde a utilização de ágar como agente solidificante do meio MS, e a suplementação com GA<sub>3</sub> resultou em baixa germinação e formação de embriões anormais, entretanto, não houve hiperidricidade dos embriões (dados não apresentados).

Em muitos sistemas embriogênicos, a transferência de ES para meios de cultura livres de reguladores de crescimento, aumenta o desenvolvimento do ES e a sua conversão em plântulas (JU et al., 2014). A maturação dos embriões em meio solidificado com ágar deu origem a uma taxa de germinação muito mais elevada (48%) do que aquela observada quando foi realizada a maturação na presença de goma de gelano (30%), produzido pela bactéria *Sphingomonas elodea* (MARQUEZ-MARTIN et al., 2009).

Os embriões do mamoeiro hermafrodita híbrido UENF/Caliman precisavam que a radícula fosse estimulada ao crescimento e, portanto, isto teve muito baixa eficiência, ao manter estes embriões em meio MS com ausência e presença de GA<sub>3</sub>

nas concentrações estudadas (Tabela 4). A provável explicação, pode estar no tipo e concentrações do regulador de crescimento estudadas. Wu et al. (2012) observaram em brotos de mamoeiro cv. Meizhonghong maior porcentagem (90%) e qualidade de raízes em meio MS + AIB (0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> por 3 e 1 dia, respectivamente), antes da transferência para o meio 3/2 MS (1,5x os macroelementos) + CA (0,5 g L<sup>-1</sup>) +sacarose (5 g L<sup>-1</sup>) para o desenvolvimento de raízes. Estes autores, observaram também que, a exposição destes explantes em AIB (1000 mg L<sup>-1</sup>) por 10 segundos, resultou em 84,7% de enraizamento e com raízes normais, antes da transferência para o meio de desenvolvimento de raízes. Portanto, sugere-se estudar a indução em embriões hermafrodita híbrido UENF/Caliman 01, outros indutores, a exemplo, das auxinas, como o AIB em diferentes tempos de exposição em meio sólido e pulsos em meio líquido.

## 5. CONCLUSÕES

A eficiência na indução da embriogênese somática de explantes foliares axênicos de brotações *in vitro* do mamoeiro hermafrodita híbrido UENF/Caliman 01, foi maior com 4-CPA (25  $\mu\text{M}$ ), com efeito significativo na indução de calos embriogênicos.

A maturação e conversão de embriões somáticos foram obtidos em maior número após inoculadas em meio MS suplementado com ABA (0,5 $\mu\text{M}$ ) e CA (15  $\text{mgL}^{-1}$ ).

Para a germinação dos embriões somáticos cotiledonares, a suplementação com GA<sub>3</sub> potencializa a conversão em plântulas, ainda com baixa eficácia, porém mais efetivo quando comparadas com meio MS isento de regulador de crescimento.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, I. S.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Massal induction of *Carica papaya* L. 'Golden' somatic embryos and somaclone screening by flow cytometry and cytogenetic analysis. **Cytologia**, v. 79, n. 3, p. 475-484, 2014.
- ALMEIDA, E. P.; OLIVEIRA, R. P.; DANTAS, J. L. L. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 51-54, 2001.
- ANANDAN, R.; SUDHAKARA, D.; BALASUBRAMANIAN, P.; GUTIÉRREZ-MORAB, A. *In vitro* somatic embryogenesis from suspension cultures of *Carica papaya* L. **Scientia Horticulturae**, v. 136, p. 43-49, 2012.
- ARORA, I. K.; SINGH, R. N. Growth hormones and *in vitro* callus formation of papaya. **Scientia Horticulturae**, v. 8, p. 357-361, 1978.
- ASCENCIO-CABRAL, A.; GUTIÉRREZ-PULIDO, H.; RODRÍGUEZ-GARAY, B.; GUTIÉRREZ-MORA, A. Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. **Scientia Horticulturae**, v. 118, p. 155-160, 2008.
- AZEVEDO, T. P.; NETO, A. F. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Carica papaya* L. em função do estágio de maturação. **Revista Verde**, v. 9, n. 2, p. 68-72, 2014.
- BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 169-176, 1996.
- BISOGNIN, D. A. Breeding vegetatively propagated horticultural crops. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, v. 11, p. 35-43, 2011.
- BORGES, N. S. S.; BENBADIS, A. K.; MARCO, C. A.; SOMBRAS, J. N. S. Avaliação da descontaminação, germinação e respostas morfogênicas do mamão cultivado



*in vitro* (*Carica papaya* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 2, p. 308-313, 2006.

CALIC-DRAGOSAVAC, D.; ZDRAVKOVI-KORA, S.; BOHANEK, B.; RADOJEVI, L.; VINTERHALTER, B.; STEVOVI, S.; CINGEL, A.; SAVI, J. Effect of activated charcoal, abscisic acid and polyethylene glycol on maturation, germination and conversion of *Aesculus hippocastanum* androgenic embryos. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 3786-3793, 2010.

CAMPALANS, A.; PAGÈS, M.; MESSEGUER, R. Protein analysis during almond embryo development. Identification and characterization of a late embryogenesis abundant protein. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 449-457, 2000.

CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; HERRERA, E. A.; CASTRO, E. M.; PAIVA, P. D. O.; VARGAS, D. P. Indução, análises morfológicas e ultraestruturais de calos de maracujazeiro nativo. **Revista Ceres**, v. 62, n. 4, p. 340-346, 2015.

CASTRO, L. M.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J.; MIYATA, L. Y. Embriogênese somática a partir de calos de cultivares de laranja doce. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p.1831-1834, 2010.

CHAGAS, K. **Maturação e germinação de embriões somáticos do mamoeiro 'Golden THB'**. 2014. 54f. Tese (Mestrado em Agricultura Tropical). Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo, 2014.

CHEN, C. C., WANG, P. J.; MAEDA, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. **Plant Cell Reports**. v. 6, n. 5, p. 348-351, 1987.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R.; ARAÚJO, F. S.; ABREU, I. S.; OTONI, W. C. Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 207-214, 2008.

DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; SILVA, F. F.; REIS, M. V. M.; PEREIRA, M. G. Diversidade genética em duas espécies de caricáceas e suas relações genéticas com *Carica papaya* L. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 4, p. 733-739, 2015.

DANTAS, J. L. L.; LIMA, J. F. Seleção e recomendação de variedades de mamoeiro - avaliação de linhagens e híbridos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 617-621, 2001.

DETONI, J. L. **Embriogênese somática em mamoeiro seleção THB**. 2013. 78f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical). Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo, São Mateus-ES, 2013.

DHEKNEY, S. A.; KANDEL, R.; BERGEY, D.R; SITTHER, V.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; LITZ, R. E. Advances in papaya biotechnology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p.133-142, 2016.

- DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Variação genética em espécies arbóreas e consequências para o melhoramento florestal. **Agrotropica**, v. 3, n. 3, p. 119-127, 1982.
- DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 8, n. 48, p. 1493-1509, 1997.
- DOU, L.; ZHANG, X.; PANG, C.; SONG, M.; WEI, H.; SHULI, F.; YU, S. Genome-wide analysis of the WRKY gene family in cotton. **Molecular Genetics and Genomics**, v.6, n. 289, p.1103-1121, 2014.
- ELMEER, K. E. S. Factors regulating somatic embryogenesis in plants. In: ASLAM J.; SRIVASTAVA, P. S.; SHARMA, M. P. (Eds.). **Somatic embryogenesis and gene expression**. New Delhi: Narosa Publishing House, p. 56-81, 2013.
- FARZANA, A. R. F.; PALKADAPALA, P. G. V. N.; MEDDEGODA, K. M. M. N.; SAMARAJEEWA, P. K.; EESWARA, J. P. Somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya* L. cv. Rathna). **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 36, n. 1, p. 41-50, 2008.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201-228, 2003.
- FERREGUETTI, G. A. Caliman 01: O primeiro híbrido de mamão formosa Brasileiro. In: PAPAYA BRASIL, 2003, Vitória. **Anais ...** p. 211-218, 2003.
- FITCH, M. M. M. High-frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 32, p. 205-212, 1993.
- FITCH, M.M.M.; MANSHARDT, R.M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Cell Reports**, v.9, p. 320-324, 1990.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Food and agricultural commodities production: papayas**, 2012. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 23 set. 2015.
- FRANCISCO, M. G. S.; MARUYAMA, W. I.; MENDONÇA, V.; SILVA, E. A.; REIS, L. L.; LEAL, S. T. Substratos e recipientes na produção de mudas de mamoeiro 'Sunrise Solo'. **Revista Agrarian**, v. 3, n. 9, p. 267-274, 2010.
- FRIDBORG, G.; PEDERSÉN, M.; LANDSTROM, L. E. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, v. 43, p. 104-106, 1978.
- GARCIA, R.; CIDADE, D.; CASTELLAR, A.; LIPS, A.; MAGIOLI, C.; CALLADO, C.; MANSUR, E. *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugar cane are determined by light and type of growth regulator. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p.181-190, 2007.

GARCIA, R.; PACHECO, G.; FALCÃO, E.; BORGES, G.; MANSUR E. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 47-54, 2011.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. (eds). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. **Brasília: EMBRAPA-CNPQ**, p.183-260, 1998.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa-CBAB. v. 2. p. 533-568, 1999.

HERINGER, A. S.; VALE, E. M.; BARROSO, T.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis on papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 2, n. 25, p. 116-124, 2013.

HUNDERTMARK, M.; HINCHA, D. K.; LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. **BioMed Central Genomics**, v.9, n.118, p. 1-22, 2008.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estados**. Disponível em <idades.ibge.gov.br>. Acesso em: 23 set. 2015.

IKEDA-IWAI, M.; SATOH, S.; KAMADA, H. Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of *Arabidopsis* somatic embryos. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n.374, p. 1575-1580, 2002.

INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL. Desenvolvimento da Fruticultura: o mamão capixaba é o mais exportado do Brasil. **Incaper em Revista**, 2010. Disponível em: <http://incaper.web407.uni5.net/revista.php?idcap=978>. Acesso em: 20 out. de 2015.

INSTITUTO EUVLDO LODI – IEL. **200 Maiores Empresas no ES**. Vitória/ES, p. 67, 2008.

JORDAN, M.; VELOZO, J. *In vitro* propagation of highland papayas (*Carica pubescens* and *C. pentagona*). **Acta Horticulturae**, v. 447, p. 103-106, 1997.

JU, H.; JEYAKUMAR, J.; KAMARAJ, M.; PRAVEEN, N.; CHUNG, I.; KIM, S.; THIRUVENGADAM, M. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl and leaf explants of gherkin (*Cucumis anguria* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 169, p. 161-168, 2014.

KAYIM, M.; KOC, N. K. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. **Scientia Horticulturae**, v. 109, p. 29-34, 2006.

KOCH, K. E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Gainesville, v. 47, n. 5, p. 509-540, 1996.

KOEHLER, A. D. **Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC, AVG e STS e de pulsos de 2,4-D.** 2004. 85f. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2004.

KOEHLER, A. D. **Reprodução em *Bracchiaria* spp.: SERK (Somatic embryogenesis receptor-like kinase) no desenvolvimento de antera, do ovário e na embriogênese.** 2010. 110f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia na Agricultura e no Ambiente). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Quiroz, 2010.

KOEHLER, A. D.; CARVALHO, C. A.; ABREU, I. S.; CLARINDO, W. R. Somatic embryogenesis from leaf explants of hermaphrodite *Carica papaya*: A new approach for clonal propagation. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 18, p. 2386-2391, 2013.

KOMAMINE, A.; KAWAHARA, R.; MATSUMOTO, M.; SUNABORI, S.; TOYA, T.; FUJIMURA, T. Mechanismos of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, v. 28, p. 11-14, 1992.

KRASSIMIRA, S.; ALEXANDROVA, B. V. Isolation of two somatic embryogenesis-related genes from orchardgrass (*Dactylis glomerata*). **Plant Science**, v. 162, n. 2, p. 301-307, 2002.

LAGACÉ, M.; MATTON, D. P. Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense*. **Planta**, v. 219, n. 1, p. 185-189, 2004.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; GROF, C. L. P.; BONNETT, G. D.; SMITH, G. R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 41, p. 345-363, 2005.

LAMEIRA, A. O.; PINTO, J. E. B. P.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; CARDOSO, M. G. Efeito de compostos fenólicos, carvão ativado e do meio físico no desenvolvimento de segmento nodal de *Cordia verbenacea* L. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p.189-192, 1997.

LING, J.; JIANG, W.; ZHANG, Y.; YU, H.; MAO, Z.; GU, X.; HUANG, S.; XIE, B. Genome-wide analysis of WRKY gene family in *Cucumis sativus*. **BMC Genomics**, v. 12, n. 471, p.1-20, 2011.

LITZ, R.E.; CONOVER, R.A. Somatic embryogenesis in cell cultures of *Carica stipulata*. **Horticulturae Science**, v. 15, p. 733-734, 1980.

LUZ, L. N.; PEREIRA, M. G.; BARROS, F. R.; BARROS G. B.; FERREGUETTI, G. A. Novos híbridos de mamoeiro avaliados nas condições de cultivo tradicional e no semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 159-171, 2015.

MA, J.; HE, Y.; WU, C.; LIU, H.; HU, Z.; SUN, G. Cloning and molecular characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic

embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, p.195-203, 2012.

MALABADI, R. B.; KUMAR, S. V.; MULGUND, G. S.; NATARAJA, K. Induction of somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya*). **Research in Biotechnology**, v. 2, p. 40-55, 2011.

MARIN, S. L. D.; GOMES, J.A. Sexagem do mamoeiro e sua aplicação no desbaste de plantas. **ENCAPA**, v. 11, p. 22, 1985.

MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; GUZMÁN-GARCÍA E.; BARCELÓ-MUNOZ A.; PLIEGO-ALFARO, F.; SÁNCHEZ-ROMERO, C. Effects of an *in vitro* maturation treatment on plant recovery from avocado zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, v.122, p.532-539, 2009.

MARTÍNEZ, M. T.; VIEITEZ, A. M.; CORREDOIRA, E. Improved secondary embryo production in *Quercus alba* and *Q. rubra* by activated charcoal, silver thiosulphate and sucrose: influence of embryogenic explant used for subculture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, p. 531-546, 2015.

MDIC – Ministério de Desenvolvimento Indústria, Comércio Exterior e Serviços. **Dados**. Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/noticias/109-comercio-exterior/1425-aumentaram-exportacoes-em-12-estados-em-2014>>. Acesso em: 2 jun. 2016.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Efeito de ANA e AIB *in vitro* no enraizamento e crescimento da parte aérea de plântula de guarirôbeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Bioscience Journal**, v. 17, n. 1, p. 49-59, 2001.

MÉRQUEZ-MARTÍNA, B.; SESMEROA, R.; QUESADAB, M. A.; PLIEGO-ALFAROC, F.; SANCHEZ-ROMEROB, C. Water relations in culture media influence maturation of avocado somatic embryos. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p. 2028- 2034, 2011.

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y. Induction of somatic embryogenesis in immature seeds of guava tree cv. Paluma. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 507-511, 2009.

MURASHIGE, T. M.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NEGIN, B.; MOSHELION, M. The evolution of role of ABA in regulation of water-user efficiency: From biochemical mechanisms to stomatal conductance. **Plant Science**. 2016. v. 251, p. 82-89, 2016.

NOLAN, K. E.; SONG, Y.; LIAE, S.; SAEED, N. A.; ZHANG, X.; ROSE, R. J. An unusual abscisic acid and gibberellic acid synergism increases somatic embryogenesis, facilitates its genetic analysis and improves transformation in *Medicago truncatula*. **Plos One**, v. 9, p. 1-8, 2014.

NUÑO-AYALA, A.; RODRÍGUEZ-GARAY, B.; GUTIÉRREZ-MORA, A. Somatic embryogenesis in *Jarilla heterophylla* (Caricaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 33-39, 2012.

OLIVEIRA, E. J.; FRAIFE FILHO, G. A.; FREITAS, J. P. X.; DANTAS, J. L. L. Desempenho produtivo e interação genótipo x ambiente em híbridos e linhagens de mamoeiro. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 2, p. 402-410, 2014.

PAN, L.-J.; JIANG, L. Identification and expression of the WRKY transcription factors of *Carica papaya* in response to abiotic and biotic stresses. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p. 1215-1225, 2015.

PERERA, P. I. P.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; BANDUPRIYA, H. D. D.; YAKANDAWALA D. M. D.; WEERAKOON, L. K. Androgenic potential in coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 293-302, 2008.

PINHEIRO, M. V. M.; SILVA, T. C. R.; MAIA, C.; LIMA, B. V.; MOTOIKE, S. Y. Propagação in vitro de genótipos de alface via embriogênese somática. **Ciência Rural**, v. 42, p. 1947-1953, 2012.

PULLMAN, G. S.; GUPTA, P. K.; TIMMIS, R.; CARPENTER, C.; KREITINGER, M.; WELTY, E. Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. **Plant Cell Report**, v. 24, p. 271-279, 2005.

RAJU, C. S.; ASLAM, A.; SHAJAHAN, A. Germination and storability of calcium-alginate coated somatic embryos of Mango Ginger (*Curcuma amada* Roxb.). **Horticulture Environment Biotechnology**, v. 57, n. 1, p. 88-96, 2016.

RAMAMOORTHY, R.; JIANG, S.; KUMAR, N.; VENKATESH, P. N.; RAMACHANDRAN, S. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. **Plant Cell Physiology**, v. 6, n. 49, p. 865-879, 2008.

RAMOS, H. C. C.; PEREIRA, M. G.; GONÇALVES, L. S. A.; BERILLI, A. P. C. G.; PINTO, F. O.; RIBEIRO, E. H. Multivariate analysis to determine the genetic distance among backcross papaya (*Carica papaya*) progenies. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 2, p. 1280-1295, 2012.

RAMOS, R. S. **Efeito de reguladores de crescimento na embriogênese somática de cana-de-açúcar**. 2011. 52f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2011.

RAZALI, R. M.; DREW, R. A refined protocol to embryogenesis to transfer PRSV-P resistance genes from *Vasconcella pubescens* to *Carica papaya*. **Acta Horticulturae**, v. 1022, n. 4, p. 47-53, 2014.

RENUKDAS, N.; MOHAN, M. L.; KHUSPE, S. S.; RAWAL, S. K. Influence of boro on somatic embryogenesis in papaya. **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 1, p. 129-132, 2003.

- RODRIGUEZ, A. P. M.; WETZSTEIN, H. Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, v. 204, n. 1-2, p. 71-83, 1998.
- RUGGIERO, C.; MARIN, S. L. D.; DURIGAN, J. F. Mamão, uma história de sucesso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 76-82, 2011.
- SAVONA, M.; MATTIOLI, R.; NIGRO, S.; FALASCA, G.; DELLA ROVERE, F.; COSTANTINO, P.; DE VRIES, S.; B. RUFFONI, B.; TROVATO, M.; ALTAMURA, M. M. Two SERK genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 471-488, 2012.
- SCHIMIDT, E. D.; GUZZO, F.; TOONEN, M. A.; DEURIES, S. C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Journal Articles**, v. 124, p. 2049-2062, 1997.
- SCHMILDT, O.; SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T. Cinetina e ANA na multiplicação *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 1, p. 55-60, 2007.
- SCHUMANN, G.; RYSCHKA, U.; SCHULZE, J.; KLOCKE, E. Anatomy of somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) **Somatic embryogenesis and synthetic seed I**. Berlin: Springer-Verlag, p. 3-19, 1995.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.
- SERRANO, L. A. L.; CATTANEO, L. F. O cultivo do mamoeiro no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 657-959, 2010.
- SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; SONDAHL, M. R. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. In: FUJIWARA, A. (Ed.). **Plant tissue culture**. Tokio: Maruzen, p. 759-762, 1982.
- SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; CALLADO, C. H.; CASTRO, T. C.; MANSUR, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Cleome rosea* Vahl. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 679-686, 2010.
- SIVANESAN, I.; KYOUNG, K. E.; KYOUNG, K. M.; YOUNG K. E, PARK, S. W. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo explants of onion. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 441-447, 2015.
- SMERTENKO, A.; BOZHKO, P. V. Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. **Journal of Experimental Botany**, v. 5, p. 2-18, 2014.
- STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. **Plant Cell Tissue and Organ and Cultures**. n.74, p.15-35,2003.

- STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; ANDRADE, J. B. R.; BALBUENA, T. S.; GUERRA, M. P.; HANDRO, W.; FLOH, E. S. I. S.; SILVEIRA, V. *Araucaria angustifolia* Biotechnology. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 2, p. 20-28, 2008.
- SUN, D-Q.; LU, X-H.; LIANG, G-L.; GUO, Q-G.; MO, Y-W.; XIE, J-H. Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, n. 1, p. 23-29, 2011.
- TEXEIRA, L. R.; BRACCINI, A. de L.; CHURATA, B. G. M.; VIEIRA, E. S. N.; MARTINS, P. K.; SCHUSTER, I. Evaluation of soybean cultivars on the embryogenic and organogenic potential. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, n. 1, p. 67-74, 2011.
- TITON, M.; XAVIER, A; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 3, p.417-426, 2007.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa-SPI/CNPH, Brasília, v.1, p. 11-19, 1998.
- VALE, E. M.; HERINGER, A. S.; BARROSO, T.; FERREIRA, A. T. S.; COSTA, M. N.; PERALES, J. E. A.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in *Carica papaya* L. **Proteome Science**, v. 12, n. 37, p. 1-17, 2014.
- VERMA, S. K.; DAS, A. K.; CINGOZ, G. S.; USLU, E.; GUREL, E. Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and regeneration in selected *Turkish crocus* species. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 66-74, 2016.
- VIDAL, F. R.; DINIZ, J. D. N.; SILVA, F. P. Multiplicação *in vitro* plantas juvenis de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n.1, p. 64-70, 2013.
- WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.
- WU, K.; ZENG, S.; CHEN, Z.; DUAN, J. *In vitro* massa propagation of hermaphroditic *Carica papaya* cv. Meizhonghong. **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, n. 5, p. 1669-1676, 2012.
- YOSHIDA, T.; FUJITA, Y.; MARUYAMA, K.; MOGAMI, J.; TODAKA, D.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Y. Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. **Plant, Cell & Environment**, v.38, p. 35-49, 2014.
- ZIMMERMANN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.