

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

**JAMILE LENHAUS DETONI**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MAMOEIRO  
SELEÇÃO THB**

**São Mateus, ES  
Fevereiro de 2013**

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

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MAMOEIRO  
SELEÇÃO THB**

**JAMILE LENHAUS DETONI**

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.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre

**São Mateus, ES  
Fevereiro de 2013**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

D482e Detoni, Jamile Lenhaus, 1986-  
Embrionogênese somática em mamoeiro seleção THB / Jamile  
Lenhaus Detoni. – 2013.  
78 f. : il.

Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre.  
Coorientadores: Edilson Romais Schmildt, José Carlos Lopes,  
Wagner Campos Otoni.  
Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário  
Norte do Espírito Santo.

1. Mamão. 2. Auxina. 3. Microscopia vegetal. I. Alexandre,  
Rodrigo Sobreira. II. Schmildt, Edilson Romais. III. Lopes, José  
Carlos. IV. Otoni, Wagner Campos. V. Universidade Federal do  
Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. VI.  
Título.

CDU: 63

---

# EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MAMOEIRO SELEÇÃO THB

**JAMILE LENHAUS DETONI**

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: 25/02/2013



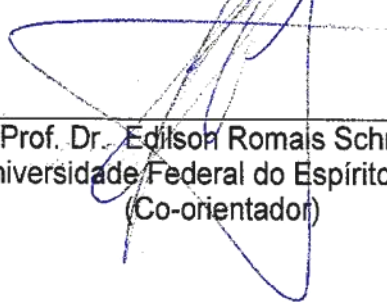
Prof. Dr. José Carlos Lopes

Universidade Federal do Espírito Santo  
(Co-orientador)



Prof.ª Dr.ª Glória Maria de Fajias Viégas  
Aquije

Instituto Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Edilson Romais Schimdt  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Co-orientador)



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

*À minha família, especialmente meus amados pais Geni  
Lenhaus Detoni e José Francisco Detoni*

*Às minhas irmãs queridas, Cybelle Lenhaus Detoni e  
Camila Lenhaus Detoni*

*Ao meu amado e paciente noivo, Igor Félix Cipriano*

*Com amor, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo projeto de vida a que tem me concedido.

À minha família pelo amor incondicional e por ser meu “castelo forte” nos momentos difíceis dessa caminhada.

Ao meu noivo, Igor, pela paciência o qual tem me esperado e pelo auxílio técnico nas imagens.

À Universidade Federal do Espírito Santo, em especial ao Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical, pela oportunidade de realização do curso.

Ao professor Rodrigo Sobreira Alexandre pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa e por toda a orientação e dedicação investida.

Aos meus co-orientadores, professores Edilson, José Carlos e Wagner, pelas relevantes contribuições ao desenvolvimento do trabalho.

Aos professores Duboc e Karina pela paciência e ajuda durante as análises.

À professora colega e amiga Glória Viegas pela orientação na interpretação das imagens.

À Ana Cláudia, Christine e Jairo pela ajuda referente às análises de microscopia do material.

À Empresa Caliman Agrícola S.A. pelo suporte técnico na pesquisa.

Ao senhor Edivaldo Permanhane e seu funcionário Wagner, da Fazenda Vovô Delio, pelos ensinamentos e fornecimento do material vegetal.

A todos os colegas do PPGAT que participaram direta ou indiretamente dessa conquista, em especial aos amigos Poliana, Robson, Clemilton e Kristhiano por dividirem as angústias e multiplicarem as alegrias.

A todos os colegas e amigos do Instituto Federal do Espírito Santo, *Campus* Nova Venécia, que hoje se alegram com essa vitória.

A todos vocês, meu MUITO OBRIGADA!!

## BIOGRAFIA

JAMILE LENHAUS DETONI, filha de José Francisco Detoni e Geni Lenhaus Detoni, nasceu na cidade de São Gabriel da Palha, ES, em 24 de janeiro de 1986.

No ano de 2004 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, onde se graduou em licenciatura no final de 2007 e bacharelado no ano de 2009.

Durante o período de graduação foi bolsista CNPq por quatro anos, participando de projetos de pesquisa científica no Laboratório de Estresse e Bioquímica Molecular, onde adquiriu experiência em biologia e bioquímica vegetal.

Iniciou o curso de especialização *lato senso* em Educação Ambiental pelo SENAC/MG em 2009, finalizado em 2010.

Através de concurso público, assumiu, em maio de 2010, o cargo de professora efetiva do Instituto Federal do Espírito Santo, *Campus Nova Venécia*, para lecionar aulas de biologia aos alunos do curso técnico integrado, onde atua até o presente momento.

Em 2011, ingressou no Programa de Pós-graduação de Mestrado em Agricultura Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, onde se especializou em propagação de plantas por meio da técnica de embriogênese somática, submetendo-se à defesa de dissertação em 25 de fevereiro de 2013.



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Importância econômica	4
2.2 Propagação do mamoeiro	5
2.3 Embriogênese somática	7
2.4 Morfologia e histologia	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Material vegetal e germinação <i>in vitro</i>	18
3.2 Indução de embriogênese somática	19
3.3 Maturação dos embriões somáticos	19
3.4 Preparação das amostras para microscopia	20
3.5 Microscopia de luz	20
3.6 Microscopia eletrônica de varredura	21
3.7 Análise estatística	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 Indução de embriogênese somática	23
4.2 Maturação dos embriões somáticos	38

4.3 Análise histológica e estrutural	42
5. CONCLUSÕES GERAIS	51
6. REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{M}$ :	Micromolar
2,4-D:	ácido 2,4-diclorofenóxiacético
2-iP:	N-isopenteniladenina
4-CPA:	ácido 4-clorofenoxiacético
6-BA:	6-benzilaminopurina
$\text{AgNO}_3$ :	nitrate de prata
ABA:	ácido abscísico
ACC:	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
AFB:	<i>auxin signalling F-box</i>
AIA:	ácido indol-3-acético
AIB:	ácido indol-3-butírico
ANA:	ácido $\alpha$ -naftalenoacético
AP:	ápice caulinar
CA:	carvão ativo
Cl:	Cloro
CPA:	ácido <i>p</i> -clorofenoxiacético
cv.:	Cultivar
DIC:	delineamento inteiramente casualizado
Dicamba:	ácido 3,6-dicloroanísico
DNA:	ácido desoxirribonucléico
ES:	embrião somático
FC:	folha cotiledonar
LEAs:	<i>late embryogenesis abundant</i>
MCPE:	massa celular pró-embriogênica
MI:	meio de indução

MM:	meio de maturação
MS:	meio Murashige e Skoog
NCED:	9- <i>cis</i> -epoxicarotenóide dioxigenase
Picloram:	ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
PEG:	Polietilenoglicol
pH:	potencial hidrogeniônico
RNAm:	ácido ribonucléico mensageiro
TDZ:	Tidiazuron
TIR1:	<i>transport inhibitor responce 1</i>

## RESUMO

DETONI, Jamile Lenhaus; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Fevereiro de 2013; **Embriogênese somática em mamoeiro seleção THB**; Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre, Co-orientadores: Edilson Romais Schmildt; José Carlos Lopes; Wagner Campos Otoni.

Objetivou-se avaliar a embriogênese somática em explantes juvenis do mamoeiro seleção THB. Ápices caulinares e folhas cotiledonares foram inoculados em meio de indução (MI): sais de MS, sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), Phytigel<sup>®</sup> ( $2,8 \text{ g L}^{-1}$ ) e concentrações de 2,4-D (6; 9; 12; 15 e  $18 \mu\text{M}$ ) ou 4-CPA (19; 22; 25; 28 e  $31 \mu\text{M}$ ). Após 50 dias, os calos embriogênicos foram transferidos para o meio de maturação (MM): MS sem regulador de crescimento; ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ); ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + CA ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ); ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + CA ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ); ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + PEG ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ) durante 30 dias. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% e análise de regressão. Em MI, para ambas as auxinas, as respostas foram superiores quando utilizadas folhas cotiledonares, à exceção da calogênese. Para os tipos de embriões somáticos, prevaleceram, em ambas as auxinas, embriões em fases precoces, como globulares e cordiformes. Para o 2,4-D, não foi possível estabelecer uma concentração ótima para resposta, porém com o 4-CPA todas as variáveis tiveram seu ponto máximo próximo a  $25 \mu\text{M}$ . Nessa concentração, obteve-se 91,67% de calos embriogênicos para folha cotiledonar. A análise histológica de folhas cotiledonares identificou a formação de embriões somáticos a partir de células parenquimáticas, prevalecendo a forma indireta, porém não sincronizada. Identificou-se a ocorrência de embriogênese somática secundária e a formação de embriões somáticos anormais. Para a maturação, a composição do meio que resultou em maior frequência de embriões somáticos ( $70 \text{ ES calo}^{-1}$ ), bem como menor porcentagem de ES germinados (4%), foi com ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + CA ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ). Portanto, para a embriogênese somática do mamoeiro seleção THB recomenda-se a indução de folhas cotiledonares em meio composto de 4-CPA ( $25 \mu\text{M}$ ), sendo a maturação em meio com ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + CA ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ).

Palavras-chave: *Carica papaya* L., explantes juvenis, auxinas sintéticas, maturação, análise microscópica.

## ABSTRACT

DETONI, Jamile Lenhaus; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; February 2013; **Somatic embryogenesis in papaya tree selection THB**; Adviser: Rodrigo Sobreira Alexandre, Committeed Members: Edilson Romais Schmidt; José Carlos Lopes; Wagner Campos Otoni.

This work aimed to assess the somatic embryogenesis in juvenile explants from the papaya tree selection THB. Apex stems and cotyledonary leaves inoculated by induction medium (IM): MS salts, sucrose (30 g L<sup>-1</sup>), myo-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), Phytigel<sup>®</sup> (2.8 g L<sup>-1</sup>) and concentrations of 2,4-D (6; 9; 12; 15 and 18 µM) or 4-CPA (19; 22; 25; 28 and 31 µM). After 50 days, the embryogenic calluses were transferred to the maturation medium (MM): MS without growth regulator; ABA (0.5 µM); ABA (0.5 µM) + CA (15 g L<sup>-1</sup>); ABA (0.5 µM) + CA (30 g L<sup>-1</sup>); ABA (0.5 µM) + PEG (60 g L<sup>-1</sup>) for 30 days. The data were submitted to analysis of variance by the F test and the averages compared by the Tukey test in level of 5% and analysis of regression. In IM, for both auxins, the responses were superior than when cotyledonary leaves were used, except the callogenesis. For the somatic embryo types, embryos in premature phase prevailed in both auxins, like globular and heart-shaped ones. For the 2,4-D, it was not possible to establish a great concentration for the response, but with the 4-CPA all the variables had their maximum level close to 25 µM. In this concentration, it was possible to obtain 91.67% of embryogenic calluses in cotyledonary leaves. For histological analysis of cotyledonary leaves, it was possible to identify the somatic embryos formation from parenchyme cells, prevailing the indirect form, but not synchronized. The occurrence of secondary somatic embryogenesis and the formation of abnormal embryos were also identified. For the maturation process, in the composition of the medium in which was detected a larger occurrence of somatic embryos (70 ES calo<sup>-1</sup>), as well as a lower percentage of germinated ES (4%), there was ABA (0.5 µM) + CA (15 g L<sup>-1</sup>). Therefore, for the somatic embryogenesis of the papaya tree selection THB, it is recommended the induction of cotyledonary leaves in 4-CPA (25 µM), being the maturation in an medium with ABA (0.5 µM) + CA (15 g L<sup>-1</sup>).

Keywords: *Carica papaya* L., juvenile explant, synthetic auxins, maturation, microscopic analysis.

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do mamoeiro (*Carica papaya* L.) ocupa um papel de destaque dentre as fruteiras tropicais no cenário mundial, sendo o Brasil o segundo maior produtor (FAO, 2010), apesar do índice de exportação brasileiro ainda ser considerado marginal, menos de 2% (IBRAF, 2010). Em nível nacional, os principais produtores são, nessa ordem, Bahia, Espírito Santo, Rio Grande do Norte e Ceará. Porém, em critérios de produtividade e exportação, o Espírito Santo se sobrepõe à Bahia e ocupa o primeiro lugar (IBGE, 2010). Essa significância na produção nacional e mundial ocorreu após a década de 70 com a introdução de mamoeiro do tipo Solo e Formosa, principalmente nesses dois estados brasileiros.

No Norte do Espírito Santo, tem-se cultivado frutos tanto do Grupo Formosa quanto do Grupo Solo. No primeiro caso, há destaque para os híbridos Tainung 01, importado de Taiwan, e o Calimosa (UENF/Caliman 01), desenvolvido nacionalmente em parceria entre a Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF) e a Empresa Caliman Agrícola<sup>®</sup>. Já para o Grupo Solo, na região, há produção do cv. Golden e da seleção THB, sendo este obtido por seleção massal do próprio cv. Golden dentro da Caliman Agrícola<sup>®</sup>.

Dentre os produtores da região, há preferência para o cultivo do mamoeiro seleção THB em relação aos frutos do cv. Golden, uma vez que as plantas apresentam qualidades que satisfazem o produtor, como alta produtividade por planta e porte mais baixo, o que facilita a realização de tratamentos culturais e a colheita. De acordo com o Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER, 2010) o sucesso da produção de mamão no estado deve-se à

implantação de programas de acompanhamento técnico dos produtores e monitoramento de lavouras, aliado ao desenvolvimento de tecnologias de manejo e controle de pragas no mamoeiro.

Comercialmente, a cultura do mamoeiro é propagada via seminífera, porém essa prática tem sido acompanhada por inúmeras desvantagens relatadas na literatura ou mesmo pelos produtores, como: a ocorrência de dormência pós-colheita (VIGGIANO et al., 2000; CHOW & LIN, 2001; BHATTACHARYA & KHUSPE, 2001; TOKUHISA, 2007); germinação lenta e irregular (TAKUHISA et al., 2008); grande variação da germinação dentre os diversos cultivares (PÉREZ et al., 1980; DETONI et al., 2011); elevada segregação gênica e desuniformidade da plantação em campo (COSTA & PACOVA, 2003); e alto custo inicial da implantação.

Esta última desvantagem, frequente entre os produtores, está relacionada ao preço incorporado a sementes de alguns genótipos importados, como o híbrido Tainung 01, muito cultivado no território nacional, e a necessidade do produtor de colocar três ou quatro mudas por cova para que haja maior garantia de obtenção de plantas hermafroditas, e sua posterior sexagem. Dessa forma, há elevado desperdício.

A propagação vegetativa é uma alternativa para a solução desses problemas. Em especial, a técnica de cultura *in vitro* tem se destacado na literatura por reunir duas qualidades essenciais à propagação com interesse comercial: obtenção de material idêntico geneticamente à planta matriz, para a manutenção das qualidades exigidas; e livre de doenças, uma vez que a cultura *in vitro* permite obter plantas axênicas.

Uma aplicação da cultura *in vitro* é a embriogênese somática, o qual é um processo em que células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, os mesmos para a embriogênese zigótica, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986). Apesar do uso dessa técnica em mamoeiro ser amplamente relatado na literatura, há diversos fatores que influenciam nas respostas à embriogênese somática, sendo o principal deles o genótipo escolhido. Notadamente, para uma mesma espécie é possível haver genótipos com potenciais embriogênicos bastante divergentes (BELL et al., 1993).

Além do genótipo, outros fatores exercem influências sobre a indução e maturação dos embriões somáticos como: o tipo e a concentração de auxina



(ANANDAN et al., 2012); o tipo de explante (ALMEIDA et al., 2001); a presença ou ausência de ácido abscísico (BELL et al., 1993), de carvão ativo (LÓPEZ-PÉREZ et al., 2005) ou de substâncias osmóticas (SALAJ et al., 2004), dentre outros. Nesse sentido, a avaliação de potenciais respostas embriogênicas *in vitro* para cada genótipo em particular se faz necessária.

A utilização de técnicas de microscopia de luz e eletrônica pode servir de ferramenta na investigação da origem e do desenvolvimento dos embriões somáticos, pois facilita a visualização do processo embriogênico.

Portanto, considerando a ausência de informações na literatura sobre o mamoeiro seleção THB, principalmente no que se refere às fases iniciais da cultura, bem como o promissor sucesso da aplicabilidade da técnica de cultura *in vitro* como alternativa à sua propagação, é de grande relevância uma análise sobre o processo de embriogênese somática, destacando alguns dos fatores que podem influenciar nas suas respostas.

Dessa forma, objetivou-se neste trabalho avaliar a indução embriogênica em mamoeiro seleção THB a partir de explantes do tipo ápice caulinar e folha cotiledonar e as auxinas 2,4-D e 4-CPA; estabelecer o meio de maturação favorável a formação dos embriões somáticos; bem como analisar seu desenvolvimento a partir de técnicas de microscopia de luz e eletrônica de varredura.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância econômica

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) ocupa lugar de destaque no cenário mundial e brasileiro na produção de frutas. O Brasil é o segundo maior produtor (FAO, 2010), perdendo apenas para a Índia, sendo o mamão produzido durante quase todos os meses do ano, com perspectivas de comercialização para o consumo *in natura* no mercado interno e exportação.

Essa planta é cultivada na quase totalidade do território brasileiro, mas passou a ter importância econômica significativa no país a partir de meados da década de 70, com a introdução de cultivares do Grupo Solo e de híbridos do Grupo Formosa. Os estados da Bahia, Espírito Santo, Rio Grande do Norte e Ceará são responsáveis por cerca de 90% da produção nacional (IBGE, 2010).

O maior produtor nacional é a Bahia, com representatividade superior a 49%, seguido pelo Espírito Santo, com produção em torno de 550 mil toneladas (30,68%). Porém, em relação à produtividade e exportação, o Espírito Santo destaca-se em primeiro lugar (IBGE, 2010).

Para a produção de mamão no estado do Espírito Santo, Linhares destaca-se como o principal município produtor e responsável por 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 na área de pesquisa, assistência técnica e extensão rural desenvolvido (INCAPER, 2010).

As principais características de fruto exigidas pelo mercado externo são: peso entre 350 e 550 g; formato piriforme; casca lisa, sem manchas externas; frutos firmes, com polpa espessa, sem protuberâncias e cavidade central redonda e pequena; polpa de coloração vermelho-alaranjada, embora o mercado norte-americano prefira polpa de coloração amarelada, tanto para consumo *in natura* quanto para sucos concentrados; resistente a longos períodos de armazenamento; e elevado teor de açúcares e ausência de odor desagradável (INCAPER, 2010).

De acordo com Farias et al. (1998), no Brasil a cultura do mamoeiro sustenta-se em estreita base genética, sendo bastante limitado o número de cultivares plantados. De forma geral, conforme as características do fruto, as variedades de mamoeiro são classificadas em dois grupos: Solo, com predomínio das cultivares *Sunrise Solo* (mamão-papaia) e *Improved Sunrise Solo* (mamão-havaí); e Formosa, destacando-se os híbridos Tainung 01, de origem asiática, e o UENF/Caliman 01, de origem brasileira.

Dentre os principais cultivares do grupo Solo produzidos no Espírito Santo, a seleção THB tem tido grande preferência entre os produtores do Norte do estado. Este genótipo foi obtido na Empresa Caliman Agrícola<sup>®</sup> por meio de seleção massal em uma plantação de cv. Golden. Sua preferência entre os produtores está baseada nas qualidades da planta, como porte baixo e alta produtividade. Porém, há poucos estudos específicos sobre a seleção THB, principalmente no que se refere à sua propagação visando melhorar sua produção.

## 2.2 Propagação do mamoeiro

O principal método de propagação empregado para a cultura do mamoeiro em escala comercial é via sementes, o qual requer conhecimento dos fatores determinantes da qualidade da germinação objetivando-se promover o estabelecimento da cultura e elevar o nível de produção (COSTA et al., 2008). Porém, inúmeros trabalhos têm descrito a presença de dormência pós-colheita em vários cultivares de mamoeiro (VIGGIANO et al., 2000; TOKUHISA et al., 2007), o

que poderia ser fator limitante para a utilização de sementes como método propagativo.

A taxa de germinação do mamoeiro é frequentemente lenta e irregular, o que tem sido atribuído à ação de substâncias inibidoras de crescimento, atuando nas membranas das sementes, a externa, denominada arilo ou sarcotesta (envelope mucilaginoso), e a interna, esclerotesta (camada enrugada), envolvendo o tégmen (LANGE, 1961; GHERARDI & VALIO, 1976; CHOW & LIN, 1991).

Outra desvantagem observada pelos produtores que utilizam a propagação seminífera do mamoeiro é o aumento da desuniformidade na plantação, decorrente da segregação gênica. Além disso, a elevação dos custos iniciais da produção devido ao preço das sementes, algumas importadas - como o caso do híbrido Tainung 01 - e a necessidade do produtor lançar mão de três a quatro mudas por cova, para se obter preferencialmente plantas hermafroditas, uma vez que os frutos destas apresentam desejável padrão comercial.

A propagação vegetativa tem se mostrado excelente alternativa para viabilizar a produção dessa cultura de forma a obter baixos custos. Em relação à possibilidade da propagação assexuada do mamoeiro, trabalhos têm demonstrado ser possível via estaquia *ex vitro* (OLIVEIRA et al., 2007), enxertia *ex vitro* (ARAÚJO & YAMANISHI, 2003; GYORGY et al., 2004), estaquia *in vitro* (SCHMILDT et al., 2007; SCHMILDT et al., 2010) e cultura de tecidos (CASTILLO et al., 1998; CAI et al., 1999; YU et al., 2003; TEIXEIRA & TEIXEIRA, 2004; ASCENCIO-CABRAL et al., 2008).

Apesar das vantagens da propagação vegetativa, em larga escala, a estaquia e a enxertia não são métodos eficientes, principalmente devido ao baixo rendimento e dificuldade de enraizamento das estacas de algumas espécies.

Na enxertia, o método de garfagem empregado, o tipo de garfo e o seu diâmetro podem influenciar na percentagem de pegamento dos enxertos. Entretanto, a demanda de mão de obra qualificada para sua realização tem se tornado um empecilho para sua aplicação em escala comercial (ARAÚJO & YAMANISHI, 2003).

Com o desenvolvimento e aperfeiçoamento dos métodos de cultivo *in vitro*, a cultura de tecidos tem se firmado como ferramenta cada vez mais promissora, tanto na produção de clones com características superiores, livres de viroses e com sexo definido, quanto nos programas de melhoramento, podendo ser utilizada via organogênese ou embriogênese somática (CASTILLO et al., 1998).

O processo de enraizamento *in vitro* é bastante complexo, pois envolve uma gama de interações entre fatores internos (fisiológicos, bioquímicos e biológicos) e fatores externos. Além disso, o sucesso do enraizamento não depende unicamente do percentual de enraizamento obtido, mas também do número e da qualidade das raízes formadas (GEORGE et al., 2008).

Entretanto, alguns trabalhos relacionando o enraizamento em microestacas de mamoeiro têm mostrado algum sucesso, em que microestacas do híbrido Tainung 01, originadas do cultivo em meio MS suplementado com auxina, não necessitaram de complementação desse indutor para o processo de enraizamento *ex vitro*, uma vez que o desenvolvimento de raízes *in vitro* se mostrou bastante eficiente (OLIVEIRA et al., 2007).

A concentração de sacarose no meio de cultivo pode influenciar na percentagem, número e qualidade das raízes (SCHMILDT et al., 2007). Além disso, a concentração de indutores do tipo auxinas, como o ácido indol-3-butírico (AIB), também influencia na porcentagem e qualidade das raízes adventícias (SCHMILDT et al., 2010).

### **2.3 Embriogênese somática**

Outra aplicação da cultura de tecidos é a embriogênese somática, também denominada de embriogênese adventícia ou assexual. É, portanto, um processo pelo qual uma única célula ou pequeno grupo de células somáticas, incluindo células haplóides, a partir da percepção de sinais específicos, adquirem a competência para dividir-se e formar estruturas bipolares, que passam por estádios embriogênicos subsequentes característicos, podendo originar uma planta (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986; FEHÉR et al., 2003; FEHÉR, 2005; ROSE et al., 2010).

Ao se analisar as mudanças ultra-estruturais em calos de coco induzidos com 2,4-D, Verdeil et al. (2001) observaram que as células embriogênicas apresentam modificações características em nível do núcleo, citoplasma e parede celular. De acordo com os autores, é possível afirmar que condições semelhantes às gametofíticas, em termos de ambiente, são necessárias para induzir células

somáticas à embriogênese. Nesse caso, o aumento no nível de 2,4-D, em que pode agir como um sinal de estresse, induz um programa de reprodução embriogênica. Sob essas condições, as células poderiam passar por uma reprogramação genômica e mudanças citológicas similares às aquelas ocorridas durante a macrogametogênese em plantas.

O desenvolvimento da embriogênese zigótica e somática apresentam alto nível de similaridade, como a independência dos tecidos vizinhos, padrões bioquímicos, expressão de genes, acúmulo de RNAm e proteínas específicas, qualificando a embriogênese somática como modelo efetivo para os estudos em diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões (ZIMMERMANN, 1993).

Apesar dessas semelhanças, é possível traçar algumas diferenças, pois os embriões somáticos não entram em dormência, não estão envolvidos por endosperma, não possuem tecido suspensor nem são revestidos por tegumentos, além de apresentarem sistema vascular fechado, ou seja, sem conexão com os tecidos vasculares do explante inicial (ZIMMERMANN, 1993).

De acordo com Sharp et al. (1980), a embriogênese somática pode se iniciar de duas formas: embriogênese direta, em que os embriões se formam diretamente sobre o tecido vegetal, geralmente de células epidérmicas, sem a formação de calo, a partir de “células pré-embriogênicas determinadas”, que são programadas pela diferenciação embriogênica. E a segunda forma é a embriogênese indireta, a qual ocorre pela formação primária de um calo e os embriões são originados das “células embriogênicas induzidas”.

O emprego da embriogênese somática pode ter uma série de aplicações que vão desde a obtenção de um modelo de referência para estudos básicos em fisiologia e bioquímica, até a propagação clonal, visando à conservação e melhoramento genético das espécies (STEINER et al., 2008).

Comparando-se às demais técnicas de propagação *in vitro*, a embriogênese somática apresenta algumas vantagens: a) obtenção de grande quantidade de propágulos (embriões somáticos); b) permite alto grau de automatização, levando a redução dos custos por unidade produzida, através da utilização de biorreatores; c) os embriões somáticos podem ser produzidos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização e pureza genética; d) 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). 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).

Todo processo de embriogênese somática requer a indução de competência embriogênica, na qual, o método mais usual, consiste na exposição dos explantes a altas concentrações de auxina durante um período de tempo variável, dependendo da espécie ou mesmo do genótipo analisado, e então a transferência das células para um meio com baixa concentração ou mesmo livre de auxinas (BAJAJ, 1995).

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.

A fase de indução da embriogênese somática é provavelmente a etapa mais importante do processo, pois sua frequência pode ser influenciada pelas condições de cultivo (ALMEIDA et al., 2001; ASCENCIO-CABRAL et al., 2008; SUN et al., 2011; PINTO et al., 2011; ANANDAN et al., 2012), tecidos vegetais utilizados (ALMEIDA et al., 2001; FARZANA et al., 2008; SIMÕES et al., 2010), tipo de genótipo (MALABADI et al., 2011; PINTO et al., 2011) e níveis hormonais endógenos do explante (JIMÉNEZ, 2001).

Esta fase está relacionada com as alterações no padrão de expressão gênica dos explantes e reprogramação das células que estão envolvidas no processo embriogênico, culminando em mudança da determinação celular e capacidade de adquirir competência para a embriogênese. Ocorre, portanto, o estabelecimento da polaridade, a formação da camada protodérmica e dos demais meristemas (BOZHKOV et al., 2002).

De modo geral, as auxinas são a classe de substâncias responsáveis pelo processo de indução, culminando na desdiferenciação e rediferenciação das células dos explantes. Além disso, elas são essenciais para se alcançar a fase de formação de massas celulares pró-embriogênicas (MCPE).

Em relação à aquisição de competência embriogênica, uma hipótese recente afirma que apesar das células vegetais em geral terem a capacidade para embriogênese, a sua expressão é determinada por muitas circunstâncias, principalmente aquelas ligadas ao estado fisiológico das células, o qual é determinado por sua genética, condições de comportamento e também ambientais. Resumidamente, o potencial embriogênico determinado geneticamente pode permitir

a expressão da competência embriogênica sob condições apropriadas, em que irá iniciar o desenvolvimento dos embriões em resposta a um sinal específico somente naquelas células em que as condições fisiológicas são favoráveis. Essa complicada interação entre genética e fatores fisiológicos pode explicar por que somente certos genótipos, ou mesmo células, podem seguir pelo processo completo da embriogênese somática (FEHÉR, 2008).

Porém, para iniciar a via de organização embriogênica, há a necessidade de remoção das auxinas do meio. Isso sugere que a diminuição da concentração de auxina possa sinalizar para a inativação de alguns genes responsáveis pela presença de produtos inibidores, permitindo a embriogênese prosseguir (ZIMMERMAN, 1993). Apesar do processo de indução de embriões não estar completamente compreendido, acredita-se que a presença continuada de auxinas no meio cause uma mudança diferencial na expressão gênica associada provavelmente a demetilação do DNA (LOSCHIAVO, 1995).

A auxina mais utilizada descrita na literatura para embriogênese somática é o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), pois é rapidamente metabolizado, o que leva ao espessamento das paredes celulares e à diferenciação irreversível em embriões somáticos (VASIL, 1988). Além disso, parece ocorrer uma correlação positiva entre o nível endógeno de ácido indolacético (AIA) e a capacidade de resposta dos tratamentos com 2,4-D (IVANOVA et al., 1994).

O modo de ação o qual o 2,4-D induz a embriogênese somática ainda permanece incerto, porém esse regulador de crescimento poderia induzir o processo embriogênico através de sua forte atividade auxínica, influenciando direta ou indiretamente no metabolismo dos hormônios endógenos (JIMÉNEZ & THOMAS, 2005), ou ainda agir como substância estressante que levaria à formação de embriões somáticos, considerado por alguns autores como uma resposta de estresse extremo na cultura de células vegetais (FEHÉR et al., 2003; GAJ, 2004).

Porém, outras auxinas também já foram utilizadas para a indução de embriogênese somática em diversas espécies, como o ácido 4-clorofenoxiacético (4-CPA) (MOURA & MOTOIKE, 2009; RAMOS, 2011), ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) (FARZANA et al., 2008; SIMÕES et al., 2010), ácido 3,6-dicloroanísico (Dicamba) (RAMOS, 2011) e ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) (RENUKDAS et al., 2003; GARCIA et al., 2007; SIMÕES et al., 2010).



Aparentemente, as auxinas são responsáveis pelo estabelecimento da polaridade celular (apical/basal) a partir da primeira divisão assimétrica do embrião. A presença desse hormônio nessa fase é importante para mediar um transporte polar e para síntese de DNA (FUJIMURA & KOMAMINE, 1980). Porém, após a indução, o nível desse indutor deve ser reduzido para se criar um gradiente e estabelecer o desenvolvimento embriogênico.

Em mamoeiro, a utilização da auxina 2,4-D para a indução de embriogênese somática apresenta-se com grande frequência, porém há dificuldades em se estabelecer uma concentração ótima para a espécie, uma vez que há vários genótipos os quais respondem diferentemente ao indutor (CASTILLO et al., 1998; ALMEIDA et al., 2001; FERNANDO et al., 2001; RENUKDAS et al., 2003; YU et al., 2003; ASCENCIO-CABRAL et al., 2008; JATTANA et al., 2008; MALABADI et al., 2011; ANANDAN et al., 2012).

Foi observada grande variação nas respostas à indução embriogênica entre vários genótipos de mamoeiro quando utilizado meio contendo 2,4-D (4,52  $\mu$ M) em combinação com TDZ (2,27  $\mu$ M) (Tidiazuron), desde 2,0% para o cv. Co-1 até médias superiores a 80% para os cv. Coorg Honey Dew, Taiwan 785 e Taiwan 786 (MALABADI et al., 2011), demonstrando a dificuldade em se estabelecer um protocolo único para a espécie.

Além do 2,4-D, alguns autores já utilizaram outras auxinas em experimentos de embriogênese somática com mamoeiro, como ANA (CHEN et al., 1987; FARZANA et al., 2008) e Picloram (RENUKDAS et al., 2003), obtendo também respostas satisfatórias.

A utilização de duas auxinas (2,4-D e 4-CPA) em diversas concentrações, na ausência ou presença de duas citocininas (Zeatina e 2-iP), mostrou serem eficientes na resposta embriogênica a partir de sementes imaturas de goiabeira (*Psidium guajava* L.), porém com algumas diferenças. Enquanto o tratamento com 4-CPA obteve maior sucesso, desde a formação dos embriões até os estádios mais tardios, o 2,4-D somente levou à formação dos calos embriogênicos (MOURA & MOTOIKE, 2009).

Para a fase de indução de embriogênese somática para cana-de-açúcar, Ramos (2011) utilizou três auxinas (2,4-D, Dicamba e CPA) em quatro concentrações (5, 10, 15 e 20  $\mu$ M). Dentre os resultados, verificou-se que os tratamentos com 2,4-D resultaram em calos compactos com aspecto firme e de cor

amarelada a creme; com o Dicamba apresentou calos com aspecto mucilaginoso e com desenvolvimento de raízes, enquanto com o CPA ocorreu pouco calejamento, porém com o desenvolvimento de parte aérea.

Trabalhando também com cana-de-açúcar, Garcia et al. (2007) utilizaram Picloram, ANA e 2,4-D para a indução de embriogênese somática, porém obtiveram organogênese direta quando usaram ANA e a embriogênese somática em meio acrescentado de Picloram e 2,4-D. A partir desses exemplos, é possível perceber que diferentes auxinas possuem especificidades diferentes aos tecidos e conseqüentemente apresentam respostas diferentes, podendo apresentar variações na estrutura de calos ou mesmo na resposta e frequência de indução.

A resposta a determinado hormônio pode ser alterada por mudanças no número e afinidade dos receptores e pela interação e nível de outras substâncias endógenas (FIRN, 1986). Assim, o “estado fisiológico do embrião” seria a condição na qual as células responsivas do explante teriam grande número de receptores para os reguladores de crescimento presentes no meio. Então, a embriogênese somática é o resultado da ativação de células responsivas contendo receptores para determinado regulador de crescimento. Essas células seriam rediferenciadas para novas rotas morfogênicas, gerando células-mãe embrionárias competentes e que poderiam gerar populações clonais de células embriogênicas (GUERRA et al., 1999).

Apesar da importância fundamental das auxinas na indução de embriogênese somática, deve-se considerar de grande relevância o tipo de explante utilizado, uma vez que essa escolha pode ser afetada pelo potencial morfogênico particular de cada tecido, que é influenciado pelos seguintes aspectos: genótipo, grau e retenção da juvenildade, determinação existente nos meristemas, metabolismo oxidativo, condição fisiológica, estabilidade genética, dentre outras (ZIMMERNANN, 2010).

Diferenças anatômicas e fisiológicas entre os explantes podem influenciar nas respostas embriogênicas. Considerando isso, os níveis de hormônios endógenos devem ser considerados de grande importância, uma vez que eles regulam os processos de diferenciação dos explantes em cultivo (GRIEB et al., 1997). Dessa forma, a relação entre os hormônios endógenos e a competência embriogênica dos explantes pode ser a chave para a indução e expressão da embriogênese somática em diferentes genótipos ou explantes do mesmo genótipo

(MERKLE et al., 1995), apesar de ainda pouco elucidado na literatura. Além disso, as interações entre hormônios endógenos e reguladores de crescimento exógenos sobre a indução em diversos explantes podem gerar variações nas respostas.

Diversos tipos de explantes já foram testados para o desenvolvimento de embriões somáticos, como embriões zigóticos (ASCENCIO-CABRAL et al., 2008; FARZANA et al., 2008; LENIS-MANZANO et al., 2010; MACIEL et al., 2010; MALABADI et al., 2011; PINTO et al., 2011; ANANDAN et al., 2012; ROCHA et al., 2012), ápices caulinares (MAGALHÃES et al., 2006; SANÉ et al., 2006), folhas cotiledonares (ALMEIDA et al., 2001; TARRÉ et al., 2004; PORTO et al., 2010), sementes imaturas (MOURA & MOTOIKE, 2009), segmentos de hipocótilos (ALMEIDA et al., 2001; FARZANA et al., 2008; SANTANA-BUZZY et al., 2009; PORTO et al., 2010), segmentos radiculares (PORTO et al., 2010; YOU et al., 2011) e anteras (JAYASANKAR et al., 2003).

Em experimento de embriogênese somática em mamoeiro híbrido Tainung 01, com explantes do tipo hipocótilo com folhas cotiledonares totalmente expandidas; folhas cotiledonares sem a nervura central; epicótilo e secção de hipocótilo, a indução de calos teve melhor resultado utilizando hipocótilo com folhas cotiledonares e secção de hipocótilo. Porém, para a variável calos friáveis, não foi observada diferença significativa entre as médias de todos os explantes (ALMEIDA et al., 2001).

Após a indução, a fase de maturação na embriogênese somática refere-se ao estágio em que se estimula a progressão das fases iniciais dos embriões para as tardias. 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).

Nessa fase, o embrião acumula reservas de carboidratos, lipídios e proteínas, ocorre a desidratação e redução na respiração celular (TRIGIANO & GRAY, 1996). Sendo assim, o principal objetivo dessa etapa é obter embriões somáticos em estádios tardios do desenvolvimento (fase cotiledonar), porém sem a ocorrência de germinação precoce. Nesse caso, caracteriza-se pelo alongamento prematuro de células do hipocótilo e do ápice caulinar, antes ou mesmo durante o alongamento da radícula (MONNIER, 1995).

Se a germinação precoce for inibida e o processo de maturação prolongado, pode-se obter sincronismo no desenvolvimento dos embriões somáticos, revertendo em maior percentual de conversão de plântulas normais (SILVA, 2005).

O conhecimento dos processos e fatores que controlam a embriogênese zigótica facilita o entendimento de como proceder para reconstituir esses eventos durante a embriogênese somática. Grande esforço é desviado para a manipulação das fases de maturação e germinação, uma vez que são as etapas em que o processo de embriogênese somática é otimizado. Portanto, os meios de cultura são cuidadosamente preparados quanto aos tipos e concentrações de reguladores de crescimento, sendo os principais agentes de maturação: ácido abscísico (ABA), agentes osmóticos [polietilenoglicol (PEG), manitol, sacarose] e carvão ativado (CA) (LAKSHMANAN, 2006). Dessa forma, a utilização dessas substâncias ajuda na prevenção da germinação precoce, além de aumentar o sucesso no desenvolvimento normal dos embriões somáticos.

De acordo com Linacero et al. (2001), a fase de maturação do embrião é caracterizada pela perda de água, o que conduz à dessecação do embrião e início da dormência. Ainda nessa fase, os níveis de ABA aumentam consideravelmente, exercendo diversas funções, como inibir a germinação precoce, induzir a síntese de proteínas de reservas envolvidas na tolerância à desidratação e induzir a dormência.

Apesar de embriões somáticos não passarem por dessecação ou se tornarem dormentes, vários genes, que são preferencialmente expressos durante a dessecação do embrião zigótico, como os genes *lea*, também são expressos durante a embriogênese somática (LINACERO et al., 2001). O ABA parece ter forte influência sobre a expressão de proteínas LEAs (*late embryogenesis abundant*), as quais são acumuladas durante as fases finais da embriogênese (BLACKMAN et al., 1991).

A adição de ABA no meio de cultura para estimular o processo de maturação é amplamente utilizada para diversas espécies (FERNANDO & GAMAGE, 2000; MALABADI & STADEN, 2005; ANANDAN et al., 2012; KUMAR & THOMAS, 2012). 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. Assim, esse hormônio possui papel fundamental na histodiferenciação dos embriões somáticos durante essa fase, garantindo maior qualidade das plantas formadas (GUTMANN et al., 1996).

A maturação de embriões somáticos de mamoeiro cv. Co7 apresentou correlação positiva com o aumento da concentração de ABA em relação ao número médio de embriões cotiledonares formados, sendo que em meio MS sólido com concentração total de sais e na ausência de ABA apenas 13 embriões foram formados, enquanto a aplicação de  $10,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ABA resultou em mais de 70 embriões (ANANDAN et al., 2012).

Outra substância que potencializa as respostas de maturação da embriogênese somática é o carvão ativo (CA). Embora não seja um regulador de crescimento, o CA tem sido utilizado com muita frequência para regular a morfogênese *in vitro* (MOTOIKE et al., 2007; SILVA et al., 2009; MANCHANDA & GOSAL, 2012; ROCHA et al., 2012).

A utilização de CA no meio de maturação para embriões somáticos está relacionada à sua capacidade de adsorver substâncias inibitórias do crescimento e desenvolvimento vegetal como: reguladores de crescimento residuais, vitaminas, etileno e compostos fenólicos presentes no meio de cultura (PEREIRA et al., 2008; THOMAS, 2008). Além disso, o CA promove a estabilização do pH (OWEN et al., 1991).

Agentes osmóticos também são frequentes nos meios de maturação. Em alguns casos, faz-se a utilização de carboidratos, como a sacarose, porém, sua permanência em uma cultura prolongada pode ser absorvida e metabolizada pelas células dos calos, conduzindo a uma recuperação osmótica. Em contraste, o polietilenoglicol, por ser um agente não plasmolizante e não metabolizado, pode continuar a limitar a absorção de água e, desse modo, proporcionar o estresse por um prazo mais longo durante o desenvolvimento do embrião (ATTREE et al., 1995).

Por fim, após a maturação, os embriões são transferidos para meio de cultura com baixa concentração de auxina ou desprovidos de reguladores para que ocorra a conversão em plantas. O sucesso dessa etapa, a formação de plântulas normais, é dependendo da qualidade do processo de maturação.

## **2.4 Morfologia e histologia**

As técnicas de microscopia de luz e eletrônica têm tido grande aplicabilidade nos estudos de morfogênese *in vitro*, uma vez que auxiliam na interpretação dos resultados obtidos.

As análises histológicas podem ser utilizadas para caracterizar as alterações celulares, identificar estruturas monopolares ou bipolares, analisando a qualidade e desenvolvimento dessas estruturas, que em conjunto às análises morfológicas, permitem caracterizar a via de regeneração (SILVA, 2005).

Durante a fase de indução *in vitro*, as análises histológicas permitem a identificação das mudanças celulares. Quando as células do explante percebem o estímulo e iniciam o processo de desdiferenciação e competência celular, sua estrutura é alterada. Células embriogênicas são caracterizadas por serem pequenas, com citoplasma denso, nucléolo grande, pouco vacuoladas e pequenos grânulos de amido (MICHAUX-FERRIÈRE & SCHWENDIMAN, 1992). A partir dessas características é possível identificar as modificações ocorridas nos tecidos do explante e auxiliar na descoberta da origem da embriogênese somática.

A utilização de diferentes explantes, bem como a espécie e os reguladores de crescimento, exercem influência nas alterações morfológicas ocorridas durante a indução embriogênica. As primeiras divisões celulares para a formação de embriões somáticos já foram descritas na epiderme (RAMOS, 2011), mesofilo (ROCHA et al., 2012), protoderme (SILVA et al., 2009), meristema fundamental (FERNANDO et al., 2001), procâmbio (KOEHLER, 2004; SANÉ et al., 2006; SANTANA-BUZZY et al., 2009).

Em segmentos foliares de cana-de-açúcar induzidos com 2,4-D (20  $\mu\text{M}$ ), o intumescimento dos explantes ocorreu já no 2º dia após a indução, ocorrendo divisões celulares no sentido anticlinal nas epidermes inferiores e superiores, caracterizadas por nucléolo denso, alta razão núcleo/citoplasma e parede celular fina (RAMOS, 2011).

Em *Passiflora cincinnata*, o padrão embriogênico primário teve início na superfície abaxial dos cotilédones dos embriões zigóticos, em meio com 2,4-D (18,1  $\mu\text{M}$ ) + 6-BA (4,5  $\mu\text{M}$ ). Após o 4º dia de indução, foram observadas células epidérmicas isodiamétricas e divisões periclinais nas células do parênquima. Em seguida, verificaram-se padrões aleatórios de divisões anticlinais tanto na epiderme quando no mesofilo, assumindo uma forma colunar e polarizada (ROCHA et al., (2012).

As análises histológicas de embriões zigóticos de *Carica papaya* L. cv. Sunrise Solo, em meio com 2,4-D ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) evidenciaram que as primeiras divisões celulares foram localizadas no meristema fundamental, próximo ao procâmbio, ao longo do eixo embrionário. Somente após oito dias de cultura é que foi observada a proliferação da área celular na região cotiledonar. Nesta fase, foi possível verificar a presença de células pequenas com citoplasma denso, características de células embriogênicas (FERNANDO et al., 2001).

De forma semelhante, Koehler (2004), utilizando embriões zigóticos de *C. papaya* L. cv. Improved Sunrise Solo Line 72/12, nas mesmas condições de cultivo, verificaram que as primeiras divisões celulares foram observadas no 3º dia e nos tecidos próximos ao procâmbio, ao longo do eixo-embrionário. Já no 5º dia, as divisões periclinais se direcionavam para a periferia.

Em ambas as análises histológicas da embriogênese de mamoeiro descritas acima, os autores verificaram que, após as fases iniciais de modificações celulares, os primeiros embriões seriam originados de um processo direto a partir de células protodérmicas e subepidérmicas no domo apical dos embriões zigóticos. Os demais embriões surgiriam de forma indireta a partir de células superficiais de complexos embriogênicos, na periferia do calo.

Os estudos histológicos aplicados à embriogênese somática são importantes para a confirmação das técnicas morfogênicas adotadas, bem como para a determinação dos tipos celulares a partir dos quais os embriões se originam.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A germinação de sementes *in vitro* para a obtenção de explantes e a embriogênese somática foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal no Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), localizado no *Campus* Universitário, São Mateus-ES, nas coordenadas geográficas 18° 40' de latitude sul e 39° 51' de longitude oeste.

#### 3.1 Material vegetal e germinação *in vitro*

As sementes foram retiradas de frutos de mamoeiro seleção THB em estágio cinco de maturação, quando mais de 75% da superfície do fruto está com coloração amarela, e a remoção da sarcotesta feita por meio de cal hidratada e fricção em peneira de polipropileno e lavadas em água corrente com detergente neutro. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram imersas em álcool 70% por um minuto, seguida de solução de hipoclorito de sódio comercial (2,5%) (Teiú<sup>®</sup>, Brasil), com a adição de três gotas de Tween-20<sup>®</sup>, durante 15 minutos e, ao final, tratadas com peróxido de hidrogênio a 50% por 10 minutos. No intervalo de cada tratamento, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada autoclavada.

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) concentração total de



sais, mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) e ágar-ágar ( $8 \text{ g L}^{-1}$ ), pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da adição do ágar. As culturas foram mantidas em estufa incubadora com fotoperíodo de 12 horas e temperatura alternada  $20\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após o rompimento do tegumento e início da protrusão da raiz primária, as sementes foram colocadas no escuro, mantendo a alternância da temperatura.

### **3.2 Indução de embriogênese somática**

Em câmara de fluxo laminar, os ápices caulinares (AP) e folhas cotiledonares (FC), extraídos de plântulas cultivadas *in vitro* com idade de 30 dias, foram inoculados em placas de Petri de poliestireno  $90 \times 15 \text{ mm}$  (Global Trade Technology, Brasil), contendo meio de indução (MI) de embriogênese somática formado pelo meio MS concentração total de sais, mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), Phytigel<sup>®</sup> ( $2,8 \text{ g L}^{-1}$ ) e suplementado com auxinas. Os indutores utilizados foram as 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  $31 \text{ } \mu\text{M}$ ). O MI teve o pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da adição do Phytigel<sup>®</sup>.

Após a inoculação dos explantes, as placas de Petri foram vedadas com filme plástico PVC (Goodyear, Brasil) e envolvidas com papel laminado para impedir a passagem de luz, sendo mantidas em estufa incubadora a  $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  por 50 dias. Foram avaliadas a calogênese (%), calo embriogênico (%), número médio de embriões somáticos (ES), frequência de ES por calo e média dos tipos de ES (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar).

### **3.3 Maturação dos embriões somáticos**

Após 50 dias no MI, os calos foram submetidos ao teste de potencialidade celular (DURZAN, 1988) que, juntamente com as análises estatísticas, permitiram

selecionar os calos embriogênicos da melhor concentração, que em seguida foram transferidos para os meios de maturação (MM): MI sem reguladores de crescimento (RC); MI + ABA - ácido abscísico (0,5  $\mu\text{M}$ ); MI + ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) + CA - carvão ativo (15 g L<sup>-1</sup>); MI + ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) + CA (30 g L<sup>-1</sup>) e MI + ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) + PEG – polietilenoglicol 6000 (60 g L<sup>-1</sup>). Todos os meios foram vertidos em placas de Petri estéreis de poliestireno 90 x 15 m, vedadas com filme plástico PVC e mantidas em câmara incubadora com fotoperíodo de 12 horas e temperatura a  $27 \pm 1$  °C, por 30 dias. Foram avaliadas a frequência de ES (ES calo<sup>-1</sup>) e ES germinados (%).

### 3.4 Preparação das amostras para microscopia

Para a caracterização anatômica e ultraestrutural do processo de embriogênese somática, folhas cotiledonares de *Carica papaya* L. foram coletadas nos dias 1, 2, 7, 14, 21, 28, 35, 50 em meio de indução, além do controle (sem indução), e amostras de pós-maturação. As amostras foram compostas apenas por tratamentos com 4-CPA (25  $\mu\text{M}$ ), uma vez que em MI as respostas embriogênicas foram satisfatórias nesse tratamento. A fixação foi feita em solução Karnovsky [glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4,0%) em tampão fosfato de potássio monobásico 0,1 M (pH 7,2) e 5 mM de cloreto de cálcio] (KARNOVSKY, 1965).

### 3.5 Microscopia de luz

Para os estudos anatômicos, as amostras foram desidratadas em uma série etílica e embebidas em metacrilato (Historesin<sup>®</sup>, Leica). Os cortes transversais e longitudinais (espessura de 5  $\mu\text{m}$ ) foram obtidos com um micrótomo de rotação automática (RM2155, Leica), equipado com navalha de vidro descartável, e corados com azul de toluidina em pH 4,0 (O'BRIEN & McCULLY, 1981), por 15 minutos. As lâminas foram montadas em resina sintética (Permound<sup>®</sup>). A análise e

fotodocumentação foram realizadas em microscópio de luz (Olympus-AX 70) acoplado a um sistema de fotomicrografia (Olympus U-Photo) do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa.

### **3.6 Microscopia eletrônica de varredura**

As amostras fixadas foram desidratadas em série etílica até álcool absoluto e feita a secagem em ponto crítico com CO<sub>2</sub> (Autosamdri 815, Tousimis<sup>®</sup>), colocadas em “stubs” e submetidas à deposição metálica com ouro, pelo processo de pulverização catódica (Desk V, Denton Vacuum<sup>®</sup>). As análises e fotodocumentação foram conduzidas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (JSM – 6610LV, Jeol<sup>®</sup>) e todas as imagens foram digitalmente processadas. As análises foram feitas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, da Universidade Federal do Espírito Santo.

### **3.7 Análise estatística**

A fase de indução foi realizada em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 5, considerando duas análises de acordo com o tipo de auxina, totalizando 10 tratamentos cada. Utilizaram-se dois tipos de explantes (ápice caulinar - AP e folha cotiledonar - FC) e cinco concentrações de 4-CPA (19; 22; 25; 28 e 31 µM) ou cinco concentrações de 2,4-D (6; 9; 12; 15 e 18 µM), com quatro repetições formadas de três placas contendo cinco explantes cada.

A fase de maturação foi realizada em DIC, sendo feita a maturação apenas de calos provenientes de explantes de folha cotiledonar utilizando 4-CPA (25 µM). Os tratamentos foram realizados com cinco repetições formadas de três placas de Petri contendo cinco calos embriogênicos (10 mm<sup>2</sup>) cada.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade e análise de regressão, com o auxílio do Programa GENES (CRUZ, 2008).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Indução de embriogênese somática

Na indução de embriogênese somática com 2,4-D houve diferença significativa em nível de 1% de probabilidade entre as médias dos tipos de explantes para todas as variáveis analisadas, a exceção da calogênese e embriões cotiledonares. Nenhuma das variáveis foi afetada pelo fator concentração ou pela interação entre concentração e tipo de explante.

De forma contrária aos resultados aqui apresentados, para o híbrido Tainung 01, Almeida et al. (2001) verificaram que em meio de indução com 2,4-D (2,0 ou 10,0 mg L<sup>-1</sup>), houve diferença significativa entre as médias para calogênese, porém para calos embriogênicos não houve diferença significativa entre as médias para explantes. Na indução de embriões zigóticos do mamoeiro cv. Co-7, houve diferença significativa entre as médias em relação à concentração de 2,4-D (ANANDAN et al., 2012).

Com a utilização de ápice caulinar de mamoeiro seleção THB em meio com 2,4-D, houve baixa porcentagem (10%) de calos embriogênicos. Porém, com a utilização de folhas cotiledonares, 61,99% dos explantes tornaram-se embriogênicos, desconsiderando as diferentes concentrações da auxina. A mesma discrepância é observada para as variáveis número médio e frequência de embriões somáticos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Indução *in vitro* dos explantes ápices caulinares (AP) e folhas cotiledonares (FC) do mamoeiro seleção THB em meio MS suplementado com 2,4-D sobre a formação de calos, calos embriogênicos, número e frequência de ES calo<sup>-1</sup>, após 50 dias de cultivo

Explantes	Calogênese (%)	Calo embriogênico (%)	Número médio de ES	Frequência (ES calo <sup>-1</sup> )
AP	98,32 a*	10,00 b	0,55 b	0,04 b
FC	98,99 a	61,99 a	18,15 a	1,21 a
DMS	1,85	4,27	5,85	0,39

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A indução de folhas cotiledonares em meio com 2,4-D (2,0 ou 10 mg L<sup>-1</sup>) em mamoeiro híbrido Tainung 01 obteve-se média de 41,7% para calos embriogênicos (ALMEIDA et al., 2001), sendo inferiores aos resultados do presente trabalho. Dessa forma, provavelmente o mamoeiro seleção THB apresenta maior competência embriogênica quando comparado com o híbrido Tainung 01.

Na indução de embriões zigóticos do mamoeiro cv. Co-7, houve diferença significativa em relação à concentração de 2,4-D, em que os melhores resultados foram alcançados com 2,0 mg L<sup>-1</sup> para calogênese (87,11%), calos embriogênicos (75,12%) e embriões somáticos por calo (65,22) (ANANDAN et al., 2012).

A porcentagem de embriogênese somática quando utilizados embriões imaturos (90-115 dias após a antese) ou embriões maduros (130-145 dias após a antese), em meio com 2,4-D (9,05 µM), apresentaram respostas diferentes em ambos os mamoeiros cvs. Honey Dew e Washington, sendo que em embriões imaturos obtiveram-se médias superiores a 90%, enquanto em embriões maduros as médias não ultrapassaram 23% (RENUKDAS et al., 2006).

No presente trabalho, ao utilizar 4-CPA, verificou-se interação significativa em nível de 1% entre as médias para os fatores tipo de explante e concentração da auxina nas variáveis número, frequência e embriões do tipo globular, cordiforme e torpedo. Para a variável calo embriogênico, apesar da interação não significativa, houve diferença em nível de 1% entre as médias para os fatores concentração e fonte de explante. Para ES do tipo cotiledonar, houve diferença significativa apenas para médias de tipo de explante. Não houve diferença significativa entre as médias sob o efeito de tipo de explante, concentração de 4-CPA ou de sua interação para a variável calogênese.

O 4-CPA, em qualquer concentração para folha cotiledonar, a percentagem de calo embriogênico foi maior que 65% (19  $\mu\text{M}$ ), podendo atingir 91,67% (25  $\mu\text{M}$ ), médias muito superiores ao explante ápice caulinar, a qual não ultrapassou 10%, quando utilizada a concentração de 25  $\mu\text{M}$ . De forma semelhante, para as variáveis número e frequência de embriões somáticos as médias foram superiores quando utilizada folha cotiledonar (Tabela 2). O uso de 4-CPA para embriogênese somática de mamoeiro ainda não foi relatada na literatura.

**Tabela 2.** Indução *in vitro* dos explantes ápices caulinares (AP) e folhas cotiledonares (FC) do mamoeiro seleção THB, em meio MS suplementado com 4-CPA sobre a formação de calos, calos embriogênicos, número e frequência de embriões somáticos (ES), após 50 dias de cultivo

Características	Explantes	4-CPA ( $\mu\text{M}$ )				
		19	22	25	28	31
Calogênese (%)	AP	96,65 a*	100,00 a	100,00 a	91,67 a	93,35 a
	FC	91,65 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	90,00 a
DMS		11,05				
Calos embriogênicos (%)	AP	3,35 b	1,67 b	10,00 b	9,97 b	6,67 b
	FC	65,02 a	78,32 a	91,67 a	83,32 a	71,67 a
DMS		13,36				
Número médio de ES	AP	0,25 b	0,00 b	3,35 b	0,75 b	2,25 b
	FC	21,00 a	34,75 a	65,75 a	44,00 a	18,75 a
DMS		14,47				
Frequência (ES calo <sup>-1</sup> )	AP	0,02 b	0,00 b	0,21 b	0,05 b	0,15 b
	FC	1,40 a	2,31 a	4,38 a	2,93 a	1,25 a
DMS		0,96				

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna para cada característica não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

As diferenças observadas no presente trabalho entre os tipos de explantes para a competência embriogênica podem estar relacionadas às mudanças na sensibilidade das células dos diferentes tecidos em responder aos estímulos, a qual pode ser influenciada pela presença de outras substâncias endógenas (GUERRA et al., 1999), como fitormônios (JIMÉNEZ et al., 2001) ou mesmo no número de receptores sensíveis às auxinas presentes na membrana plasmática das células (LOSCHIAVO et al., 1991).

A análise de regressão das médias das respostas de indução com a utilização de 4-CPA mostrou, para folhas cotiledonares um efeito quadrático (Figura 1), o qual pode estar relacionado ao padrão de indução das auxinas quando aplicadas em órgãos isolados da planta, como indicado por Taiz & Zeiger (2009), em que a resposta aumenta até um ponto máximo.

Para o mamoeiro seleção THB, o ponto máximo é próximo a 25  $\mu\text{M}$  para todas as variáveis, sendo que após esse ponto, as respostas tendem a diminuir com o aumento da concentração da auxina (Figura 1). Para as variáveis número e frequência de embriões somáticos, em que houve interação significativa entre as médias dos explantes e das concentrações de 4-CPA, não houve adequação de modelo para as médias de ápice caulinar. Dessa forma, apenas as curvas de regressão para folha cotiledonar foram expostas nas Figuras 1B e 1C.

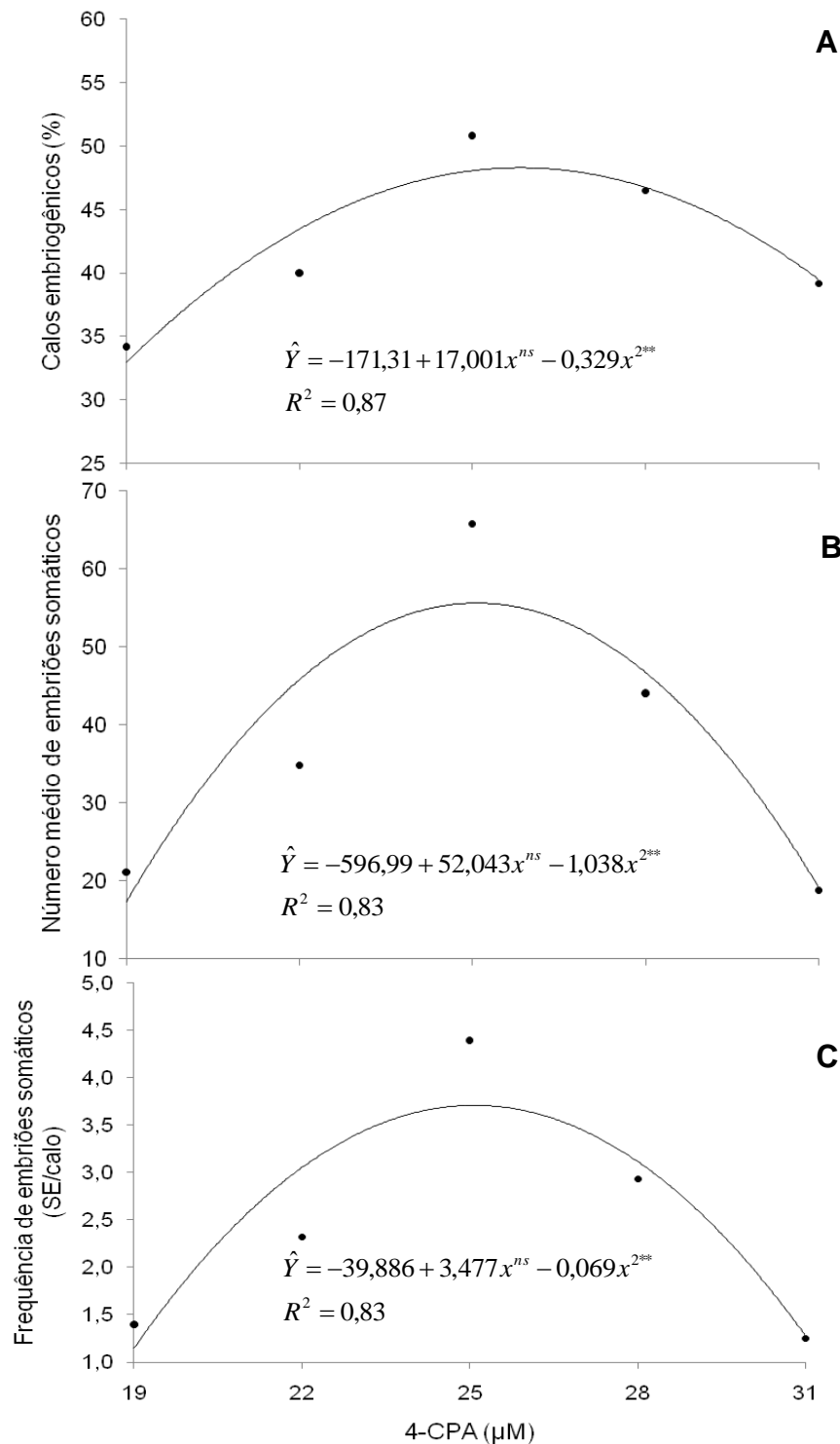
Para calo embriogênico, o qual não houve interação significativa entre as médias, a curva expressa na Figura 1A refere-se à média de ambos os explantes, sendo o maior valor estimado (48,32%) alcançado quando se utilizou a concentração de 25,84  $\mu\text{M}$ . A utilização de concentrações maiores que essa ocasionou a queda na porcentagem de calos embriogênicos.

Ao utilizarem embriões zigóticos de mamoeiro cv. Co7 em meio com 2,4-D, na concentração de 2,0  $\text{mg L}^{-1}$  houve o máximo percentual de indução de calos embriogênicos (75,12%) (ANANDAN et al., 2012).

Ao contrário dos resultados encontrados no presente trabalho, geralmente o 2,4-D apresenta respostas superiores ao 4-CPA na indução de embriogênese somática em outras espécies, como vinca (*Catharanthus roseus*) (JUNAID et al., 2007), trigo (*Triticum vulgare* Vill) (MIROSHNICHENKO et al., 2009) e tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) (ASLAM et al., 2011).

Para número médio de ES, o maior valor estimado utilizando FC (55,34) é alcançado para a concentração de 25,07  $\mu\text{M}$  (Figura 1B). Para essa variável, foram considerados todos os embriões somáticos identificados em todas as fases de desenvolvimento, desde globular até cotiledonar. A utilização de concentrações maiores que 25  $\mu\text{M}$  ocasionaram a diminuição do número médio de embriões somáticos em meio de indução.





**Figura 1.** Percentagem de calos embriogênicos (A) para tipo de explante (ápice caulinar e folha cotiledonar), número médio de embriões somáticos (B) e frequência de embriões somáticos por calo (C), ambos para folhas cotiledonares, do mamoeiro seleção THB em meio de indução com diferentes concentrações de 4-CPA (19; 22; 25; 28 e 31  $\mu\text{M}$ ), após 50 dias. \*\*Significativo em nível de 1% de probabilidade, pelo teste F; <sup>ns</sup>Não significativo.

Em meio líquido contendo 2,4-D (10  $\mu\text{M}$ ) para a indução de embriões somáticos de mamoeiro cv. Solo foi possível obter uma média superior a 300 embriões por calo (CASTILLO et al., 1998). Kumar & Kumari (2011) induzindo hipocótilo de *Carthamus tinctorius* L. em meio sólido contendo 2,4-D (1,0  $\text{mg L}^{-1}$ ) + ANA (0,5  $\text{mg L}^{-1}$ ) + CPA (0,5  $\text{mg L}^{-1}$ ) e TDZ (1,0  $\text{mg L}^{-1}$ ) alcançaram média de 80 ES por calo.

A embriogênese somática em mamoeiro cv. Sunrise e Solo apresentou, respectivamente, médias de 2,0 e 12 ES grama<sup>-1</sup> de massa fresca, quando induzidos em meio com 2,4-D (4,52  $\mu\text{M}$ ) + TDZ (2,27  $\mu\text{M}$ ), sendo considerados valores baixos, de acordo com Malabadi et al. (2011).

Para frequência de ES, o maior valor estimado (3,91) é alcançado quando se utiliza a concentração de 25,19  $\mu\text{M}$  de 4-CPA (Figura 1C). Apesar da baixa formação de embriões estes são aceitáveis considerando que o meio é de indução e, que estas respostas sugerem a possibilidade de transferência dos calos embriogênicos para meio de maturação. A utilização de concentrações maiores que essa ocasionou a diminuição na frequência de embriões somáticos.

A frequência de embriões somáticos por calo apresentou variação significativa de acordo com a concentração de 2,4-D utilizada por Anandan et al. (2012) com embriões zigóticos, em que o melhor resultado foi obtido com a concentração de 2  $\text{mg L}^{-1}$  (superior a 65 ES calo<sup>-1</sup>), e as menores médias com concentrações acima de 10  $\text{mg L}^{-1}$  (6,40 a 9,65 ES calo<sup>-1</sup>).

As auxinas estão envolvidas na regulação do ciclo celular e diferenciação, com importância na embriogênese somática em inúmeras espécies (JIMÉNEZ, 2005; CAPELO et al., 2011; ROCHA et al., 2012).

Na análise da embriogênese somática direta, utilizando embrião zigótico imaturo de *Arabidopsis thaliana*, Kurczynska et al. (2007) observaram forte acúmulo de auxina na protoderme dos cotilédones, local de origem dos embriões somáticos, correlacionando com as observações histológicas dos padrões de divisão celular. Dessa forma, os autores concluíram que a atividade das auxinas é um dos principais fatores de sinalização para a competência embriogênica nessa espécie vegetal.

Para a espécie *Carica papaya* L., utiliza-se principalmente o 2,4-D como indutor na embriogênese somática e não há consenso quanto a concentração ótima, ocorrendo enorme variação entre os genótipos (ALMEIDA et al., 2001; SAHA et al., 2004; ASCENCIO-CABRAL et al., 2008; JATTANA et al., 2008; SUN et al., 2011;

ANANDAN et al., 2012). Apesar da inexistência de trabalhos com o uso de 4-CPA na embriogênese em mamoeiro, essa auxina tem sido utilizada em outras espécies como *Pisum sativum* (LOISEAU et al., 1995); *Rosa* sp. (KINTZIOS et al., 1999); *Psidium guajava* (MOURA & MOTOIKE, 2009).

As auxinas 4-CPA e 2,4-D são sintéticas com atividade herbicida e pertencentes ao grupo clorofenoxiacético, diferindo apenas pela ausência de um átomo de cloro na posição do carbono 2 do anel fenóxi em 4-CPA. Apesar das vias de interação dos herbicidas auxínicos com o tecido vegetal não estarem totalmente esclarecidas, é possível observar que, apesar de estruturalmente pouco diferentes, biologicamente as respostas são distintas.

A resposta induzida por um regulador de crescimento na embriogênese somática está relacionada à sua sensibilidade, a qual é proporcional ao número de receptores presentes na superfície celular e diferente de acordo com o tecido analisado (LOSCHIAVO et al., 1991). A ação das auxinas está relacionada com a desdiferenciação e rediferenciação, alterando a determinação e conferindo novas competências às células denominadas responsivas (GUERRA et al., 1999). Estas células, sensíveis a indutores, são caracterizadas pela presença de receptores que se ligam ao hormônio e subsequentemente iniciam a resposta.

Em um estudo sobre a resposta embriogênica em plantas de centeio comparando-se diferentes formas modificadas da cadeia de ácido fenóxi, tendo o 2,4-D como controle, foi observado que pequenas modificações no tamanho da cadeia reta de carbonos ou mesmo na estrutura do anel fenóxi provocou enormes variações na indução embriogênica (STUART & McCALL, 1992). Essa análise evidencia a especificidade dos receptores de membrana, os quais podem apresentar diferenças na afinidade das moléculas.

Até o momento, não foi relatada a existência de um receptor protéico específico para 2,4-D (CHINALIA et al., 2007), mas é provável que o acoplamento e reconhecimento dessa molécula aconteça por meio de receptores específicos para auxinas endógenas, como ácido indol 3-acético (AIA) (LOSCHIAVO et al., 1991).

Acredita-se que o regulador de crescimento não exerça influência apenas por meio de sua concentração, mas também por alterações na sensibilidade das células responsivas. Estas estão diretamente envolvidas com o número e afinidade dos receptores, bem como no nível de outras substâncias endógenas (FIRN, 1986).

Na indução embriogênica do mamoeiro seleção THB foram observadas diferenças na estrutura dos calos entre os tipos de explantes utilizados, ápice caulinar e folha cotiledonar (Figura 2A e 2B). Para o uso de ápice caulinar, ambas as auxinas induziram a formação de calos pequenos, compactos e não friáveis, de coloração bege claro e geralmente com aspecto esponjoso. Para folha cotiledonar, com o uso de 2,4-D, observou-se estruturas com aspecto esponjoso recobrimdo parte da superfície, além do tamanho ser menor quando comparado com os calos induzidos por 4-CPA. Porém, em ambos os casos, os calos eram compactos com regiões friáveis, aspecto brilhante e de cor amarela.

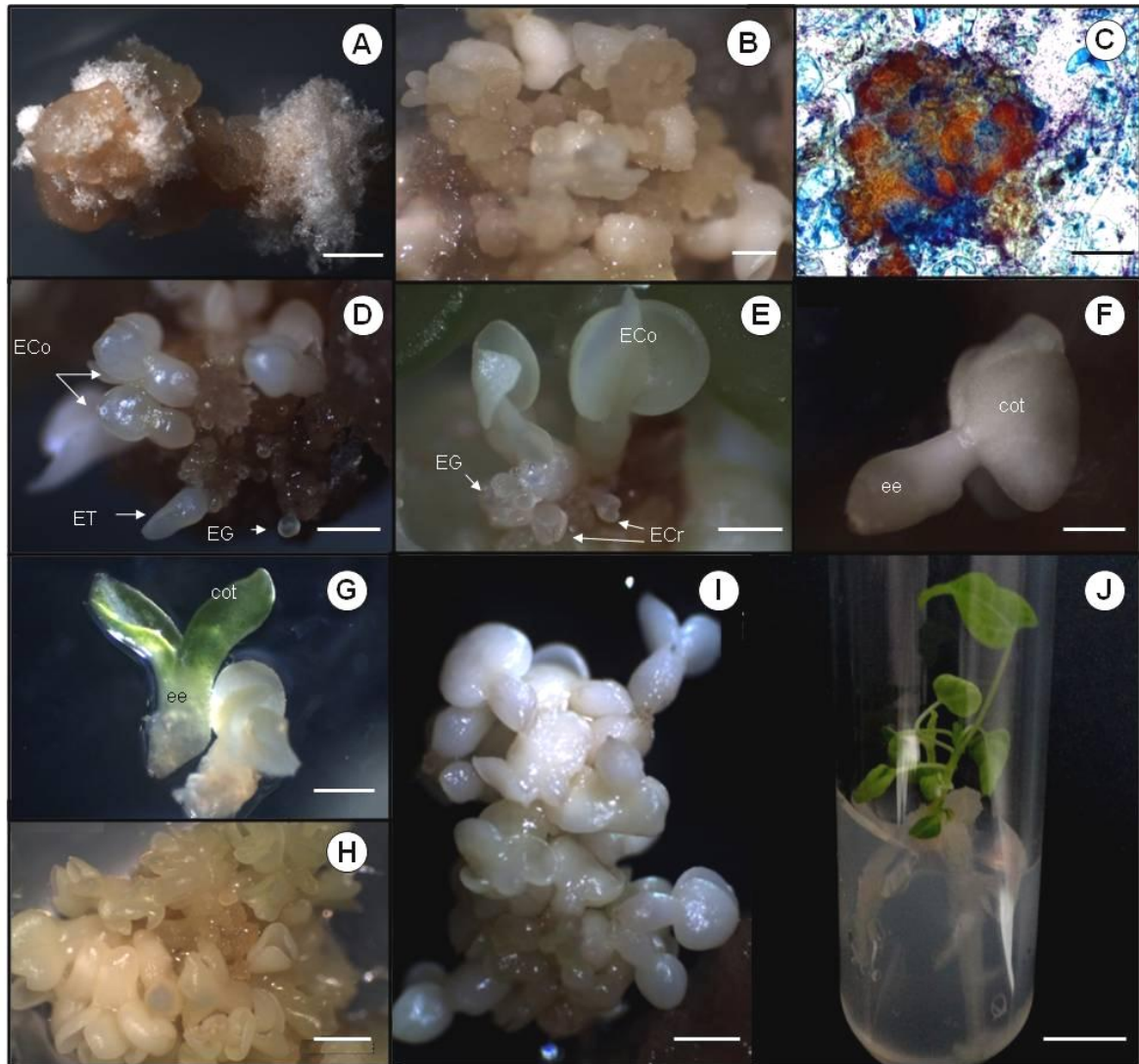
Na goiabeira cv. Paluma, sementes imaturas tratadas com 2,4-D ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 2-iP ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), durante a germinação do embrião zigótico, apresentaram a formação de calos mais rápida, sendo estes com coloração amarelada, porém a frequência de indução embriogênica foi baixa (7%). Já para o tratamento com CPA ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), houve a formação de embriões somáticos diretamente (20%) ou por meio de calos (7%) com coloração branca leitosa. Além disso, também foram detectados embriões secundários no tratamento com CPA ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) (MOURA & MOTOIKE, 2009).

Considerando a similaridade estrutural entre o 2,4-D e 4-CPA, provavelmente ambos seriam reconhecidos pela mesma classe de receptores, porém, devido às diferenças estatísticas e na estrutura dos calos (Figura 2) observados neste trabalho, é possível que o 4-CPA apresente maior afinidade pelos receptores, uma vez que foi observado ocorrer diferença estatística com a variação da concentração dessa auxina, fato não observado para 2,4-D.

A utilização de CPA ( $53,5 \text{ } \mu\text{M}$ ) em combinação com cinetina ( $4,6 \text{ } \mu\text{M}$ ) em meio de indução com folhas cotiledonares de roseira cv. Soraya foi satisfatória para a formação de embriões somáticos, enquanto usando outros indutores (AIB, ANA e 2,4-D) não houve resposta embriogênica (KINTZIOS et al., 1999).

A formação de calos embriogênicos durante a fase de indução é uma característica importante, pois indica o sucesso potencial do tecido vegetal para a formação de embriões somáticos na maturação. A utilização do teste de potencialidade celular (DURZAN, 1988) baseia-se na diferenciação de células embriogênicas, indicadas pela coloração vermelha do carmin-acético; das células suspensoras, indicadas pela coloração azul, devido sua alta permeabilidade ao azul de Evans, podendo facilitar a identificação e a seleção de agregados embriogênicos

durante a formação dos calos. Esse teste confirmou os dois tipos distintos de células no presente trabalho (Figura 2C). O carmin-acético já foi utilizado com sucesso para a diferenciação de populações de células embriogênicas das não-embriogênicas em *Passiflora* (SILVA et al., 2009; PINTO et al., 2011).



**Figura 2.** Embriogênese somática em mamoeiro seleção THB. (A) Calo não embriogênico de ápice caulinar induzido com 4-CPA (25  $\mu\text{M}$ ). (B) Calo embriogênico de folha cotiledonar induzido com 4-CPA (25  $\mu\text{M}$ ). (C) Teste de potencialidade celular em calo induzido com 4-CPA (25  $\mu\text{M}$ ). (D, E) Embriões somáticos (ES) em diferentes estádios de desenvolvimento. (F, G) Embrião cotiledonar maduro e normal com diferenciação dos cotilédones e eixo embrionário. ES em meio de maturação: (H) ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) + CA (15  $\text{g L}^{-1}$ ); (I) ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) + PEG (60  $\text{g L}^{-1}$ ). (J) Plântula normal originada da embriogênese somática. *Abreviações:* cot. cotilédones; ee. eixo embrionário; ECo. embrião somático cotiledonar; ECr. embrião somático cordiforme; EG. embrião somático globular; ET. embrião somático torpedo. Barra = 2,0 mm (A, B, H); 0,5 mm (D, E, F); 1,0 mm (G, I); 10  $\mu\text{m}$  (C); 10,0 mm (J).

Outro fator de grande influência sobre as respostas embriogênicas é o tipo de explante. É possível observar, à exceção da variável calogênese, a superioridade das médias quando utilizadas folhas cotiledonares (Tabelas 1 e 2).

O tipo de explante utilizado para a embriogênese somática tem grande relevância sobre as respostas obtidas, por isso sua escolha deve considerar alguns aspectos como grau e retenção da juvenildade, determinação existente nos meristemas, metabolismo oxidativo, condição fisiológica, estabilidade genética, dentre outras (ZIMMERNANN, 2010).

Em mamoeiro é frequente a utilização de embriões zigóticos (FERNANDO et al., 2001; ASCENCIO-CABRAL et al., 2008; FARZANA et al., 2008; MALABADI et al., 2011; ANANDAN et al., 2012) e folhas cotiledonares (ALMEIDA et al., 2001; FARZANA et al., 2008; HOMHUANA et al., 2008; JATTANA et al., 2008) na indução de embriogênese somática.

A baixa resposta embriogênica observada nos explantes AP pode estar relacionada à presença do meristema apical do caule, principal local de síntese de auxinas que, somadas a aplicação exógena desse indutor a órgãos isolados de uma planta, pode ter induzido um efeito inibitório (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Uma hipótese postulada por Bell et al. (1993), é que o processo de embriogênese somática seria uma resposta à senescência do tecido vegetal, uma vez que houve aumento da embriogênese ao induzirem explantes foliares de *Dactylis glomerata* em meio com Dicamba (30  $\mu$ M) e em seguida com ABA (0,01 a 10  $\mu$ M) por 3 dias. Considerando que o ABA é um hormônio sinalizador para a senescência na planta, e a ação positiva para a embriogênese somática dessa espécie, os autores acreditam haver correlação entre a senescência e o processo embriogênico.

A embriogênese somática pode ser considerada um exemplo de reações da planta relacionada a uma situação de estresse e a adição de 2,4-D é um estresse químico, uma vez que as alterações bioquímicas e moleculares são semelhantes a outros estresses, como o salino e hídrico (ZAVATTIERI et al., 2010).

Analisando-se as diferenças obtidas para o mamoeiro seleção THB em relação aos tipos de explante, tanto para 2,4-D quanto para 4-CPA, é possível fazer uma relação com a hipótese descrita acima, uma vez que o ápice caulinar, por conter o meristema apical, é uma região em constante divisão celular e em processo

de diferenciação, portanto muito jovem fisiologicamente. Essa juvenildade é definida com base nos níveis de hormônios endógenos dos tecidos, portanto o ápice caulinar deve conter níveis altos de citocinina e auxina, porém níveis baixos de ABA e etileno. Dessa forma, de acordo com a hipótese acima, isso poderia explicar a baixa resposta de embriogênese somática para o ápice caulinar. De forma contrária, a folha cotiledonar, assim que é destacada da plântula, entra em processo de senescência, diminuindo os níveis de citocinina e auxinas, e elevando os de ABA e etileno.

Entretanto, em ápice caulinar de ervilha, Loiseau et al. (1995) conseguiram percentagens elevadas de calo embriogênico ao utilizar 4-CPA (22,5  $\mu\text{M}$  - 78,3% e 45  $\mu\text{M}$  - 98,3%). No uso de 2,4-D, os autores obtiveram médias similares, porém em concentrações 10 vezes menores: 2,5  $\mu\text{M}$  (86,4%) e 4,5  $\mu\text{M}$  (98,3%). De acordo com os autores, indica-se a utilização do meio de indução contendo 4-CPA (45  $\mu\text{M}$ ), uma vez que mostrou ser mais eficiente no processo de conversão das plantas.

Em cultura de células de anis (*Pimpinella anisum* L.), em meio de indução com 2,4-D (4,4  $\mu\text{M}$ ), foi observado que o desenvolvimento da embriogênese é acompanhado pela diminuição da concentração de citocininas endógenas (ERNEST et al., 1984). Em torno do 3º dia de cultivo, os autores observaram um pico de citocinina, porém nos dias seguintes a concentração diminuiu sucessivamente até o final das avaliações. De acordo com os autores, provavelmente, o pico do hormônio seja necessário para sinalizar a fase logarítmica de divisão celular, sendo que subsequentemente sua concentração diminui e não retorna a aumentar.

Enquanto os níveis de citocinina tendem a diminuir durante a embriogênese somática, a presença de ABA parece ser essencial para o processo embriogênico em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) (RAJASEKARAN et al., 1987). Ao se aplicar *in vitro* fluridona, substância que inibe a biossíntese do ABA, em diversas concentrações (0,02 – 20,0  $\text{mg L}^{-1}$ ), os autores evidenciaram a inibição da embriogênese somática em qualquer concentração utilizada. Ao se tentar restabelecer a embriogênese pela aplicação de ABA em explantes tratados previamente com fluridona, foi observado aumento das respostas de indução nas concentrações de 1,0 e 5,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Esses resultados podem inferir sobre a influência do ABA no processo de embriogênese, podendo confirmar a hipótese proposta acima, uma vez que esse hormônio é sinalizador de eventos relacionados à senescência na planta.

A ação dos herbicidas auxínicos em tecidos vegetais podem auxiliar na proposta feita por Bell et al. (1993), pois a utilização desses compostos sinaliza uma ação de estresse na planta, o qual envolve interações moleculares e bioquímicas para seu efeito fitotóxico. A presença desses herbicidas inicia uma cascata de sinalização, sendo percebida por proteínas F-box, entre elas o receptor de auxina TIR1 (*transport inhibitor response 1*), o qual ativa proteínas AFB (*auxin signalling F-box*) que regulam a transcrição de genes de resposta à auxina, entre eles os genes de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) sintase para a produção de etileno e 9-*cis*-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED) para a síntese de ABA (RAGHAVAN et al., 2006; GROSSMANN, 2007). Com isso, inicia-se o processo de senescência.

A fitotoxicidade dos herbicidas auxínicos também pode estar relacionada ao acúmulo de cianeto, gerado como subproduto da biossíntese do etileno via ação da ACC oxidase. O cianeto acumulado nas células pode dar origem ao processo de apoptose, indicando a senescência do tecido vegetal (GROSSMANN, 2003).

A aplicação de 2,4-D (1,0 mM) durante 1 hora em *Arabidopsis* sp. determinou grandes variações no padrão de expressão gênica dessa espécie. Após o tratamento com o herbicida, 148 genes tiveram sua transcrição aumentada, enquanto 85 genes diminuíram a transcrição em resposta ao 2,4-D (RAGHAVAN et al., 2005). Ao analisar as funções dos genes, os autores detectaram genes envolvidos nas respostas de senescência, como no metabolismo da parede celular: pectinesterases, xilosidades e beta-xilosidases, regulados negativamente; ou na degradação da membrana celular: lípases, regulados positivamente.

Na regulação de genes associados às vias da biossíntese de AIA, etileno e ABA utilizando 2,4-D em *Arabidopsis* sp., Raghavan et al. (2006) mostraram que, na presença de 2,4-D, houve a regulação positiva de genes relacionados a expressão de AIA (*AIA1*, *AIA13* e *AIA19*) e etileno (ACC sintase e ACC oxidase). A via do ABA é regulada positivamente em dependência da concentração de 2,4-D.

Não há na literatura relatos de trabalhos com embriogênese somática de mamoeiro seleção THB. Portanto, na tentativa de analisar comparativamente, pode-se fazer por meio de outros cultivares mais próximas geneticamente, como aqueles pertencentes ao grupo Solo. Malabadi et al. (2011) analisando a embriogênese somática de Coorg Honey Dew, Washington, Honey Dew, Pusa Delicious, Pusa Nanha, Taiwan 786, Taiwan 785, Sunrise, Solo, Co-1, Co-7 e Co-3 observaram que,



em meio de indução com 2,4-D (4,52  $\mu$ M) + TDZ (2,27  $\mu$ M), os cultivares Sunrise (9,0%) e Solo (19%), apresentaram respostas muito inferiores, quando comparadas a outros cultivares como Taiwan 786 (87%) e Taiwan 785 (85%). Esses resultados demonstram a grande variabilidade de resposta entre genótipos de uma mesma espécie e mesmo a superioridade da seleção THB em relação a outros genótipos do grupo Solo.

Em relação aos tipos de embriões, assim como as demais variáveis, o explante FC em meio com 2,4-D apresentou maior quantidade de embriões somáticos globulares (8,85), cordiformes (5,50) e torpedos (3,35) em comparação ao AP (0,45; 0,10 e 0,0; respectivamente), apesar de não ter diferença significativa entre as médias para embriões cotiledonares (Tabela 3).

**Tabela 3.** Número médio de embriões somáticos (ES) de ápice caulinar (AP) e folha cotiledonar (FC) de mamoeiro seleção THB em diversos estádios de desenvolvimento em meio de indução suplementado com 2,4-D, após 50 dias

Explante	Estádio embriogênico			
	Globular	Cordiforme	Torpedo	Cotiledonar
AP	0,45 b*	0,10 b	0,00 b	0,00 a
FC	8,85 a	5,5 0a	3,35 a	1,25 a
DMS	2,609	1,783	1,272	1,304

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

De forma semelhante à resposta com 2,4-D, é possível observar uma predominância de ES em fases iniciais (globulares e cordiformes) em qualquer concentração de 4-CPA utilizada (Tabela 4), sendo FC superior a AP.

As análises feitas em relação aos tipos de ES no final da fase de indução podem ser vistas como parâmetros qualitativos do processo de embriogênese. A indução é a etapa no qual as células do explante adquirem a competência embriogênica por meio da presença de auxinas, porém a diferenciação dos embriões somáticos (Figura 2D e 2E), bem como seu desenvolvimento para as fases tardias, como a cotiledonar (Figura 2F e 2G), é esperada em meio de maturação, na ausência ou em baixas concentrações de auxinas.

**Tabela 4.** Número médio de embriões somáticos (ES) de ápice caulinar (AP) e folha cotiledonar (FC) de mamoeiro seleção THB em diversos estádios de desenvolvimento em meio de indução suplementado com 4-CPA, após 50 dias

Explante	Estádio embriogênico			
	Globular	Cordiforme	Torpedo	Cotiledonar
AP	0,55 b*	0,50 b	0,20 b	0,05 b
FC	13,95 a	11,25 a	7,45 a	4,70 a
DMS	4,014	6,74	3,691	2,732

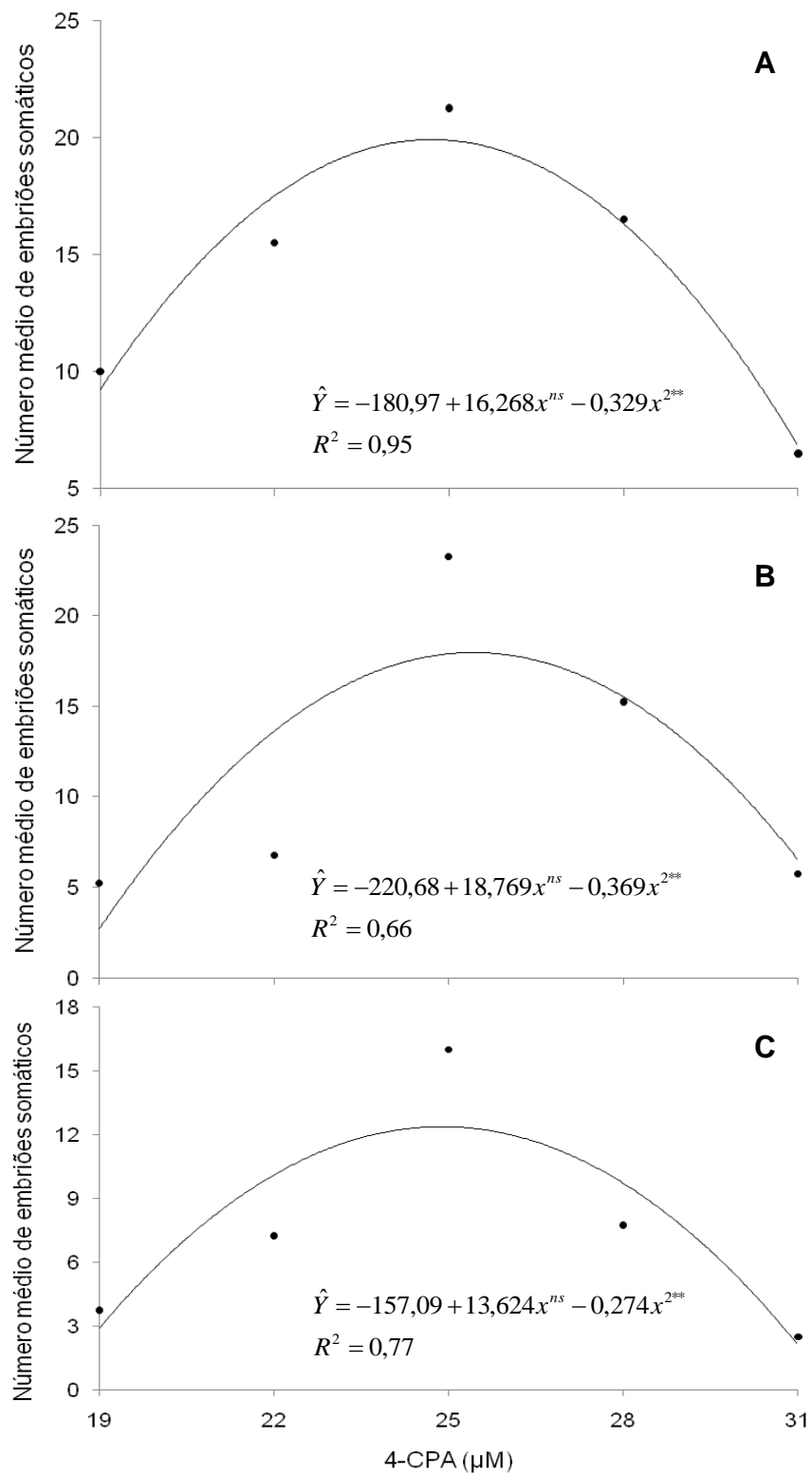
\* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Para todos os estádios embriogênicos (globular, cordiforme e torpedo) em que a interação entre as médias dos explantes e da concentração de 4-CPA foi significativa, houve adequação de modelo na análise de regressão apenas para os tratamentos utilizando folha cotiledonar, sendo este modelo quadrático (Figura 3).

De forma semelhante às demais características para o experimento de indução, o ponto máximo é alcançado com concentração de 4-CPA próximo a 25  $\mu\text{M}$ . Para ES globular, o ponto máximo (20,13) é obtido com a concentração de 24,72  $\mu\text{M}$ ; para ES cordiforme, a concentração de 25,43  $\mu\text{M}$  favorece a obtenção de 17,99 ES; e para ES torpedo, o ponto máximo (12,26) é alcançado com a concentração de 24,86  $\mu\text{M}$ .

De acordo com Zimmerman (1993), para iniciar a via de organização embriogênica, há a necessidade de remoção das auxinas do meio, pois provavelmente estas estariam ativando genes que impediriam o avanço do processo de embriogênese.

Para o uso de ambas as auxinas em meio de indução, é possível observar a presença de todas as fases dos ES (Tabelas 3 e 4), sendo mais perceptível quando utilizado o explante FC (Figura 3). Isto revela uma assincronização do processo embriogênico para mamoeiro seleção THB (Figura 2E, 2F e 2G).



**Figura 3.** Número médio de embriões somáticos (ES) nos estádios globular (A), cordiforme (B) e torpedo (C) a partir de folhas cotiledonares em meio de indução com 4-CPA, após 50 dias. \*\*Significativo em nível de 1% de probabilidade, pelo teste F; ns Não significativo.

Comportamento semelhante foi observado por Silva et al. (2009) para embriogênese somática de *Passiflora cincinnata* Mast., no qual foram obtidos embriões em todas as fases, independente da concentração e da combinação entre 2,4-D e BAP, após 30 dias em meio de indução e mais 30 dias em meio de diferenciação com carvão ativo.

A análise histológica da embriogênese direta de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh evidenciou uma assincronização na formação dos embriões a partir da indução de embriões zigóticos imaturos em meio contendo 2,4-D (5,0  $\mu\text{M}$ ) (KURCZYJSKA et al., 2007).

Portanto, os dados obtidos com o experimento de indução foram selecionadores para a fase de maturação e análises microscópicas. Dessa forma, devido à inferioridade de indução quando utilizados ápices caulinares, bem como a impossibilidade de definição de uma concentração ótima para 2,4-D, estes calos não foram colocados em meio de maturação, tão pouco analisados microscopicamente.

Vários critérios podem ser utilizados para se transferir os calos embriogênicos ao meio de maturação. Loiseau et al. (1995) encontraram frequência de calos embriogênicos para os tratamentos com 2,4-D; 4-CPA e Picloram estatisticamente iguais, porém a transferência para o meio de maturação foi apenas de calos embriogênicos induzidos por 2,4-D (4,5  $\mu\text{M}$ ), pois apresentavam maior frequência de embriões na fase de torpedo e cotiledonar. Além disso, os autores selecionaram com base na menor concentração de indutor, o que não causaria inibição no desenvolvimento do embrião para fases tardias. Para Anandan et al. (2012), o critério de seleção para transferência dos calos foi a partir da melhor resposta para calogênese (87,1%), calos embriogênicos (75,1%) e embriões somáticos por calo (65,2) obtido quando utilizado meio de indução com 2,4-D (2,0  $\text{mg L}^{-1}$ ).

#### **4.2 Maturação dos embriões somáticos**

A partir das análises dos resultados obtidos no experimento de indução, devido à inferioridade das respostas utilizando explante ápice caulinar, bem como a

indefinição de uma concentração ótima para 2,4-D, estes foram excluídos da fase de maturação. Assim, foram selecionadas apenas amostras de calos embriogênicos tratadas com 4-CPA na concentração de 25  $\mu\text{M}$  para o experimento em meio de maturação (MM).

Após 30 dias de permanência nesse meio e a partir da análise de variância pelo teste F, foi possível verificar diferença significativa em nível de 1% entre as médias tanto na frequência de ES quanto na porcentagem de ES germinados, indicando ocorrer variações quanto a utilização dos diferentes meios para a maturação dos ES.

Para o mamoeiro seleção THB, a frequência de ES (contabilizados os ES em fase cotiledonar e aqueles em início de germinação), a combinação de ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) + CA (15 g  $\text{L}^{-1}$ ) se mostrou muito eficiente na maturação de ES, uma vez que apresentou a maior média e estatisticamente diferente das demais (70,5 ES  $\text{calo}^{-1}$ ). Entretanto, quando utilizados os meios MS sem RC (45,7 ES  $\text{calo}^{-1}$ ); ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) + PEG (60 g  $\text{L}^{-1}$ ) (48,5 ES  $\text{calo}^{-1}$ ) ou ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) (51,6 ES  $\text{calo}^{-1}$ ) as médias de frequência de ES foram muito inferiores. Ao utilizar ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) + CA (30 g  $\text{L}^{-1}$ ) (54,2 ES  $\text{calo}^{-1}$ ), apesar de superior à média do meio MS sem RC, não apresentou diferença estatística com os meios ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) + PEG (60 g  $\text{L}^{-1}$ ) e ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Maturação dos embriões somáticos de mamoeiro seleção THB obtidos de folhas cotiledonares a partir de 4-CPA (25  $\mu\text{M}$ ), em relação à frequência e germinação precoce de embriões somáticos (ES), após 30 dias de cultivo

Meio de Maturação	Frequência (ES $\text{calo}^{-1}$ )	ES germinados (%)
MS sem RC	45,7 c*	18,3 a
ABA (0,5 $\mu\text{M}$ )	51,6 bc	6,5 c
ABA (0,5 $\mu\text{M}$ ) + CA (15 g $\text{L}^{-1}$ )	70,5 a	4,0 d
ABA (0,5 $\mu\text{M}$ ) + CA (30 g $\text{L}^{-1}$ )	54,2 b	16,4 b
ABA (0,5 $\mu\text{M}$ ) + PEG (60 g $\text{L}^{-1}$ )	48,5 bc	4,3 d
DMS	6,28	1,47

Legenda: ABA. ácido abscísico; CA. carvão ativo. PEG. polietilenoglicol. RC. regulador de crescimento \*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Para a variável ES germinados, espera-se que o meio de maturação mais eficiente seja aquele no qual há menor porcentagem destes, uma vez que essa

variável indica a ocorrência de germinação precoce. Portanto, de forma semelhante ao resultado da característica anterior, o meio de maturação mais eficiente para inibir a germinação precoce é composto de ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + CA ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ), com apenas 4,0% de ES germinados, porém sem diferença estatística com o meio ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + PEG ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ), com 4,3% de ES germinados. Entretanto, a menor eficiência para inibir a germinação precoce em mamoeiro seleção THB foi o MS sem RC (18,3% de ES germinados), seguido pelo meio com ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + CA ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) (16,4%) e ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) (6,5%), todos estatisticamente diferentes entre si. (Tabela 5).

O carvão ativo (CA) possui utilidade no meio de maturação devido à sua capacidade de adsorção de substâncias inibidoras, como compostos fenólicos, etileno ou mesmo resíduos de auxinas, que poderiam impedir o processo de desenvolvimento dos embriões somáticos (PEREIRA et al., 2008).

Na maturação de embriões somáticos de diferentes variedades de uva, López-Pérez et al. (2005) obtiveram aumento significativo da taxa de maturação quando utilizado meio suplementado com carvão ativo ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ), sendo de apenas 5,8% em meio sem CA e quase 100% (99,5%) em meio com CA.

Para mamoeiro seleção THB, a concentração de  $15 \text{ g L}^{-1}$  de CA parece ser ótima ou próxima de ótima, uma vez que, combinado com ABA, provavelmente exerça função adsorvendo substâncias inibidoras, além de permitir a liberação de forma contínua e adequada desse hormônio para o tecido embriogênico, favorecendo o seu desenvolvimento (Figura 2H). Porém, quando se elevou a concentração de CA de  $15 \text{ g L}^{-1}$  para  $30 \text{ g L}^{-1}$ , este provavelmente poderia adsorver até mesmo o ABA, impedindo sua liberação em concentrações ideais para o tecido vegetal. Neste último caso, a presença do ABA possui pouca eficiência na inibição da germinação precoce, podendo ser comparado com o meio MS sem RC, ausente de ABA (Tabela 5).

Apesar da frequência de ES ter sido baixa (48,5), o meio com ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + PEG ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ) foi muito eficiente para inibir a germinação precoce (4,3%) (Figura 2I). Esse resultado sugere um papel relevante do PEG nesse processo, pois, devido à sua função osmótica, é provável que sinalize ao embrião em fase de maturação as condições externas impróprias para a germinação. Apesar de não analisada estatisticamente, a presença de PEG em meio de maturação favoreceu a formação

de ES normais, com clara distinção entre eixo embrionário e cotilédones, estes em número de dois (Figura 2I).

Alguns trabalhos têm relatado a importância do PEG como substância eficaz para aumentar a osmolaridade do meio e elevar a frequência de embriões somáticos (CASTILLÓN & KAMO, 2002; VOOKOVÁ & KORMUTÁK, 2002; STEINER et al., 2005; ALKHATEEB, 2006; CALIC-DRAGOSAVAC et al., 2010). Esses resultados de maturação com PEG podem estar relacionados ao seu efeito osmótico não-plasmolizante, que embora não possa penetrar na célula vegetal, é capaz de induzir o estresse hídrico (ALKHATEEB, 2006).

A transferência dos calos embriogênicos para meios, na ausência ou com baixa concentração de auxinas, estimula a diferenciação e organogênese dos embriões somáticos para as fases tardias (VAN ARNOLD et al., 2002). Houve a diferenciação da massa pró-embriogênica em embriões somáticos, podendo ser observadas as regiões do eixo embrionário e dos cotilédones (Figura 1F e 1G).

A ausência de ABA no meio de maturação se mostrou ineficiente na inibição da germinação precoce para o mamoeiro seleção THB. Além disso, foram observadas maiores frequências de anormalidade nos embriões maturados na ausência de ABA (dado não mostrado). De forma semelhante, Gutmann et al. (1996) observaram, através de análises histológicas, desenvolvimento anormal e assincronizado, levando à germinação precoce de ES de lariço híbrido (*Larix x leptoeuropaea*), quando maturados em meio sem a adição de ABA. Porém, em meio com ABA (60  $\mu\text{M}$ ), os autores verificaram desenvolvimento normal sem germinação precoce. Esses resultados ratificam a importância do ABA em meio de maturação para o desenvolvimento normal dos ES.

Em meio sólido de maturação com variação da concentração de ABA (0,0 a 10,5  $\text{mg L}^{-1}$ ), Anandan et al. (2012) alcançaram média máxima de  $74 \pm 1,3$  ES na fase cotiledonar em meio com 10,5  $\text{mg L}^{-1}$  em mamoeiro cv. Co-7, após 110 a 120 dias. Apesar de superior ao resultado apresentado neste trabalho com a seleção THB, deve-se considerar a diferença em relação à concentração de ABA e o tempo de exposição ao meio, uma vez que os autores utilizaram uma concentração de ABA superior a mais de 100 vezes à utilizada no presente trabalho e deixaram por um tempo quatro vezes maior, para se obter média pouco superior. Porém, ao se utilizar apenas o meio MS puro, em condições semelhantes, os autores alcançaram média de  $13 \pm 2,6$  ES, enquanto na seleção THB a média foi superior a 45 ES (Tabela 5). A

partir dessa análise, poder-se-ia inferir que o mamoeiro seleção THB seja mais embriogênico que o cv. Co-7.

Em um experimento de maturação de embriões somáticos de mamoeiros cv. Honey Dew e Washington, Renukdas et al. (2006), utilizando antagonistas de etileno (ABA, espermidina e  $\text{AgNO}_3$ ), observaram que concentrações superiores a  $10 \mu\text{M}$  de qualquer do antagonista, inibiam a maturação do ES. Porém, concentrações entre  $0,1$  a  $1,0 \mu\text{M}$  eram satisfatórias. Especificamente para o ABA, os autores encontraram que as amostras respondiam melhor quando usada a concentração de  $0,1 \mu\text{M}$ , obtendo maturação superior a 80%. Portanto, dependendo da concentração de ABA o processo de maturação é favorecido e, provavelmente, o etileno seja um inibidor do desenvolvimento embrionário, porém altas concentrações de seus antagonistas podem ser tóxicas para a embriogênese somática.

O sucesso da conversão de embriões somáticos em plântulas, bem como sua morfologia normal, está diretamente relacionado à qualidade do processo de maturação. Embriões de mamoeiro seleção THB maturados em meio contendo ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + PEG ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ) ou ABA ( $0,5 \mu\text{M}$ ) + CA ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ) foram convertidos em plântulas normais (Figura 2J) com maior frequência.

### 4.3 Análise histológica e estrutural

As análises por microscopia de luz e eletrônica de varredura foram realizadas em folhas cotiledonares submetidas ao tratamento com  $25 \mu\text{M}$  de 4-CPA durante o período de indução e pós-maturação, objetivando investigar o processo embriogênico, bem como analisar a morfologia dos embriões formados (Figuras 4 e 5).

A folha cotiledonar de mamoeiro seleção THB (Figura 4A) apresenta uma camada simples de epiderme com células retangulares e justapostas, os estômatos são observados em ambas as faces, adaxial e abaxial. Devido sua precoce diferenciação, o mesófilo apresenta uma tênue separação entre o parênquima paliçádico, células alongadas longitudinalmente formando uma ou duas camadas mais próximas à face adaxial, e o parênquima lacunoso, células grandes e esféricas



com espaçamento intersticial e formando três ou quatro camadas mais próximas da face abaxial. Na ausência de indução, não foram observadas células em processo de divisão.

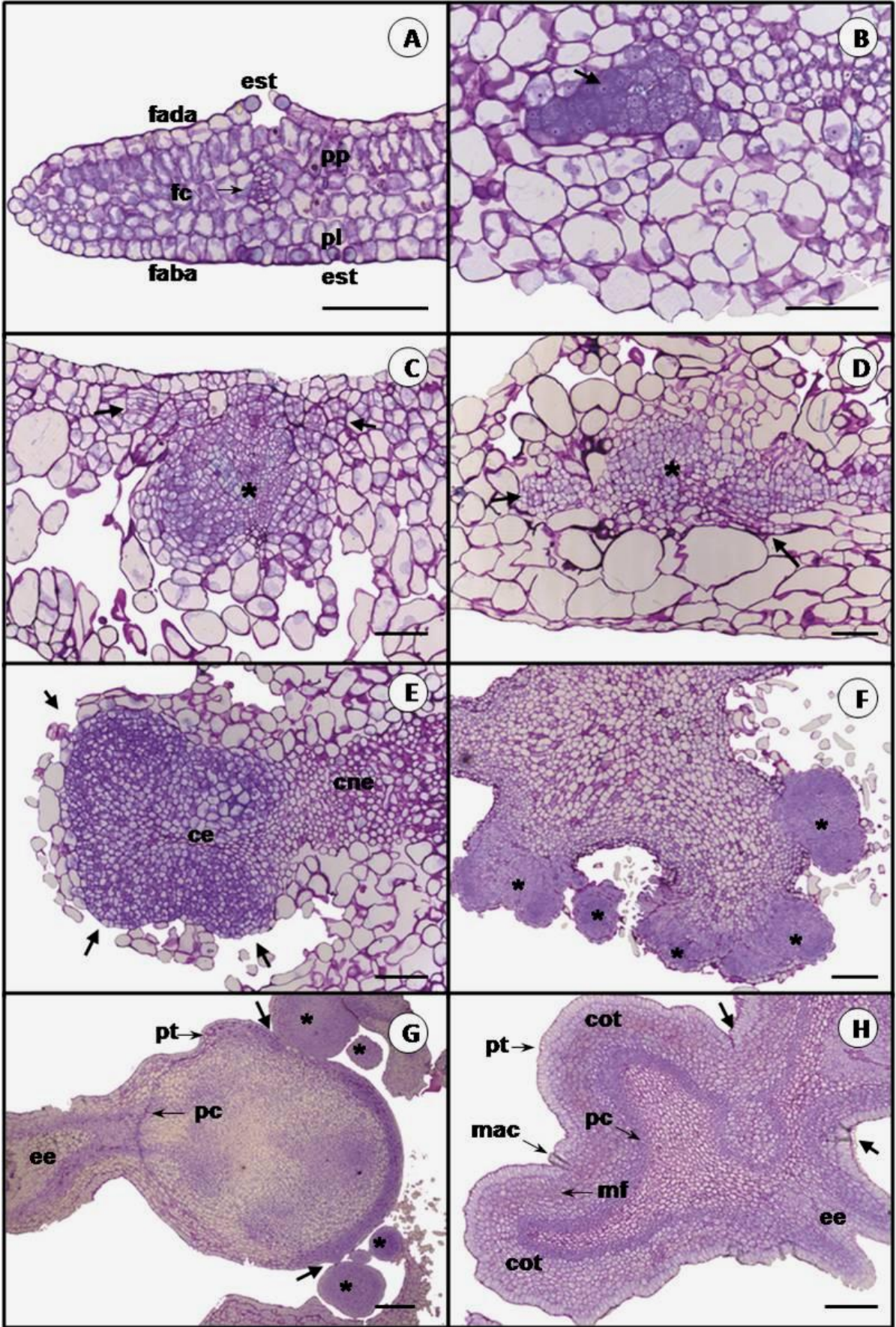
A diferenciação celular foi observada dentro de dois dias, em meio de indução com 4-CPA (25  $\mu\text{M}$ ) nas células parenquimáticas da lâmina cotiledonar, com inúmeros pontos de atividade meristemática e divisões em diversos planos. As células originadas dessas divisões apresentavam elevada razão núcleo/citoplasma.

Em *Passiflora edulis* Sims, a diferenciação celular se iniciou após três dias de indução, principalmente na região cotiledonar de embriões zigóticos maduros. Similarmente, foi identificada na região meristemática da radícula, porém devido sua desorganização, houve o início da formação de calo (PINTO et al., 2011). Em *Carica papaya* L., as primeiras divisões celulares foram observadas no terceiro dia em diversos pontos próximo ao procâmbio, ao longo do eixo embrionário (KOEHLER, 2004).

A presença de células pré-embriogênicas foi visualizada após sete dias de cultivo (Figura 4B), sendo estas caracterizadas por pequeno diâmetro, citoplasma denso, com núcleo grande e nucléolo evidente (WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986). Sua formação se iniciou internamente, a partir de células parenquimáticas, não sendo possível ainda a visualização externa. Além da formação dessas células, as divisões celulares originaram um tecido visivelmente desorganizado, provavelmente dando início à formação de calo. Não houve indício histológico de formação direta de embriões somáticos em mamoeiro seleção THB.

Em *Carica papaya* L., Fernando et al. (2001) observaram, a princípio, a formação de embriões somáticos no cultivar Sunrise Solo diretamente a partir de células individuais protodérmicas após 18 dias, em meio de indução contendo 2,4-D (2,0 mg L<sup>-1</sup>).

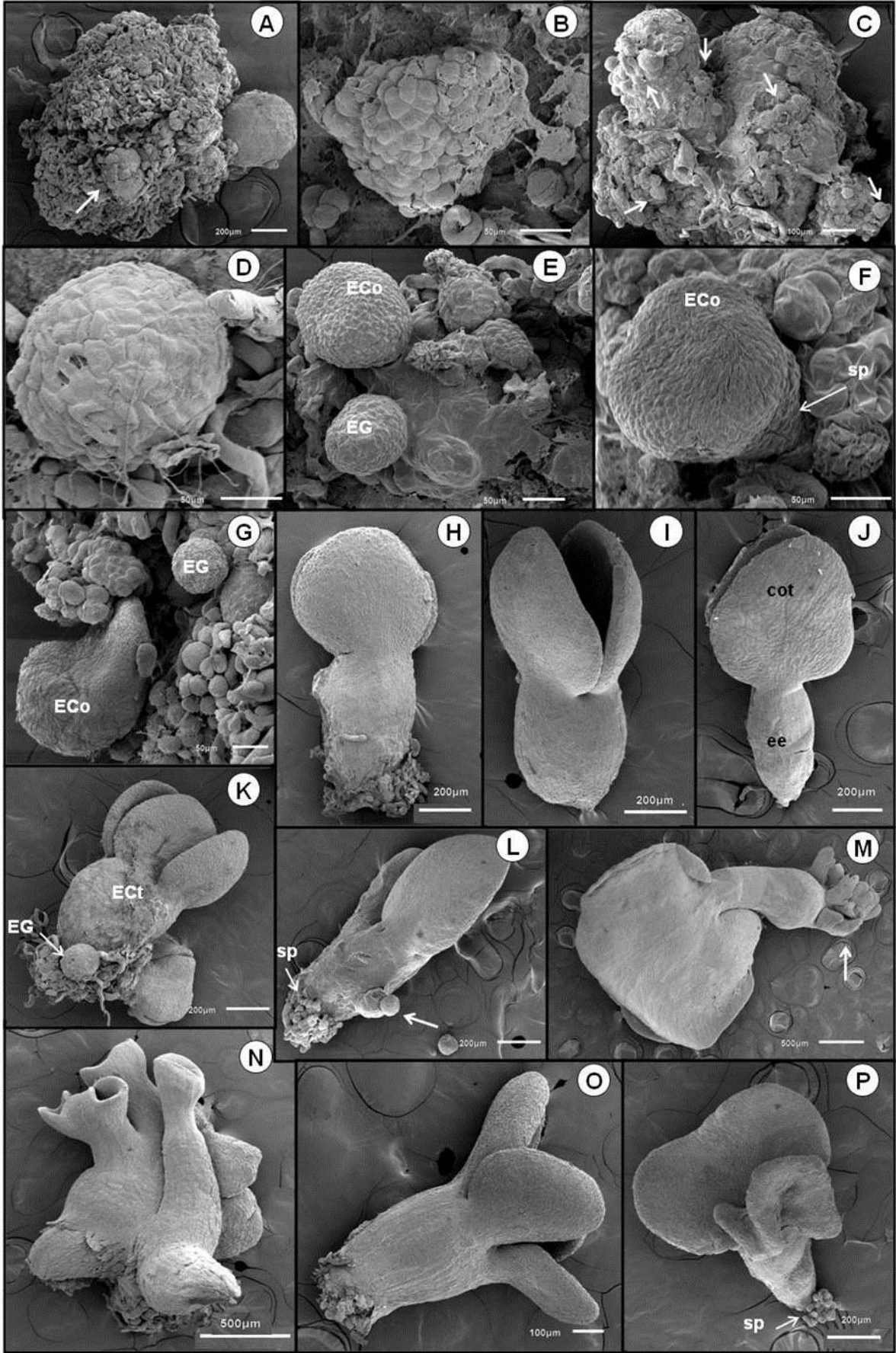
A origem unicelular, no qual uma única célula de um tecido específico, geralmente a protoderme ou epiderme, sofre desdiferenciação e origina embriões somáticos é descrita na literatura para algumas espécies (LAPARRA et al., 1997; FERNANDO et al., 2001; KURCZYNSKA et al., 2007; KONIECZNY et al., 2012). Esse processo de embriogênese geralmente apresenta-se de forma mais rápida, dentro de poucos dias.



**Figura 4.** Sequência de eventos anatômicos da embriogênese somática a partir de folhas cotiledonares de *Carica papaya* L. seleção THB em meio de indução com 4-CPA (25  $\mu$ M). (A) Folhas cotiledonares não induzidas com idade de 30 dias; (B) Massa pró-embriogênica aos 7 dias. Células com núcleo grande e nucléolo evidente (seta); (C) Massa calogênica e massa embriogênica (\*) em desenvolvimento com 14 dias e (D) 21 dias. Células em intensa divisão celular (seta). (E) Exposição do calo embriogênico à superfície do explante, rompendo a epiderme (seta), aos 28 dias em MI. (F) Inúmeros complexos embriogênicos globulares formados indiretamente aos 35 dias. (G) Embrião somático em fase torpedo e embriões globulares (\*) aos 50 dias. Embriogênese secundária sendo mostrada pela conexão entre embriões (seta). (H) Embrião cotiledonar formado aos 50 dias em MI evidenciando as regiões de desprendimento (setas) com o tecido original. *Abreviações:* ce. calo embriogênico; cne. calo não-embriogênico; ee. eixo embrionário; est. estômato; fada. face adaxial; faba. face abaxial; fc. feixes vasculares; cot. cotilédones; mac. meristema apical do caule; mf. meristema fundamental. pc. procâmbio; pl. parênquima lacunoso; pp. parênquima paliçádico; pt. protoderme. Barra = 100  $\mu$ m (A, B, C, D, E, H); 200  $\mu$ m (G, H). Coradas com azul de toluidina.

A intensa atividade meristemática nos dias seguintes, após 14 dias (Figura 4C) e após 21 dias (Figura 4D), desorganizou a estrutura do explante cotiledonar. O processo de divisão celular levou a formação de células pequenas arranjadas compactamente com citoplasma denso, dando origem a massas embriogênicas, sendo possível sua visualização por meio de microscopia de varredura (Figuras 5A, 5B, 5C). Assim, da mesma forma que Fernando et al. (2001) e Konieczny et al. (2012), foi possível a identificação de dois tipos distintos de calo: um com células alongadas e altamente vacuoladas, as quais apresentavam aparência friável e localizado abaixo da epiderme do explante; e outro ocorrendo mais internamente e mostrando a presença de pequenas células meristemáticas de arranjo compacto e com citoplasma denso.

Após aproximadamente 28 dias, a estrutura do explante já estava altamente modificada e a epiderme cotiledonar mostrava-se completamente descontínua (Figura 4E). A atividade meristemática das células de ambos os tipos de calo direcionou a massa calogênica para a periferia do cotilédone, causando a extrusão da massa embriogênica à superfície.



**Figura 5.** Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura da embriogênese somática em *Carica papaya* L. seleção THB pós-tratamento com 4-CPA (25  $\mu$ M). (A) Estrutura de calo formado de massa não-embriogênica com algumas regiões de massa embriogênica (seta). (B) Destaque para massa embriogênica com certa organização celular em comparação com o tecido desorganizado ao redor. (C) Presença de protuberâncias na superfície do calo indicando a formação de complexos pré-embriogênicos (setas). Embriões somáticos em diversos estádios de desenvolvimento após a maturação: (D) globular; (E) globular e cordiforme inicial; (F) cordiforme inicial com destaque para a formação da depressão apical no embrião e a presença de estrutura semelhante ao suspensor (seta); (G) globular e cordiforme tardio; (H) torpedão tardio; (I) cotiledonar inicial; (J) cotiledonar tardio normal. (K) Presença de embriões somáticos em diferentes fases no mesmo calo. (L, M) Processo de embriogênese secundária (seta) em meio de maturação. Embriões morfologicamente anormais: (N) embrião tipo trombeta com os cotilédones fusionados; (O) embrião policotiledonar; (P) embrião anisocotiledonar. *Abreviações:* cot. cotilédones; ee. eixo embrionário; ECo. embrião cordiforme; ECt. embrião cotiledonar; EG. embrião globular; sp. suspensor. Barra: 50  $\mu$ m (B, D, E, F, G); 100  $\mu$ m (C, O); 200  $\mu$ m (A, H, I, J, K, L, P); 500  $\mu$ m (M, N).

A partir da exposição das massas embriogênicas foi possível a visualização de inúmeros complexos globulares pré-embriogênicos independentes ou em processo de independência, formados a partir de células epidérmicas e subepidérmicas do calo (Figura 4F), com aproximadamente 35 dias. Este processo sugere a ocorrência de embriogênese indireta. Esses complexos apresentavam uma linha de fragmentação muito bem definida, formada por células de paredes celulares espessas, semelhantes à protoderme, estabelecendo limites entre as células embriogênicas das células grandes e vacuoladas do calo (PINTO et al., 2011).

Ao contrário da origem unicelular, a origem multicelular ocorre da desdiferenciação das células em diversos tecidos simultaneamente, podendo progredir posteriormente para uma única massa embriogênica (ROCHA et al., 2012).

Devido à massa embriogênica se originar a partir da fusão de células parenquimáticas e epidérmicas, e a formação de estruturas globulares embriogênicas a partir desta, conclui-se que a origem dos embriões somáticos em mamoeiro seleção THB é multicelular e indireta.

Assim como ocorreu para o mamoeiro seleção THB, a origem multicelular de embriões somáticos já foi documentada em outros cultivares (FERNANDO et al., 2001; KOEHLER, 2004).

Em mandioca (*Manihot esculenta*), as massas embriogênicas foram formadas ao redor do procâmbio ao longo de todo o explante cotiledonar. Posteriormente, essas massas se fusionaram dando origem a embriões somáticos, caracterizando sua origem multicelular (BABA et al., 2008).

A formação dessas estruturas globulares representa o primeiro estágio de diferenciação dos embriões somáticos (fase globular), por meio da via indireta, sobre os tecidos do explante inicial. Regiões embriogênicas surgem a partir de camadas subepidérmicas mitoticamente mais ativas (PINTO et al., 2011). Ainda foi possível observar, após 35 dias, embriões somáticos em fase globular sem conexão vascular com o tecido parental (Figura 4F). De forma semelhante, complexos embriogênicos foram visualizados após 45 dias de indução nas camadas periféricas do calo no cultivar Improved Sunrise Line 72/12 (KOEHLER, 2004).

Os embriões pré-globulares se desenvolveram em estádios mais tardios, como o torpedão (Figura 4G) e cotiledonar (Figura 4H), podendo ser observados após 50 dias. A presença de protoderme e procâmbio nos embriões somáticos, semelhante ao embrião zigótico, sugere independência do explante e sistema vascular fechado.

Durante a fase de indução (Figura 4G) ou mesmo após a fase de maturação (Figura 5K), foi possível a visualização de embriões globulares juntamente com embriões em estádios tardios. Além disso, todas as fases do embrião somático foram identificadas por MEV: globular (Figura 5D), cordiforme inicial (Figuras 5E, 5F), cordiforme tardio (Figura 5G), torpedão (Figura 5H), cotiledonar inicial (Figura 5I) e cotiledonar tardio (Figura 5J). Dessa forma a embriogênese somática em mamoeiro seleção THB não foi sincronizada.

Falta de sincronização na formação de embriões somáticos também foi observada em outros cultivares de mamoeiro (FERNANDO et al., 2001; KOEHLER, 2004) e relatada em outras espécies: *Glycine max* (FERBANDO et al., 2002), *Arabidopsis* (KURCZYNSKA et al., 2007), *Manihot esculenta* (BABA et al., 2008), *Trifolium nigrescens* (KONIECZNY et al., 2012).

Não está claro na literatura o processo o qual motiva a formação de embriões assincronizados, porém esse fenômeno pode estar relacionado à ocorrência de embriogênese secundária, a qual é condicionada ao tempo de exposição ao meio de indução ou meio de maturação. No presente trabalho, a permanência em meio de indução por 50 dias, foi suficiente para a visualização de

embriões em diferentes fases de desenvolvimento no mesmo tratamento (Tabelas 3 e 4; Figura 3) ou calo (Figura 4G, 5K).

A ligação entre embriões tardios e embriões iniciais (Figura 4G) indica a ocorrência de embriogênese secundária. Devido à conexão protodérmica entre o embrião torpedo e os globulares, é provável que a embriogênese secundária em mamoeiro seleção THB tenha origem direta, sem a necessidade de formação de calo, a partir de células superficiais. A embriogênese secundária foi observada durante a indução (Figura 4G) e também em meio de maturação, ausente de auxinas (Figuras 5L, 5M).

A embriogênese secundária é um processo de indução de novos embriões somáticos a partir de embriões pré-existentes (RAEMAKERS et al., 1995). Esse processo pode aumentar o potencial de propagação de plantas via cultura de tecido.

É provável que a embriogênese secundária tenha relação com o tempo de exposição ao meio, pois para se dar início a novos embriões, é necessário que alguns deles já tenham sido formados. A maior proliferação de embriões secundários em mamoeiro seleção THB ocorreu em meio de maturação, ausente em auxinas (Figuras 5L, 5M), os quais se desenvolveram principalmente a partir da superfície do eixo embrionário, próximo ao meristema radicular, dos embriões primários.

Desenvolvimento semelhante foi observado por Silva et al. (2009) na indução de embriogênese somática em *Passiflora cincinnata*, na qual a embriogênese secundária ocorreu em meio ausente de reguladores de crescimento. Os autores observaram que a germinação dos embriões primários foi negativamente afetada por causa da produção intensa de embriões secundários na superfície daqueles, debilitando sua conversão em plântulas pela inibição do desenvolvimento das partes aérea e radicular.

O embrião somático em fase cotiledonar (Figura 4H) apresenta distintamente as regiões cotiledonares e do eixo embrionário após 50 dias, sendo bastante evidente o meristema apical caulinar e a radícula. Apesar da visualização do procâmbio ainda indicar ligação entre o embrião somático e o tecido parental, é possível observar a formação de uma região de fragmentação, sugerindo futura independência com o explante.

A semelhança estrutural com embrião zigótico é percebida pela presença de protoderme, procâmbio e meristema fundamental (Figura 4H), mostrando sua

capacidade para a conversão em uma planta. A presença de ambos os meristemas caulinar e radicular indicam provável sucesso na conversão.

Apesar da formação de embriões cotiledonares normais (Figura 5J), foram visualizados embriões morfológicamente anormais, principalmente após o período de maturação, comprometendo sua capacidade de conversão em plantas. Dentre as anormalidades, foram observados embriões com os cotilédones fusionados, em forma de cone ou trompete (Figura 5N), policotiledonares (Figura 5O) e anisocotiledonares (Figura 5P), em que apresentam um cotilédone proeminente e outro pequeno e rudimentar. Apesar da estrutura anormal, todos esses embriões apresentavam capacidade de germinação, o que indica presença de meristema apical radicular, porém aqueles em forma de trompete falharam em se converter em plântula, provavelmente pela ausência ou ineficiência do meristema apical caulinar. Todavia, os embriões policotiledonares e anisocotiledonares, apesar de anormais, ocasionalmente foram capazes de germinar e se converterem em plântulas (dados não mostrados).

Em soja, foram observados embriões com os mesmos padrões de anormalidades, sendo que aqueles em forma de trompete foram os mais frequentes (FERNANDO et al., 2002). Em *Trifolium nigrescens*, não foi observada a fase cordiforme, porém os cotilédones foram formados circularmente ao redor de um poro apical localizado centralmente, originando embriões em forma de chifre (KONIECZNY et al., 2012).

A incidência de anormalidade em embriões somáticos tem sido sugerida ocorrer em correspondência com o tempo de duração da cultura e pela utilização de altas concentrações de auxinas (PESCADOR et al., 2008). Além disso, as auxinas sintéticas, especialmente o 2,4-D, podem causar distúrbios no transporte polar de auxinas, o qual é pré-requisito para o estabelecimento da simetria bilateral e diferenciação dos cotilédones (GAJ, 2004). Essas auxinas podem induzir variações somaclonais, devido seu efeito teratogênico, o que pode correlacionar com a diversidade fenotípica dos embriões somáticos (TREMBLAY et al., 1999).

Considerando as semelhanças estruturais e fisiológicas das auxinas 2,4-D e 4-CPA, bem como o tempo de exposição ao meio de indução, é possível que a exposição do tecido vegetal à auxina contribua para a ocorrência de aberrações morfológicas identificadas durante a embriogênese somática de mamoeiro seleção THB.



## 5. CONCLUSÕES GERAIS

Folhas cotiledonares do mamoeiro seleção THB em meio com 4-CPA (25  $\mu\text{M}$ ) apresentaram respostas superiores em relação ao ápice caulinar e a auxina 2,4-D para a indução da embriogênese somática.

A análise histológica evidencia que em folhas cotiledonares o processo embriogênico inicia-se na região parenquimática com subsequente proliferação de massas embriogênicas, originando embriões somáticos pela via multicelular indireta.

A análise por MEV destacou a ocorrência de embriogênese secundária, bem como a presença de embriões anormais.

Para maturação de embriões somáticos, a adição de ABA (0,5  $\mu\text{M}$ ) e CA (15  $\text{g L}^{-1}$ ) ao meio apresentaram-se muito eficiente tanto para elevar a frequência de ES quanto para inibir a germinação precoce.

## 6. REFERÊNCIAS

ALKHATEEB, A. A. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Sukary in response to sucrose and polyethylene glycol. **Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 466-470, 2006.

ALMEIDA, E. P. de; OLIVEIRA, R. P. de; 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.; BALASUBRAMANIANA, P.; GUTIEIRREZ-MORAB, A. *In vitro* somatic embryogenesis from suspension cultures of *Carica papaya* L. **Scientia Horticulturae**, v. 136, p. 43-49, 2012.

ARAÚJO, A. G. F. de; YAMANISHI, O. K. Propagação vegetativa do mamoeiro via enxertia: influência do método de garfagem e do tipo e diâmetro do garfo. In: **I Simpósio Papaya Brasil**, p. 321-323, 2003.

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.

ASLAM, J.; KHAN, S. A.; CHERUTH, A. J.; MUJIB, A.; SHARMA, M. P.; SRIVASTAVA, P. S. Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, p. 369-380, 2011.

ATTREE, S. M.; POMEROY, M. K.; FOWKE, L. C. Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum and their tolerance to drying and frozen storage. **Journal of Experimental Botany**, v. 46, p. 433-439, 1995.

BABA, A. I.; NOGUEIRA, F. C. S.; PINHEIRO, C. B.; BRASIL, J. N.; JEREISSATI, E. S.; JUCÁ, T. L.; SOARES, A. A.; SANTOS, M. F.; DOMONT, G. B.; CAMPOS, F. A. P. Proteome analysis of secondary somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Science**, v. 175, p. 717-723, 2008.

- BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) Somatic embryogenesis and synthetic seed I. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. New York, Springer-Verlag, v. 30, p. 87-101, 1995.
- BELL, L. M.; TRIGIANO, R. N.; CONGER, B. V. Relationship of abscisic acid to somatic embryogenesis in *Dactylis glomerata*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 33, n. 4, p. 495-499, 1993.
- BHATTACHARYA, L.; KHUSPE, S. S. *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 91, p. 39-49, 2001.
- BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p. 868-874, 1991.
- BOZHKOVA, P.V.; FILONOVA, L.H.; VON ARNOLD, S. A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. **Biotchnology and Bioengineering**, v. 77, n. 6, p. 658-667, 2002.
- CAI, W.; GONSALVES, C.; TENNANT, P.; FERMIN, G.; SOUZA JR., M.; SARINDU, N.; JAN, F-J.; ZHU, H-Y.; GONSALVES, D. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, v. 35, p. 61-69, 1999.
- CALIC-DRAGOSAVAC, D.; ZDRAVKOVI-KORAC, S.; BOHANEC, B.; RADOJEVIC, L.; VINTERHALTER, B.; STEVOVIC, S.; CINGEL, A.; SAVIC, 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, n. 25, p. 3786-3793, 2010.
- CAPELO, A. M.; SILVA, S.; BRITO, G.; SANTOS, C. Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 103, p. 237-242, 2011.
- CASTILLO, B.; SMITH, M. A. L.; YADAVA, U. L. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 172-176, 1998.
- CASTILLÓN, J.; KAMO, K. Maturation and conversion of somatic embryos of three genetically diverse rose cultivars. **HortScience**, v. 37, n. 6, p. 973-977, 2002.
- CHEN, M. H.; WANG, P. J.; MAEDA, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 348-351, 1987.
- CHINALIA, F. A.; REGALI-SELEGHIN, M. H.; CORREA, E. M. 2,4-D toxicity: cause, effect and control. **Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology**, v. 1, n. 2, p. 24-33, 2007.
- CHOW, Y. J.; LIN, C. H. p-Hydroxybenzoic acid the major phenolic germination inhibitor of papaya seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.19, p167-174, 1991.
- COSTA, A. F. S.; PACOVA, B. E. V. Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. In: MARTINS, D. S.; COSTA, A. F. S. **A cultura do mamão: tecnologia e produção**. Vitória-ES: INCAPER, 2003. Cap. 3, p. 59-102.

COSTA, F. R. da. **Estudo das relações genômicas em espécies de Caricaceae com base em marcadores citomoleculares**. 2008. 82p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2008.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 648p. 2008.

DETONI, J. L.; COSTA, P. R.; FREIRE, R. R.; MONTEIRO-JÚNIOR, K.; ALEXANDRE, R. S. Utilização de diferentes substratos na emergência de genótipos de mamoeiro. In: **Anais do V Simpósio Papaya Brasil**, Porto Seguro (BA), Brasil, 2011.

DURZAN, D. J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: HALLGREN, J. E. (Ed.). **Proceedings of Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology**. Swedish: University of Agricultural Sciences, v. 8, p. 147-186, 1988.

ERNEST, D.; OESTERHELT, D; SCHÄFER, W. Endogenous cytokinins during embryogenesis in anise cell culture (*Pimpinella anisum* L.). **Planta**, v. 161, p. 240-245, 1984.

FARIAS, A. R. N.; OLIVEIRA, A. M. G.; SANTOS FILHO, H. P. **A cultura do mamão**. v2.ed. rev. e aum. Brasília: EMBRAPA (Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical). 1998. 92p.

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.

FEHÉR, A. The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 52, n. 1, p. 53-56, 2008.

FERNANDO, J. A.; MELO, M.; SOARES, M. K. M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 247-255, 2001.

FERNANDO, J. A.; VIEIRA, M. L. C.; GERALDI, I. O.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomical study of somatic embryogenesis in *Glycine max* (L.) Merrill. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 277-286, 2002.

FERNANDO, S. C.; GAMAGE, C. K. A. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.) **Plant Science**, v. 151, p. 193–198, 2000.

FIRN, R. D. Growth substance sensitivity: the need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. **Physiologia Plantarum**, v. 67, p. 267–272, 1986.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Food and agricultural commodities production: papayas**. 2010. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em 09 dez. 2012.

FUJIMURA, T.; KOMAMINE, A. The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension. **Plant Physiology**, v. 64, p. 162-164, 1980.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 27-47, 2004.

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.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**: volume 1. The background. 3rd ed. Dordrecht: Springer, p. 65-113, 2008.

GHERARDI, E.; VALIO, I. F. M. Occurrence of promoting and inhibitory substances in the seed arils of *Carica papaya* L. **Journal of Horticultural Science**, Kent, v. 51, p.1-14, 1976.

GRIEB, B.; SCHÄFER, F.; IMANI, J.; MASHAYEKHI, K. N.; ARNHOLDTSCHMITT, B.; NEUMANN, K. H. Changes in soluble proteins and phytohormone concentrations of cultured carrot petiole explants during induction of somatic embryogenesis (*Daucus carota* L.). **Journal of Applied Botany**, v. 71, p. 94-103, 1997.

GROSSMANN, K. Auxin herbicide action: lifting the veil step by step. **Plant Signaling and Behavior**, v. 2, n. 5, p. 421-423, 2007.

GROSSMANN, K. Mediation of herbicide effects by hormone interactions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 22, p. 109-122, 2003.

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

GUTMANN, M.; VON ADERKAS, P.; LABEL, P.; LELU, M. A. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 305, p. 1905-1917, 1996.

GYORGY, A.; ARAÚJO, F.; LIMA, L. A.; MELLO, R. M.; PIRES, M. C.; YAMANISHI, O. K. Influence of the scion wood storage period in the papaya (*Carica papaya* L.) grafting. In: **International Symposium of Tropical and Subtropical Fruits**, 3, Fortaleza: ISHS, 2004, p. 96.

HOMHUANA, S.; KIJWIJANA, B.; WANGSOMNUKA, P.; BODHIPADMAB, K.; LEUNGC, D. W. M. Variation of plants derived from indirect somatic embryogenesis in cotyledon explants of papaya. **ScienseAsia**, v. 34, p. 347-352, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Frutas frescas**: exportação, importação e produção. IBRAF, 2010. Disponível em: [http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est\\_frutas.asp](http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp). Acesso em: 13 dez. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.com.br>. Acesso em: 10 jan. 2012.

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 abr de 2012.

- IVANOVA, A.; VELCHEVA, M.; DENCHEV, P.; ATANASSOV, A.; VAN ONCKELEN, H.A. Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*. **Physiologia Plantarum**, v. 92, p. 85-89, 1994.
- JATTANA, A.; KIJIWIJAN, B.; BODHIPADMA, K.; LEUNG, D. M. W. Indirect somatic embryogenesis and synthetic seed production from cotyledon explants of papaya (*Carica papaya* L.) 'Kaekdum'. **The Journal of Applied Science**, v. 7, n. 2, p. 116-126, 2008.
- JAYASANKAR, S.; BONDADA, B. R.; LI, Z.; GRAY, D. J. Comparative anatomy and morphology of *Vitis vinifera* (vitaceae) somatic embryos from solid- and liquid-culture-derived proembryogenic masses. **American Journal of Botany**, v. 90, n. 7, p. 973-979, 2003.
- JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91-110, 2005.
- JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 196-223, 2001.
- JIMÉNEZ, V. M.; THOMAS, C. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. **Plant Cells Monographs**, v. 2, p. 103-118, 2005.
- JUNAID, A.; MUJIB, A.; BHAT, M. A.; SHARMA, M. P.; ŠAMAJ, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Catharanthus roseus*. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 4, p. 641-646, 2007.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v. 27, p. 137-138, 1965.
- KINTZIOS, S.; MANOS, C.; MAKRI, O. Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (*Rosa* sp.). **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 467-472, 1999.
- 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, 2004.
- KONIECZNY, R.; SLIWINSKA, E.; PILARSKA, M.; TULEJA, M. Morphohistological and flow cytometric analysis of somatic embryogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 131-141, 2012.
- KUMAR, G. K.; THOMAS, T. D. High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Clitoria ternatea* Linn. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, p.141-151, 2012.
- KUMAR, S. P.; KUMARI, B. D. R. Factors affecting on somatic embryogenesis of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) at morphological and biochemical levels. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 7, n. 2, p. 197-205, 2011.
- KURCZYNSKA, E. U.; GAJ, M. D.; UJCZAK, A.; MAZUR, E. Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Planta**, v. 226, p. 619-628, 2007.

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.

LAKSHMANAN, P. Somatic embryogenesis in sugarcane. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 201-205, 2006.

LANGE, A. H. The effect of temperature and photoperiod on the growth of *Carica papaya*. **Ecology**, v. 42, p. 481-486, 1961.

LAPARRA, H.; BRONNER, R.; HAHNE, G. Histological analysis of somatic embryogenesis induced in leaf explants of *Helianthus smithii* Heiser. **Protoplasma**, v. 196, p. 1-11, 1997.

LENIS-MANZANO, S. J.; ARAUJO, A. C. G. de; VALLE, C. B. do; SANTANA, E. de F.; CARNEIRO, V. T. de C. Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de *Urochloa brizantha* apomítica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p.435-441, 2010.

LINACERO, R.; LÓPEZ-BILBAO, M. G.; VÁSQUEZ, A. M. Expression of different abscisic acid-responsive genes during somatic embryogenesis (*Saccharum officinarum*). **Protoplasma**, v. 217, n. 4, p. 199-204, 2001.

LOISEAU, J.; MARCHE, C.; DEUNFF, Y. L. Effects of auxins, cytokinins, carbohydrates and amino acids on somatic embryogenesis induction from shoot apices of pea. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 41, p. 267-275, 1995.

LÓPEZ-PÉREZ, A. J.; CARREÑO, J.; MARTÍNEZ-CUTILLAS, A.; DABAUZA, M. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. **Vitis**, v. 44, n. 2, p. 79–85, 2005.

LOSCHIAVO, F. Early events in embryogenesis. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) **Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin, Springer-Verlag, v. 30, p. 20-29, 1995.

LOSCHIAVO, F.; PITTO, L.; COZZANI, F.; VALLONE, D.; TERZI, M. Modulation of auxin binding proteins in cell suspensions proteins in cell suspensions. I. Differential responses of carrot embryo cultures. **Plant Physiology**, v. 97, p. 60-64, 1991.

MACIEL, S de A.; FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SILVA, R. A. da; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p. 263-267, 2010.

MAGALHÃES, J. S.; SANTOS, M. D. M.; CUNHA FILHO, F. N.; BLUMER, L.; GUERRA, M. P.; TORRES, A.C. Indução de embriogênese somática em genótipos de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 79-83, 2006.

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.

MALABADI, R. B.; STADEN, J. V. Storability and germination of sodium alginate encapsulated somatic embryos derived from the vegetative shoot apices of mature *Pinus patula* trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 259–265, 2005.

- MANCHANDA, P.; GOSAL, S. S. Effect of activated charcoal, carbon sources and gelling agents on direct somatic embryogenesis and regeneration in sugarcane via leaf roll segments. **Sugar Tech**, v. 14, n. 2, p. 168-173, 2012.
- MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.) **In Vitro Embryogenesis in Plants**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 155-203.
- MICHAUX-FERRIÈRE, N.; SCHWENDIMAN, J. Histology of somatic embryogenesis. In: DATTÉE, Y.; DUMAS, C.; GALLIS, A. (Eds.). **Reproductive biology and plant breeding**. Biotrop-CIRAD: Springer-Verlag, 1992, p. 247-259.
- MIROSHNICHENKO, D.; FILIPPOV, M.; DOLGOV, S. Effects of daminozide on somatic embryogenesis from immature and mature embryos of wheat. **Australian Journal of Crop Science**, v. 3, n. 2, p. 83-94, 2009.
- MONNIER, M. Culture of zygotic embryos. In: THORPE, T. A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 117-153.
- MOTOIKE, S. Y.; SARAIVA, E. S.; VENTRELLA, M. C.; SILVA, C. V.; SALOMÃO, L. C. Somatic embryogenesis of *Myrciaria aureana* (Brazilian grape tree). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, n. 1, p. 75-81, 2007.
- 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.
- O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Termarcarphi Pty, Melbourne. 1981.
- OLIVEIRA, M. J. V.; SCHMILDT, E. R.; COELHO, R. I.; AMARAL, J. A. T.; CRUZ, T. P. Níveis de ANA no enraizamento *ex vitro* de microestacas de mamoeiro 'Tainung 01' oriundas de meios MS contendo baixa e alta concentração de auxina. In: **III Simpósio Papaya Brasil**, p. 341-343, 2007.
- OWEN, H. R.; WENGERD, D.; MILLER, A. R. Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal and medium storage method. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 583-586, 1991.
- PEREIRA, P. I. P.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; BANDUPRIYA, H. D. D.; YAKANDAWALA, D. M. D.; WEERAKOON, L. K. Androgenic potencial in coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 167-176, 2008.
- PÉREZ, A.; REYES, M. N.; CUEVAS, J. Germination of two papaya varieties: effect of seed aeration, K-treatment, removing of the sarcotesta, high temperature, soaking in distilled water and age of seeds. **Journal Agricultural University of Puerto Rico**, v. 64, p. 173-180, 1980.
- PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. E. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.1, p.155-164, 2008.
- PINTO, D. L. P.; ALMEIDA, A. M. R. de; RÊGO, M. M.; SILVA, M. L. da; OLIVEIRA, E. J. de; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of



commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, p. 521–530, 2011.

PORTO, J. M. P.; PAIVA, P. D. de O.; PAIVA, R.; CARVALHO, M. A. de F.; SOUZA, A. C. de; SILVA, L. C. Análise citoquímica de calos embriogênicos de ipê-branco. In: **XIX Congresso de Pós-Graduação da UFLA**, 2010.

RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. C. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, v. 81, p. 93-107, 1995.

RAGHAVAN, C.; ONG, E. K.; DALLING, M. J.; STEVENSON, T. W. Effect of herbicidal application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*. **Functional and Integrative Genomics**, v. 5, p. 4-17, 2005.

RAGHAVAN, C.; ONG, E. K.; DALLING, M. J.; STEVENSON, T. W. Regulation of genes associated with auxin, ethylene and ABA pathways by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*. **Functional and Integrative Genomics**, v. 6, p. 60-70, 2006.

RAJASEKARAN, K.; HEIN, M. B.; VASIL, I. K. Endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of *Pennisetum purpureum* Schum: effects *in vivo* and *in vitro* of glyphosate, fluridone and paclobutrazol. **Plant Physiology**, v. 84, p. 47-51, 1987.

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.

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.

RENUKDAS, N.; MOHAN, M. L.; KHUSPE, S. S.; RAWAL, S. K. Influence of phytohormones, culture conditions and ethylene antagonists on somatic embryo maturation and plant regeneration in papaya. **International Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 2, p. 151-160, 2006.

ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; SILVA, L.C. da; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v. 249, p. 747-758, 2012.

ROSE, R. J.; MANTIRI, F. R.; KURDYUKOV, S.; CHEN, S. K.; WANG, X. D.; NOLAN, K. E.; SHEAHAN, M. B. Developmental biology of somatic embryogenesis. **Plant developmental biology - biotechnological perspectives**, v.2, p. 3-26, 2010.

SAHA, M.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Somatic embryogenesis in different varieties of *Caica papaya* L. **Journal of Tissue Research**, v. 4, n. 1, p. 143-145, 2004.

SALAJ, T.; MATÚŠOVÁ, R.; SALAJ, J. The effect of carbohydrates and polyethylene glycol on somatic embryo maturation in hybrid fir *Abies alba* × *Abies numidica*. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 46, p. 159-167, 2004.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, v. 98, p. 301-308, 2006.

SANTANA-BUZZY, N.; LÓPEZ-PUC, G.; CANTO-FLICK, A.; BARREDO-POOL, F.; BALAM-UC, E.; AVILÉS-VIÑAS, S.; SOLÍS-MARROQUÍN, D.; LECONA-GUZMÁN, C.; BELLO-BELLO, J. J.; GÓMEZ-UC, E.; MIJANGOS-CORTÉS, J. O. Ontogenesis of the somatic embryogenesis of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). **HortScience**, v. 44, n. 1, p. 113-118, 2009.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O.; COELHO, R. I.; RABELLO, W. S.; MARTINS-FILHO, S. Níveis de ácido indol butírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro 'Tainung 01'. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, p. 125-129, 2010.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O. Sacarose na fase de enraizamento *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'. **Scientia Agrária**, v. 8, n. 1, p. 25-31, 2007.

SHARP, W. R.; SONDAHL, M. R.; CALDAS, L. S.; MARAFFA, S. B. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, v. 2, p. 268-310, 1980.

SILVA, C. V. **Estudo morfoanatómico de embriões zigóticos e somáticos de jabuticaba-branca (*Myrciaria* sp.)**. 2005, 57f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2005.

SILVA, M. L. da; PINTO, D. L. P.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 47-54, 2009.

SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; CALLADO, C. H.; CASTRO, T. C. de; 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.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; ANDRADE, J. B. R.; BALBUENA, T. S.; GUERRA, M. P.; HANDRO, W.; FLOH, E. I. S.; SILVEIRA, V. *Araucaria angustifolia* Biotechnology. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v. 2, p. 20-28, 2008.

STEINER, N.; VIEIRA, F. do N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 895-903, 2005.

STUART, D. A.; McCALL, C. M. Induction of Somatic Embryogenesis Using Side Chain and Ring Modified Forms of Phenoxy Acid Growth Regulators. **Plant Physiology**, v. 99, p. 111-118, 1992.

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.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. p. 465, 2009.

TARRÉ, E.; MAGIOLI, C.; MARGIS-PINHEIRO, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E.; SANTIAGO-FERNANDES, L. D. R. *In vitro* somatic embryogenesis and adventitious root initiation have a common origin in eggplant (*Solanum melongena* L.). **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, p.79-84, 2004.

TEIXEIRA, M. T.; TEIXEIRA, S. L. Estabelecimento de segmentos apicais de mamoeiro *in vitro*. **Revista Ceres**, v. 51, p. 477-483, 2004.

- TOKUHISA, D.; DIAS, D. C. F. dos S.; ALVARENGA, E. M.; DIAS, L. A. dos S.; MARIN, S. L. D. Época de colheita dos frutos e ocorrência de dormência em sementes de mamão (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, p.75-80, 2008.
- TOKUHISA, D.; DIAS, D. C. F. dos S.; ALVARENGA, E. M.; DIAS, L. A. dos S.; MARIN, S. L. D. Tratamentos para superação da dormência em sementes de mamão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, p. 131-139, 2007.
- TREMBLAY, L.; LEVASSEUR, C.; TREMBLAY, F. M. Frequency of somaclonal variation in plant of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. **American Journal of Botany**, v. 86, p. 1373-1381, 1999.
- TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. **Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises**. New York, CRC Press, Inc. 1996. 374 pp.
- VAN ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.
- VASIL, I.K. Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. **Bio/Technology**, v.6, p. 397-402, 1988.
- VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDEMANGE, F.; ESCOUTE, J.; FERRIÈRE, N.; NICOLE, M. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, v. 88, p. 9-18, 2001.
- VIGGIANO, J. R.; SILVA, R. F.; VIEIRA, H. D. Ocorrência de dormência em sementes de mamão (*Carica papaya* L.). **SementesOnline**, v.1, p. 6-10, 2000.
- VOOKOVÁ, B.; KORMUTÁK, A. Some features of somatic embryo maturation of algerian fir. **In Vitro Cell and Developmental Biology**, v. 38, p. 549-551, 2002.
- WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462, 1986.
- YOU, X. L.; TAN, X.; DAI, J. L.; LI, Y. H.; CHOI, Y. E. Large-scale somatic embryogenesis and regeneration of *Panax notoginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, n. 25, p. 333-338, 2011.
- YU, T-A.; YEH, S-D.; YANG, J-S. Comparison of the effects of kanamycin and geneticin on regeneration of papaya from root tissue. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 169-178, 2003.
- ZAVATTIERI, M. A.; FREDERICO, A. M.; LIMA, M.; SABINO, R.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2010.
- ZIMMERMANN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, p.1411-1423, 1993.
- ZIMMERNANN, M. J. Embriogênese Somática. In: CID, L.P.B. (Ed.) **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, p. 67-102, 2010.

## ANEXOS

**ANEXO 1.** Resumo da análise de variância para embriogênese somática de mamoeiro seleção THB, utilizando 2,4-D no meio de indução

FV	GL	Valor de Quadrado Médio							
		Calogênese	Calo	Nº médio	Frequência	Tipos de embriões somáticos			
		(%)	Embriogênico (%)	de ES	(ES calo <sup>-1</sup> )	Globular	Cordiforme	Torpedo	Cotiledonar
Explantes	1	4,489 <sup>ns</sup>	27034,8 <sup>**</sup>	3097,6 <sup>**</sup>	13,759 <sup>**</sup>	705,60 <sup>**</sup>	291,60 <sup>**</sup>	112,22 <sup>**</sup>	15,62 <sup>ns</sup>
Conc	4	1,683 <sup>ns</sup>	86,621 <sup>ns</sup>	69,587 <sup>ns</sup>	0,310 <sup>ns</sup>	14,90 <sup>ns</sup>	4,66 <sup>ns</sup>	4,28 <sup>ns</sup>	1,69 <sup>ns</sup>
Exp X Conc	4	7,295 <sup>ns</sup>	64,676 <sup>ns</sup>	57,037 <sup>ns</sup>	0,254 <sup>ns</sup>	8,22 <sup>ns</sup>	3,41 <sup>ns</sup>	4,29 <sup>ns</sup>	1,69 <sup>ns</sup>
Resíduo	30	8,229	43,575	81,967	0,364	16,30	7,62	3,87	4,07
Média		98,66	35,99	9,35	0,62	4,65	2,80	1,67	0,62

Legenda: ES. embriões somáticos; Conc. concentrações; Exp. explantes. <sup>\*\*</sup> Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F; <sup>ns</sup> Não significativo em nível de 5% pelo teste F.

**ANEXO 2.** Resumo da análise de variância para embriogênese somática de mamoeiro seleção THB, utilizando 4-CPA no meio de indução

FV	GL	Valor de Quadrado Médio							
		Calogênese (%)	Calo Embriogênico (%)	Nº médio de ES	Frequência (ES calo <sup>-1</sup> )	Tipos de embriões somáticos			
						Globular	Cordiforme	Torpedo	Cotiledonar
Explantes	1	0,0003 <sup>ns</sup>	51365,889 <sup>**</sup>	12638,025 <sup>**</sup>	56,169 <sup>**</sup>	1795,6 <sup>**</sup>	1155,62 <sup>*</sup>	525,62 <sup>*</sup>	216,22 <sup>**</sup>
Conc	4	107,203 <sup>ns</sup>	345,190 <sup>**</sup>	793,287 <sup>**</sup>	3,525 <sup>**</sup>	71,687 <sup>ns</sup>	134,12 <sup>ns</sup>	58,91 <sup>ns</sup>	8,56 <sup>ns</sup>
Exp X Conc	4	52,764 <sup>ns</sup>	136,056 <sup>ns</sup>	684,087 <sup>**</sup>	3,046 <sup>**</sup>	63,412 <sup>**</sup>	113,37 <sup>**</sup>	52,68 <sup>**</sup>	8,91 <sup>ns</sup>
Resíduo	30	58,471	85,478	100,308	0,446	7,176	21,75	6,52	3,57
Média		96,332	42,170	19,075	1,275	7,25	5,87	3,82	2,37

Legenda: ES. embriões somáticos; Conc. concentrações; Exp. explantes. <sup>\*</sup> Significativo em nível de 5% e <sup>\*\*</sup> Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F; <sup>ns</sup> Não significativo em nível de 5% pelo teste F.

**ANEXO 3.** Resumo da análise de variância para embriogênese somática de mamoeiro seleção THB em meio de maturação

FV	GL	Valor de Quadrado Médio	
		Frequência (ES calo <sup>-1</sup> )	ES germinado (%)
Meio de maturação	4	471,317**	238,134**
Resíduo	20	11,015	0,607
Média		54,088	9,88

Legenda: ES. embriões somáticos. \*\* Significativo em nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.