

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

KRISTHIANO CHAGAS
Magister Scientiae

**MATURAÇÃO E GERMINAÇÃO DE EMBRIÕES
SOMÁTICOS DO MAMOEIRO ‘GOLDEN THB’**

São Mateus, ES
Fevereiro de 2014

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

**MATURAÇÃO E GERMINAÇÃO DE EMBRIÕES
SOMÁTICOS DO MAMOEIRO ‘GOLDEN THB’**

KRISTHIANO CHAGAS

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 2014

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

Chagas, Kristhiano, 1988-
C433m Maturação e germinação de embriões somáticos do
mamoeiro 'Golden THB' / Kristhiano Chagas. – 2014.

54 f. : il.

Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre.

Coorientador: 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. Embriogênese somática. 3. Carboidratos. 4. Auxina.
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. III. Título.

CDU: 63

MATURAÇÃO E GERMINAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DO MAMOEIRO ‘GOLDEN THB’

KRISTHIANO CHAGAS

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

Aprovada em 20 de fevereiro de 2014

Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt
Universidade Federal do Espírito Santo
Centro Universitário Norte do Espírito
Santo
(Co-orientador)

Prof. Dr. José Carlos Lopes
Universidade Federal do Espírito Santo
Centro de Ciências Agrárias
(Co-orientador)

Prof. Dr. Omar Schmildt
Universidade Federal do Espírito Santo
Centro Universitário Norte do Espírito
Santo

Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre
Universidade Federal do Espírito Santo
Centro Universitário Norte do Espírito
Santo
(Orientador)

“Confia no senhor de todo o teu coração e, não te estribes no teu próprio entendimento. Reconhece-o em todos os teus caminhos e, Ele endireitará as tuas veredas. Feliz é o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire entendimento, pois melhor é o lucro que ela dá do que o lucro da prata, e a sua renda do que o ouro. Mais preciosa é do que as jóias, e nada do que possas desejar é comparável a ela”.

Provérbios 3: 5-6, 13-15 (Bíblia Sagrada)

Aos meus avós Norberto Marcelo Chagas, Maria Macrina Chagas, Antônio Vitorino Filho e Maria Bertulino, 'in memoriam', exemplos de caráter, decência, dignidade e simplicidade. Vocês me ensinaram as lições de vida mais importantes e estão para sempre em meu coração.

Aos meus pais, Suely Vitorino de Oliveira e Domingos Felix Chagas, pelo amor incondicional, educação, incentivo, confiança a mim depositada e por, incansavelmente, me darem toda atenção, carinho e suporte, que sempre precisei para que o outrora almejado se tornasse real.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao todo poderoso e eterno DEUS, o alfa e o ômega, o princípio e o fim. Por seu infinito, ímpar, incomensurável e transcendental amor. Sou grato a ti, ó DEUS, pois sem ti nada sou e nada posso fazer.

À minha mãe, Suely Vitorino de Oliveira, por me amar, pelas orações em meu favor, pelo apoio, por estar diretamente relacionada na formação do meu caráter e por me ensinar que sem luta não há vitória.

Ao meu pai, Domingos Felix Chagas, por me amar, pelo apoio, e pela incansável luta do dia a dia, na preocupação de sempre me oferecer o melhor.

Aos meus irmãos, cunhadas, sobrinhos, primos, tias e tios que lutaram pelo meu sucesso e sempre se preocuparam em me ensinar o que a vida tem de melhor a oferecer.

À minha namorada, Camila Soares de Castro, mesmo distante, sempre foi fonte de amor, carinho, suporte, apoio nas dificuldades, alegria nas vitórias e pela preocupação de sempre me oferecer o melhor.

Ao professor e amigo, Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre, pela orientação na condução deste e de outros trabalhos e ainda por possibilitar que o outrora sonhado se tornasse uma realidade.

Aos demais professores do curso de Agronomia pelo ensino, amizade e disponibilidade de sempre atender-me e expor seus conhecimentos em favor da minha formação.

Aos meus co-orientadores, professor Wagner Campos Otoni, professor Edilson Romais Schmildt e professor José Carlos Lopes pelas relevantes contribuições ao desenvolvimento do trabalho.

À professora Karina Carvalho Mancini e ao técnico Jairo Oliveira pelos auxílio nas análises de microscopia eletrônica do material.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo, sem a qual nada teria se tornado real.

Ao Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), por me acolher, permitir galgar mais um degrau, conferindo-me o título de Mestre em Agricultura Tropical.

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

Aos amigos Jamile, Poliana, Robson, Amanda, Helder, Joel, Francisco C. Rocha Neto, Francisco de Assis Ferreira, Alex, Alessandra, e demais colegas, pelo constante incentivo, bom humor e cumplicidade nos momentos de trabalho e, também, de diversão, dando-me forças nas horas de luta, apoio nas horas difíceis e alegria nas vitórias e, ainda, pelos trabalhos realizados juntos, “amigos para sempre é o que nós iremos ser. Na primavera ou em qualquer das estações [...]” (Jane & Herondy).

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

KRISTHIANO CHAGAS, filho de Domingos Felix Chagas e Suely Vitorino de Oliveira, nasceu na cidade de Linhares, ES, em 01 de abril de 1988. No ano de 2006 ingressou na primeira turma do curso de Agronomia da Universidade Federal do Espírito Santo no Centro Universitário Norte do Espírito Santo, onde se graduou em bacharelado no ano de 2012. No período de graduação, teve experiência na área de manejo e conservação do solo e água, fruticultura tropical, especificamente com maracujá e mamão, realizando pesquisas na área de propagação e produção dessas espécies frutíferas. Em 2012, ingressou no Programa de Pós-graduação de Mestrado em Agricultura Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, onde se obteve o título de mestre em Agricultura Tropical, trabalhando com propagação de plantas por meio da técnica de embriogênese somática, submetendo-se à defesa de dissertação em 20 de fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Cultura de tecidos.....	4
2.2 Embriogênese somática.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Material vegetal.....	10
3.2 Fase de indução.....	11
3.3 Fase de maturação.....	11
3.3.1 Experimento 1 – Polietilenoglicol (PEG) na maturação de embriões somáticos de mamoeiro ‘Golden THB’.....	11
3.3.2 Experimento 2 – Extrato de malte na maturação de embriões somáticos de mamoeiro ‘Golden THB’.....	12
3.4 Germinação.....	12
3.5 Preparação das amostras para microscopia.....	13
3.6 Microscopia eletrônica de varredura.....	13

3.7 Análise estatística.....	14
4. RESULTADOS.....	15
4.1 Maturação.....	15
4.1.1 Experimento 1 – Polietilenoglicol (PEG) na maturação de embriões somáticos de mamoeiro ‘Golden THB’.....	15
4.1.2 Experimento 2 – Extrato de malte na maturação de embriões somáticos de mamoeiro ‘Golden THB’.....	17
4.2 Germinação.....	22
5. DISCUSSÃO.....	24
5.1 Maturação.....	24
5.1.1 Experimento 1 – Polietilenoglicol (PEG) na maturação de embriões somáticos de mamoeiro ‘Golden THB’.....	24
5.1.2 Experimento 2 – Extrato de malte na maturação de embriões somáticos de mamoeiro ‘Golden THB’.....	25
5.2 Germinação.....	28
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	30
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

4-CPA: ácido 4-clorofenoxiacético
ABA: ácido abscísico
AIA: ácido indol-3-acético
ANA: ácido α -naftalenoacético
BAP: 6-benzilaminopurina
CA: carvão ativo
CO₂: Dióxido de carbono
CV: Coeficiente de variação
DIC: delineamento inteiramente casualizado
Dicamba: ácido 3,6-dicloroanísico
Ecor: embrião cordiforme
Eg: embrião globular
ES: embrião somático
ESG: embrião somático globular
ESN: embrião somático normal
Et: embrião torpedo
FC: folha cotiledonar
GA₃: ácido giberélico
GER: germinação
H XK: hexoquinase
Kin: cinetina
MG: meio de germinação
MI: meio de indução

MIPS: myo-inositol-3-fosfato sintase

MM1: meio de maturação 1

MM2: meio de maturação 2

MS: meio Murashige e Skoog

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NESC: número de embriões somáticos cordiforme

NESCA: número de embriões somáticos cotiledonar anormal

NESCG: número de embriões somáticos cotiledonar germinado

NESCN: número de embriões somáticos cotiledonar normal

NESCO: número de embriões somáticos cotiledonar

NESG; número de embriões somáticos germinado

NEST: número de embriões somáticos torpedo

NMR: número médio de raiz

NTES: número total de embriões somáticos

O_i: valores medidos

PEG: polietilenoglicol

pH: potencial hidrogeniônico

P_i: valores estimados

Picloran: ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico

PVC: policloroeteno

ROS: Espécie reativa de oxigênio

SERK: Quinase do receptor da embriogênese somática

RESUMO

CHAGAS, Kristhiano; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Fevereiro de 2014; **Maturação e germinação de embriões somáticos do mamoeiro 'Golden THB'**; Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre, Co-orientadores: Edilson Romais Schmildt, Wagner Campos Otoni e José Carlos Lopes.

Objetivou-se avaliar a maturação e germinação de embriões somáticos do mamoeiro 'Golden THB'. Para a obtenção dos embriões somáticos, folhas cotiledonares de plântulas de mamoeiro obtidas da germinação *in vitro*, em meio MS basal, foram inoculadas em meio de indução contendo sais de MS; *myo*-inositol (0,55 mM), sacarose (87,5 mM), ágar-ágar Vetec® (8 g L⁻¹) e suplementado com 4-CPA (ácido *p*-clorofenoxiacético) (25 µM). Após 50 dias, os calos embriogênicos foram transferidos para os meios de maturação: Experimento 1 (MM1) constituído de meio MS, ABA (0,5 µM, CA (15 g L⁻¹) e os tratamentos suplementados com diferentes concentrações de PEG 6000 (0; 40; 50; 60 e 70 g L⁻¹) durante 45 dias; Experimento 2 (MM2) constituído de meio MS, ABA (0,5 µM), CA (15 g L⁻¹) e os tratamentos suplementados com diferentes concentrações de extrato de malte (0,0; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 g L⁻¹) durante 45 dias. Os tratamentos foram compostos com quatro repetições de três placas de Petri de 100 mm × 20 mm, contendo quatro calos embriogênicos. Os embriões cotiledonares normais gerados no MM2 suplementado com ABA (0,5 µM), CA (15 g L⁻¹) e extrato de malte (0,2 g L⁻¹) foram transferidos para os meios de germinação (MG) formado pelo meio MS concentração total de sais, sacarose (87,5 mM), *myo*-inositol (0,0; 0,275; 0,550 e 0,825 mM) e ágar-ágar Vetec® (8 g L⁻¹). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias estudadas por análise de regressão. Os tratamentos com PEG foram inferiores e prejudicaram o processo de formação dos embriões e sua utilização na concentração de 70 g L⁻¹ reduz em 31,85% a produção de embriões somáticos total e normais do mamoeiro 'Golden THB'. Portanto, para a embriogênese somática do mamoeiro 'Goden THB' não se recomenda a maturação em meio contendo PEG 6000. A adição de extrato de malte (0,17 g L⁻¹), no meio de maturação potencializou o desenvolvimento embrionário de mamoeiro 'Golden THB', 45,40 ES calo⁻¹. Identificou-se a ocorrência de embriogênese somática secundária e a formação de embriões somáticos anormais. A suplementação de *myo*-inositol (0,45 mM) no meio MS proporcionou ganhos significativos na porcentagem de germinação de embriões somáticos e posterior conversão em plântulas de mamoeiro 'Golden THB'.

Palavras-chave: *Carica papaya* L., embriogênese somática, carboidratos, auxina.

ABSTRACT

CHAGAS, Kristhiano; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Fevereiro de 2014; **Maturation and germination of somatic embryos of papaya 'Golden THB'**; Adviser: Rodrigo Sobreira Alexandre, Committeed Members: Edilson Romais Schmildt, Wagner Campos Otoni and José Carlos Lopes.

This work aimed to evaluate the maturation and germination of somatic embryos of papaya 'Golden THB'. To obtain the somatic embryos, cotyledons of seedlings of papaya obtained from in vitro germination in MS basal medium, were inoculated into induction medium containing MS salts; myo-inositol (0.55 mM), sucrose (87.5 mM), agar Vetec® (8 g L⁻¹) supplemented with 4 -CPA (p-chlorophenoxyacetic acid) (25 mM). After 50 days, the calli were transferred to maturation medium: Experiment 1 (MM1) consisting of MS medium, ABA (0.5 mM), CA (15 g L⁻¹) and the treatments supplemented with different concentrations of PEG 6000 (0, 40, 50, 60 and 70 g L⁻¹) for 45 days; Experiment 2 (MM2), consisting of MS medium, ABA (0.5 mM), CA (15 g L⁻¹) and the supplemented treatments different concentrations of malt extract (0.0, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 g L⁻¹). During 45 days the treatments consisted of four replicates of three Petri dishes of 100 mm × 20 mm, containing four calli. The normal cotyledonary embryos generated in MM2 supplemented with ABA (0.5 mM), CA (15 g L⁻¹) and malt extract (0.2 g L⁻¹) were transferred to the germination medium (GM) formed by the total concentration of medium MS salts, sucrose (87.5 mM), myo-inositol (0.0, 0.275, 0.550 and 0.825 mM) and agar Vetec® (8 g L⁻¹). The data were subjected to analysis of variance and means studied by regression analysis. Treatment with PEG were lower and harmed the process of formation of embryos and their use at a concentration of 70 g L⁻¹ reduces by 31.85% of the total production and normal somatic embryos of papaya 'Golden THB'. So for somatic embryogenesis of papaya 'Goden THB' not recommended in the maturation medium containing PEG 6000. Adding malt extract (0.17 g L⁻¹) in the maturation medium potentiated the embryonic development of papaya 'Golden THB', 45.40 ES callus⁻¹. Identify the occurrence of secondary somatic embryogenesis and the formation of abnormal somatic embryos. The supplementation of myo-inositol (0.45 mM) in MS medium yielded significant gains in the percentage of germination of somatic embryos and conversion into plantlets papaya 'Golden THB'.

Keywords: *Carica papaya* L., somatic embryogenesis, carbohydrates, auxin.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no cenário mundial como um dos maiores produtores de mamão (*Carica papaya* L.) com aproximadamente 12% do volume global, sendo superado apenas pela Índia com 41,2% da produção mundial (FAO, 2014), apesar do índice de exportação brasileiro ainda ser considerado incipiente, com taxa menor que 2% (IBRAF, 2014; IBGE, 2014). O Brasil ocupa o segundo lugar na exportação mundial, superando a Malásia, porém com exportação inferior à do México, que é favorecido pela forte relação comercial com o vizinho Estados Unidos (KIST et al., 2012).

O cultivo do mamão vem ocupando uma área de aproximadamente 33 mil hectares em todo o País, com produtividade média de 50 t ha⁻¹, destacando-se as regiões Sudeste e Nordeste, com maior área e maior rendimento, respectivamente. O estado da Bahia ocupa a primeira posição no *ranking* nacional, respondendo por 45% da produção, seguida do Espírito Santo, com 31,93%, Ceará e Rio Grande do Norte, com um montante em torno de 10% (EMBRAPA, 2013).

No estado do Espírito Santo, o município de Pinheiros, e na Bahia os municípios de Prado e Porto Seguro são os maiores produtores de mamão do grupo Formosa (principalmente o híbrido 'Tainung 01'). Entretanto, no Espírito Santo os municípios de Linhares e Sooretama são os maiores produtores de mamão do grupo Solo (principalmente 'Golden' e 'Golden THB' para exportação e 'Sunrise Solo' para o mercado nacional) (SERRANO & CATTANEO, 2010).

Algumas características agronômicas positivas foram verificadas em acessos de 'Golden THB', como o predomínio de poucas flores estéreis e muitas

flores hermafroditas perfeitas, bem como ausência de carpeloidia e petandria; além de frutos com formato de pêra (QUINTAL et al., 2012), cultivar do grupo Solo, altamente produtivo, com plantas uniformes, vigorosas e de elevada sanidade. Os frutos são de ótima qualidade, uniformes, com ótimo padrão comercial, formato piriforme, e apresentam excelente coloração externa e interna. A polpa apresenta coloração alaranjada e de textura firme. O 'Golden THB', quando comparado a outros cv do grupo Solo apresenta como vantagem, plantas com porte baixo (2,0 a 2,5 m aos dois anos e meio de idade), facilitando ao produtor os tratos culturais e a colheita dos frutos (FELTRIN SEMENTES, 2009).

O mamoeiro possui essencialmente três tipos de flores, das quais originam plantas do sexo masculino, feminino e hermafrodita, esta última é preferível por produzir frutos de formato alongado, com variações de formato piriforme a cilíndrica, com pequena cavidade interna e maior valor comercial (DANTAS & CASTRO NETO, 2000). As plantas femininas produzem frutos de formato arredondado ou ligeiramente ovalado, cuja cavidade interna é grande e necessitam da fecundação por pólen de plantas masculinas ou hermafroditas para produzirem frutos (COSTA & PACOVA, 2003).

Entre plantas hermafroditas do grupo Solo, na descendência autofecundada é esperada a proporção de 2:1 entre hermafroditas e femininas (MA et al., 2004). Essa segregação exige que se faça a eliminação das plantas femininas em plantios comerciais, por ocasião do início do florescimento (3 a 5 meses após o plantio). Como não se conhece o sexo das plantas no início do plantio, os agricultores plantam pelo menos três mudas por cova, o que aumenta os custos de produção, além de afetar o desenvolvimento das plantas hermafroditas em razão da competição por água, luz e nutrientes.

Para a solução desses problemas, a propagação vegetativa é uma alternativa, e a embriogênese somática é um método de propagação vegetativa realizado por meio de processo de iniciação e desenvolvimento de embriões somáticos *in vitro*, a partir de células e tecidos somáticos, capazes de originar indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz e livre de doenças, principalmente pelo fato da cultura *in vitro* permitir obtenções de plantas axênicas.

Assim, objetivou-se neste trabalho estabelecer um meio de maturação favorável à formação dos embriões somáticos indiretos provenientes de folhas cotiledonares de mamoeiro 'Golden THB', bem como avaliar a sua germinação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Cultura de tecidos

Na cultura de tecidos alguns conceitos são muito importantes, como a totipotência, competência e determinação celular. Segundo Haberlandt (1902) totipotência celular é a capacidade que a célula apresenta de sofrer divisões e dar origem a um organismo inteiro. Células responsivas seriam aquelas que possuem sensibilidade, que foi definida por Trewavas (1981) como sendo a competência de um tecido em responder a um sinal específico. Determinação é o processo pelo qual o potencial de desenvolvimento de uma célula torna-se limitado a uma rota específica (CHRISTIANSON, 1985).

Um exemplo de tecido com baixa determinação e elevada competência para formação de embriões é o calo. O calo é considerado um tecido indiferenciado, ou pouco diferenciado, podendo ser induzido, tornando-se determinado e, finalmente sofrer diferenciação para formar embriões somáticos, conforme o balanço hormonal aplicado (SKOOG & MILLER, 1957).

Diversos fatores influenciam no êxito do cultivo de tecidos, como o tipo de explantes, a desinfestação, o meio de cultura, os fitohormônios endógenos, a adição de substâncias reguladoras do crescimento no meio, a concentração osmótica, a luz e a temperatura. O sucesso na tecnologia e aplicação dos métodos de cultura *in vitro* deve-se a uma melhor compreensão dos requerimentos nutricionais das células e tecidos em cultura. Os dois fatores que mais frequentemente determinam o sucesso da cultura de tecidos vegetais são a origem do explante e o meio nutritivo

onde são cultivados, este composto por elementos essenciais e por componentes opcionais.

2.2 - Embriogênese Somática

A embriogênese *in vitro* foi descrita pela primeira vez por Steward et al. (1958), em cultivo de células isoladas de raiz de cenoura. A embriogênese somática exerce um papel importante na variação genética, hibridização somática e variação somaclonal, considerando-se que a expressão diferencial de um gene em células somáticas abrange a mudança na programação de desenvolvimento dessas células, culminando na capacidade de manifestar o potencial embriogênico (ZENG et al., 2006).

Morfologicamente, os embriões somáticos apresentam desenvolvimento muito semelhante ao do embrião zigótico. No início há uma diferenciação estrutural bipolar, que consiste do ápice caulinar e radicular, passando pelos estádios de desenvolvimento embrionários: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA et al., 1999).

O início da embriogênese somática se dá com a formação de células com competência embriogênica, seguida pela formação do embrião somático, maturação, germinação e conversão completa da plântula (VON ARNOLD et al., 2002). A competência embriogênica celular é a capacidade de responder a sinais específicos, tais como condições de cultura e concentração de fitorreguladores, sendo que a indução de embriões somáticos é a resposta a esses sinais (YEUNG, 1995).

A embriogênese pode acontecer diretamente no tecido (via direta), na ausência de calo ou a partir deste (via indireta), que apresenta células em divisão desorganizadas, em diferentes estádios de diferenciação, das quais se originam os pró-embriões, comumente com o uso de altas concentrações de auxinas (GUERRA et al., 1999).

A embriogênese somática é técnica pela qual as células somáticas se desenvolvem à estruturas que se assemelham a embriões zigóticos, isto é, bipolar e

sem conexão vascular ao tecido parental, com estádios embriológicos característicos, sem fusão de gametas (JIMÉNEZ, 2001).

Para que ocorra o processo de embriogênese somática, as células diferenciadas devem, antes de tudo, ser desdiferenciadas depois da divisão celular, para estarem determinadas como células embriogênicas e posteriormente serem rediferenciadas (PASQUAL et al., 1997). As células somáticas adquirem características embriogênicas por meio de uma completa reorganização do estágio celular, incluindo a fisiologia, o metabolismo e a expressão gênica (FEHÉR et al., 2003). 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 (CASTILLO et al., 1998; ALMEIDA et al., 2001; ASCENCIO-CABRAL et al., 2008; SUN et al., 2011; ANANDAN et al., 2012), tecidos vegetais utilizados (FARZANA et al., 2008), genótipo (MALABADI et al., 2011; VALE, 2013) e níveis hormonais no explante (PERES et al., 1997; JIMÉNEZ et al., 2005; BISPO et al., 2007).

Acredita-se que as auxinas sintéticas em altas concentrações têm efeito na indução da embriogênese somática relacionada à sinalização e como um componente que gere estresse (FEHER et al., 2003). Em geral, na maioria dos modelos de embriogênese somática *in vitro*, as auxinas, a exemplo o 2,4-D, são consideradas substâncias responsáveis pelo desencadeamento dos processos de desdiferenciação (modelos indiretos) e rediferenciação (modelos diretos), alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (GUERRA et al., 1999).

Porém, outras auxinas também já foram utilizadas para a indução de embriogênese somática em diversas espécies, como o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) em cana-de-açúcar (GARCIA et al., 2007); ácido α -naftalenoacético (ANA) em mamão (FARZANA et al., 2008); ácido 4-clorofenoxiacético (4-CPA) em goiaba 'Paluma' (MOURA & MOTOIKE, 2009) e

Cleome rosea Vahl. (SIMÕES et al., 2010), e ácido 3,6-dicloroanísico (Dicamba) em *Cedrela odorata* L. (PEÑA-RAMÍREZ, 2011).

A embriogênese somática ainda necessita de maiores estudos para a definição do sinal que inicia esse processo. A aquisição da competência embriogênica e desenvolvimento do embrião parecem ser controlados por uma combinação da regulação espacial e temporal de genes específicos. Esses genes podem ser divididos em dois grupos: promotores e repressores da embriogênese somática, sendo que entre os promotores o melhor caracterizado é o SERK (Embriogênese Somática Quinase Receptor), isolado de células embriogênicas de várias espécies, dentre elas, cenoura (SCHMIDT et al., 1997), *Bracchiaria* spp. (KOEHLER, 2010), *Ananas comosus* (MA et al., 2012) e *Cyclamen persicum* Mill (SAVONA et al., 2012) e

Após a indução, a fase de maturação 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).

O processo de maturação é uma etapa crítica no desenvolvimento do embrião somático. Esta fase é distinta pela expansão, diferenciação e acúmulo de substância de reserva do embrião, assim sendo determinante na germinação e conversão bem sucedida dos embriões somáticos (MISHRA et al., 2012). As principais substâncias promotoras de maturação são o ácido abscísico (ABA); agentes osmóticos, como polietilenoglicol (PEG), carboidratos, hexitois e carvão ativado (LAKSHMANAN, 2005).

A adição de ABA no meio de cultura para estimular o processo de maturação é amplamente utilizada para diversas espécies como em *Cocos nucifera* L. (FERNANDO & GAMAGE, 2000), *Pinus patula* (MALABADI & STADEN, 2005), *Carica papaya* (FARZANA et al., 2008), *Jarilla heterophylla* (NUÑO-AYALA et al., 2012), *Brassica napus* (AHMADI et al., 2014) e *Oryza sativa* (MATSUNO & FUJIMURA, 2014). Na ausência de ABA, a maturação resulta em embriões

somáticos pouco desenvolvidos e frequentemente anormais, apresentando baixa capacidade para a germinação e desenvolvimento da planta (DETONI, 2013).

Em mamoeiro cv. Co7, a maturação de embriões somáticos apresentou correlação positiva com o aumento da concentração de ABA (ANANDAN et al., 2012). Portanto, segundo estes autores, a maior concentração de ABA (39,72 μM) resultou num maior rendimento de embriões em estágio cotiledonares e na sua ausência ou em menores concentrações de ABA resultou na produção de um número de embriões, na qual a maioria era anormal.

Em outros trabalhos, como o de Finkelstien e Crouch (1986), verifica-se que a maturação de embriões de *Brassica napus* L. cv. Tower está frequentemente associada ao baixo potencial osmótico do meio de cultura.

A osmolaridade está relacionada com alguns componentes do meio de cultivo, como por exemplo, o polietilenoglicol (PEG), que é um agente osmótico não plasmolizante, com moléculas de alto peso molecular que não são capazes de atravessar a parede celular, que conduz a uma restrição da absorção de água, uma reduzida pressão de turgescência e à redução no potencial osmótico intracelular (MISRA et al., 1993), conduzindo à dessecação. Essa dessecação induzida pelo PEG no meio de cultura pode estimular a produção endógena de ácido abscísico (ABA), que é o responsável pela síntese de substâncias de reserva importantes para as demais fases do desenvolvimento do embrião, como as proteínas LEA (*Late Embryogenesis Accumulated*). O PEG também pode atuar no controle da expressão de diversos genes responsáveis pela divisão, diferenciação e desenvolvimento do meristema apical do caule (STASOLLA et al., 2003a). Smulders et al. (2011) propuseram que esse tipo de estresses também pode provocar modificações na metilação do DNA.

De acordo com Rancé et al. (1994), os tratamentos de dessecação do embrião, como o produzido pelo PEG, podem resultar em rápidas mudanças bioquímicas, desencadeando a atividade de proteínas específicas. Em *Prosopis laevigata* (BUENDÍA-GONZÁLEZ et al., 2012), a presença de PEG foi essencial para a conversão dos embriões somáticos em plântulas, que só teve início com a indução do estresse hídrico induzido pelo PEG.

Outras substâncias como o carvão ativado é frequentemente adicionado a formulações no meio de cultura, para complexar compostos indesejáveis e assim melhorar as respostas morfogênicas dos explantes (SÁENZ et al., 2010).

Trabalhando com a embriogênese somática de mandioca, Groll et al. (2002) demonstraram que a suplementação do meio com carvão ativado teve efeito positivo na diferenciação e posterior germinação dos embriões somáticos. Krajňáková et al. (2009) obtiveram a melhor porcentagem de germinação com embriões somáticos de *Abies cephalonica*, quando estes amadureceram em meios suplementados com 21,6% de carvão ativo (CA).

A interação positiva do ácido abscísico com o carvão ativado no desenvolvimento e na produção de embriões somáticos foi observada por Pullman et al. (2005), na progressão da embriogênese e na melhoria da morfologia dos embriões.

Embriões somáticos podem ser transferidos para diferentes meios de germinação, que pode ser suplementado com ácido giberélico (GA₃) (KAYIM & KOC, 2006; ABREU, 2010; NUÑO-AYALA et al., 2012); com diferentes combinações de citocininas e auxinas (CLARINDO et al., 2008; SUN et al., 2011), ou desprovido de fitorreguladores de crescimento (SIMÕES et al., 2010; TEXEIRA et al., 2011; PINHEIRO et al., 2012), para que ocorra a conversão em plântulas. O sucesso dessa etapa, que culmina com a formação de plântulas normais, é dependente da formação de embriões normais no processo de maturação (DETONI, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

A germinação de sementes *in vitro* para a obtenção de explantes e a embriogênese somática foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais no Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), localizado no *Campus* Universitário São Mateus-ES.

As sementes foram retiradas de frutos de mamoeiro 'Golden THB' em estágio cinco de maturação, fase em que mais de 75% da superfície do fruto apresenta coloração amarela, feita a remoção da sarcotesta pelo método 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®, Brasil), com a adição de três gotas de Tween-20®, 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, *myo*-inositol (0,55 mM), sacarose (87,5 mM) e ágar-ágar Vetec® (8 g L⁻¹), pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da adição do ágar e posterior autoclavado por 20 minutos a temperatura de 121 °C e à pressão de 1,05 kg cm⁻². As culturas foram mantidas em estufa incubadora com temperatura alternada 20-30 °C, com

fotoperíodo de 12 horas, fornecendo uma intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fluxo de fótons fotossintéticos. Após o rompimento do tegumento e início da protrusão da raiz primária, as sementes foram colocadas no escuro, mantendo-se a alternância da temperatura.

3.2 Fase de indução

Em câmara de fluxo laminar, as folhas cotiledonares (FC) extraídas de plântulas cultivadas *in vitro* com idade de 30 dias, foram inoculados em placas de Petri de vidro estéreis 100 x 20 mm, contendo meio de indução (MI) de embriogênese somática formado pelo meio MS, *myo*-inositol (0,55 mM), sacarose (87,5 mM), ágar-ágar (8 g L^{-1}) e suplementado com 4-CPA - ácido 4-clorofenoxiacético (25 μM). O MI teve o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da adição do ágar, posterior autoclavado por 20 minutos a temperatura de 121°C e à pressão de $1,05 \text{ kg cm}^{-2}$.

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 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por 50 dias.

3.3 Fase de maturação

3.3.1 Experimento 1 – Polietilenoglicol (PEG) na maturação de embriões somáticos de mamoeiro ‘Golden THB’.

Após 50 dias no MI com 4-CPA (25 μM), os calos embriogênicos foram transferidos para os meios de maturação (MM1) formado pelo meio MS, *myo*-inositol (0,55 mM), sacarose (87,5 mM), ágar-ágar Vetec® (8 g L^{-1}) e suplementado com ácido abscísico - ABA (0,5 μM), carvão ativo - CA (15 g L^{-1}) e os tratamentos consistindo em diferentes concentrações de polietilenoglicol - PEG 6000 (0; 40; 50; 60 e 70 g L^{-1}). Todos os meios foram autoclavado por 20 minutos a temperatura de 121°C e à pressão de $1,05 \text{ kg cm}^{-2}$ e posterior vertidos em placas de Petri de vidro estéreis 100 x 20 mm, vedadas com filme plástico PVC e mantidas em câmara

incubadora com temperatura a 27 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas, fornecendo uma intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fluxo de fótons fotossintéticos, por 45 dias. Com auxílio de um microscópio estéreo Motic® modelo SMZ 168 provido de lentes oculares com o aumento de 10x e a objetiva regulada em 1,5x, foram avaliados: número total de embriões somáticos; número de embriões cotiledonares normais; número de embriões cotiledonares anormais; número de embriões cotiledonares germinados.

3.3.2 Experimento 2 – Extrato de malte na maturação de embriões somáticos de mamoeiro ‘Golden THB’.

Após 50 dias no MI com 4-CPA (25 μM), os calos embriogênicos foram transferidos para os meios de maturação (MM2) formados pelo meio MS, *myo*-inositol (0,55 mM), sacarose (87,5 mM), ágar-ágar Vetec® (8 g L⁻¹) e suplementado com ácido abscísico - ABA (0,5 μM), carvão ativo - CA (15 g L⁻¹) e os tratamentos consistindo em diferentes concentrações de extrato de malte (0,0; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 g L⁻¹). Todos os meios foram autoclavado por 20 minutos a temperatura de 121 °C e à pressão de 1,05 kg cm⁻² e posterior vertidos em placas de Petri de vidro estéreis 100 x 20 mm, vedadas com filme plástico PVC e mantidas em câmara incubadora com temperatura a 27 ± 1 °C, e fotoperíodo de 12 horas fornecendo uma intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fluxo de fótons fotossintéticos, por 45 dias. Com auxílio de um microscópio estéreo Motic® modelo SMZ 168 provido de lentes oculares com o aumento de 10x e a objetiva regulada em 1,5x, foram avaliados: número total de embriões somáticos; número de embriões globulares; número de embriões cordiforme; número de embriões torpedo; número de embriões cotiledonares; número de embriões cotiledonares normais; número de embriões cotiledonares anormais; número de embriões cotiledonares germinados.

3.4 Germinação

Embriões cotiledonares normais gerados no MM2 suplementado com ABA (0,5 μM), CA (15 g L⁻¹) e extrato de malte (0,2 g L⁻¹) foram transferidos para os meios

de germinação (MG), formado pelo meio MS, sacarose (87,5 mM), ágar-ágar Vetec® (8 g L⁻¹) e os tratamentos consistindo em diferentes concentrações de *myo*-inositol (0,0; 0,275; 0,550; 0,825 mM). Todos os meios foram autoclavado por 20 minutos a temperatura de 121 °C e à pressão de 1,05 kg cm⁻² e posterior vertidos em placas de Petri estéreis de poliestireno 90 x 15 m, vedadas com filme plástico PVC e mantidas em câmara incubadora com temperatura a 27 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas fornecendo uma intensidade luminosa de 60 μmol m⁻² s⁻¹ de fluxo de fótons fotossintéticos, por 30 dias. Foram avaliadas porcentagem de germinação e número de médio de raízes.

3.5 Preparação das amostras para microscopia

As amostras foram compostas apenas por tratamentos com extrato de malte (0,2 g L⁻¹), uma vez que em meio de maturação, as respostas embriogênicas foram satisfatórias nesse tratamento. A fixação foi feita em solução de 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).

3.6 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras fixadas foram desidratadas em série etílica até álcool absoluto e feita a secagem em ponto crítico com CO₂ (Autosamdri 815, Tousimis®), colocadas em “stubs” e submetidas à deposição metálica com ouro, pelo processo de pulverização catódica (Desk V, Denton Vacuum®). As análises e fotodocumentação foram conduzidas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (JSM – 6610LV, Jeol®) 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

Nos experimentos da fase de maturação utilizaram-se calos provenientes de explantes de folha cotiledonar utilizando 4-CPA (25 µM). Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições formadas por três placas de Petri, contendo quatro explantes cada, totalizando 48 explantes por tratamento.

A fase de germinação foi realizada em DIC, composto por quatro tratamentos com cinco repetições formadas por quatro placas de Petri, contendo cinco embriões somáticos, totalizando 100 embriões somáticos para cada tratamento.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias estudadas por análise de regressão, com o auxílio do Programa GENES (CRUZ, 2013). A raiz quadrada do quadrado médio do erro (RQQME) foi obtida pela formula:

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Pi - Oi)^2}{N}}$$

em que: Pi - valores estimados; Oi - valores medidos; N - número de observações.

A raiz quadrada do quadrado médio do erro (RQQME) informa sobre o valor real do erro produzido pelo modelo (SOUZA et al., 2011). Comumente sua utilização visa expressar a acurácia dos resultados numéricos com a vantagem de que a RQQME apresenta valores do erro nas mesmas dimensões da variável analisada (HALLAK & PEREIRA FILHO, 2011). O maior valor de RQQME foi para o número total de embriões somáticos (6,67). Quanto menor for esta medida, melhor será o desempenho dos modelos em fazer estimativas, portanto, o número de embriões cotiledonares germinados, por apresentar a menor média, apresentou o melhor desempenho (SOUZA & ESCOBEDO, 2013).

4. RESULTADOS

4.1 Maturação

4.1.1 Experimento 1 – Polietilenoglicol (PEG) na maturação de embriões somáticos de mamoeiro 'Golden THB'.

Na maturação de embriões somáticos de mamoeiro 'Golden THB', em diferentes concentrações de polietilenoglicol 6000, os números totais de embriões somáticos, de embriões somáticos cotiledonares normais e de embriões somáticos cotiledonares germinados apresentaram diferença significativa pelo teste de F em nível de 1% de probabilidade. Entretanto, para o número de embriões somáticos cotiledonares anormais não foi verificada diferença significativa em nível de 5% de probabilidade, com média de 6,54 (Tabela 1). Estas variáveis foram estudadas pela análise de regressão, das quais, apenas a contagem de embriões somáticos cotiledonares germinados apresentou comportamento quadrático, enquanto as demais foram lineares (Figura 1), a maior raiz quadrada do quadrado médio do erro (1,2373) foi observada para o número total de embriões. A ausência de PEG 6000 na maturação apresentou a maior média estimada de embriões somáticos totais por calo (17,58). Com o aumento das concentrações de PEG houve reduções no número de embriões somáticos totais até a concentração de 70,0 g L⁻¹ com 12 embriões por calo, diferença esta de 31,85% em relação ao controle (Figura 1A).

Tabela 1. Análise de variância para número total de embriões somáticos (NTES), número de embriões cotiledonares normais (NESC�), número de embriões cotiledonares anormais (ESCA) e número de embriões cotiledonares germinados (NESC�) de mamoeiro (*Carica papaya* L.) ‘Golden THB’ após 45 dias de cultivo em meio de maturação.

Variáveis	Variações entre	Variações dentro	F _{Calculado}	Médias	CV (%)
NTES	26,57	1,93	13,71**	14,03	9,91
NESC�	17,35	1,04	16,67**	5,91	17,23
NESCA	2,56	0,99	2,58 ^{ns}	6,54	15,22
NESC�	1,42	0,08	15,87**	1,26	23,74

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F; ^{ns} Não significativo.

Legenda: CV. Coeficiente de variação.

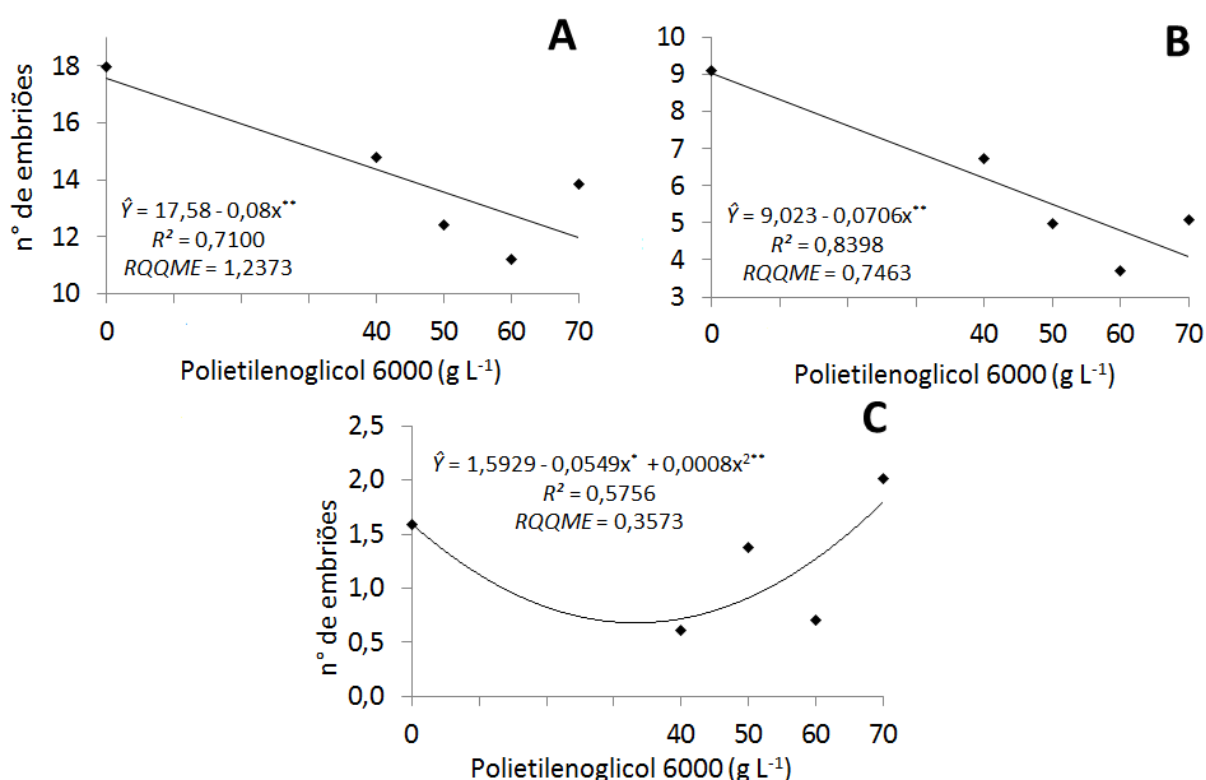


Figura 1. Número total de embriões somáticos (A), número de embriões cotiledonares normais (B) e número de embriões somáticos germinados (C) por calo de mamoeiro ‘Golden THB’, em meio de maturação com diferentes concentrações de polietilenoglicol 6000 (0; 40; 50; 60 e 70 g L⁻¹), após 45 dias de cultivo. * Significativo em nível de 5%; ** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

O número de embriões somáticos cotiledonares normais apresentou comportamento linear decrescente, em que o controle registrou maior média estimada de 9,02. Com o aumento das concentrações de PEG 6000 houve reduções

na normalidade dos embriões somáticos, em aproximadamente 54%, ao comparar a ausência com a máxima concentração estudada de 70 g L⁻¹ de PEG (Figura 1B).

Para o número de embriões somáticos germinados, o efeito foi quadrático, com o máximo de embriões somáticos germinados (1,66) na concentração de 70 g L⁻¹ de PEG 6000, em que na sua ausência o número de embriões germinados foi de 1,59 (Figura 1C).

4.1.2 Experimento 2 – Extrato de malte na maturação de embriões somáticos de mamoeiro ‘Golden THB’.

A maturação de embriões somáticos de mamoeiro ‘Golden THB’, em diferentes concentrações de extrato de malte, apresentou diferença significativa em nível de 1% de probabilidade para todas as variáveis analisadas (Tabela 2). Na análise de regressão, apenas o número de embriões somáticos cotiledonares germinados apresentou comportamento linear, os demais foram quadráticos. O menor valor da raiz quadrada do quadrado médio do erro observado (0,130) foi para o número de embriões cotiledonares germinados, enquanto o maior (6,673) foi para o número total de embriões somáticos.

Tabela 2. Análise de variância para número total de embriões somáticos (NTES), número de embriões globulares (NESG), número de embriões cordiforme (NESC), número de embriões torpedo (NEST), número de embriões cotiledonares (NESCO), número de embriões cotiledonares normais (NESC�), número de embriões cotiledonares anormais (NESCA) e número de embriões cotiledonares germinados (NESCG) de mamoeiro (*Carica papaya* L.) ‘Golden THB’ após 45 dias de cultivo em meio de maturação.

Variáveis	Variações entre	Variações dentro	F _{Calculado}	Médias	CV (%)
NTES	1129,85	6,90	192,39**	30,38	8,64
NESG	32,77	1,10	29,84**	3,44	30,45
NESC	8,97	0,08	110,35**	3,09	9,22
NEST	17,73	0,26	67,51**	4,57	11,19
NESCO	443,45	3,26	136,19**	18,35	9,83
NESC�	256,85	1,09	235,68**	12,03	8,68
NESCA	35,65	1,23	29,04**	6,31	17,56
NESCG	1,88	0,008	243,69**	0,91	9,62

** Significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F. Legenda: CV. Coeficiente de variação.

Após permanecer por um período de 45 dias em processo de maturação, a concentração estimada de extrato de malte de $0,17 \text{ g L}^{-1}$ resultou no maior número total de embriões somáticos por calo (45,40) (Tabela 3). As concentrações de 0,2; 0,3 e $0,4 \text{ g L}^{-1}$ apresentaram médias e reduções de embriões somáticos por calo em comparação à concentração de $0,17 \text{ g L}^{-1}$ de 44,72 (0,68); 33,22 (12,18) e 7,38 (38,02), respectivamente (Figura 2 A).

A falta de sincronismo no desenvolvimento dos embriões somáticos e em função da ocorrência de embriogênese somática secundária nos tratamentos com extrato de malte (Figura 3Q) houve o surgimento de embriões em diversas fases de diferenciação (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) no meio de maturação, ao utilizar extrato de malte. Portanto, na análise de regressão observa-se, para o número de embriões somáticos globulares (Figura 2B), cordiformes (Figura 2C), torpedos (Figura 2D) e cotiledonares (Figura 2E) efeito quadrático, seguindo tendências semelhantes à do número total de embriões somáticos. A concentração de extrato de malte de $0,18 \text{ g L}^{-1}$ resultou no maior número estimado de embriões somáticos globulares ($6,05 \text{ calo}^{-1}$) (Figura 2B); $0,19 \text{ g L}^{-1}$ em cordiforme ($4,58 \text{ calo}^{-1}$) (Figura 2C); $0,18 \text{ g L}^{-1}$ em torpedo ($6,55 \text{ calo}^{-1}$) (Figura 2D) e $0,16 \text{ g L}^{-1}$ em cotiledonares ($27,57 \text{ calo}^{-1}$) (Figura 2E).

Para a normalidade dos embriões (Figura 3 G, H), a concentração de extrato de malte de $0,4 \text{ g L}^{-1}$ apresentou média de 1,10 embriões por calo, média inferior às observadas nas demais concentrações de 0,0; 0,1; 0,2 e $0,3 \text{ g L}^{-1}$ (11,69; 17,50; 17,67 e 12,20 ESN calo^{-1} , respectivamente) (Figura 2F). A equação ajustada para normalidade dos embriões somáticos apresenta ponto de máxima eficiência para extrato de malte à concentração de $0,15 \text{ g L}^{-1}$ ($18,23 \text{ calo}^{-1}$) (Tabela 3), em que as respostas tendem a diminuir a partir desta concentração. Tal normalidade é evidenciada quando se compara o embrião somático normal (Figura 3H) com o embrião zigótico normal (Figura 3I).

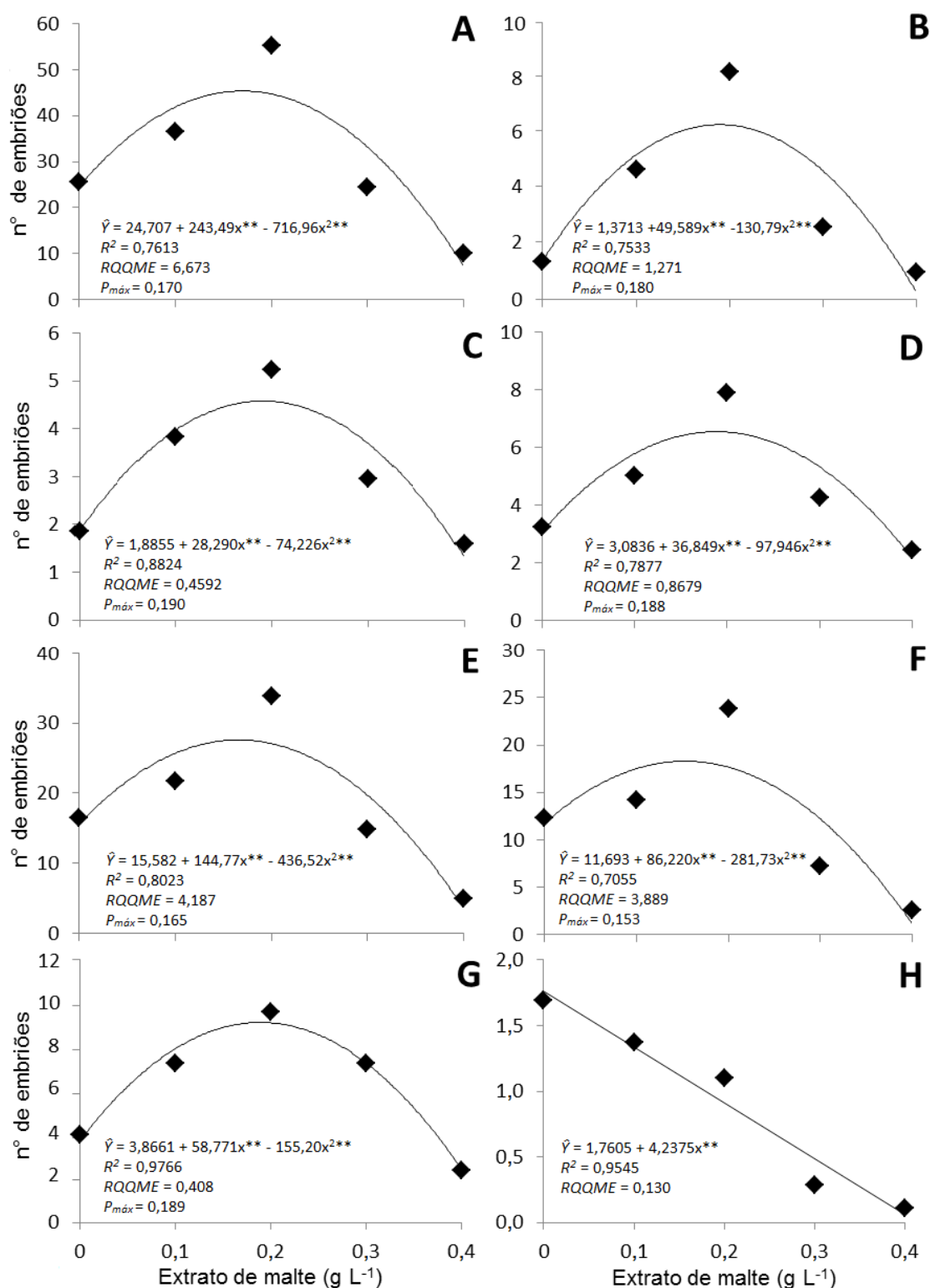


Figura 2. Número total de embriões somáticos (A), número de embriões globulares (B), número de embriões cordiforme (C), número de embriões torpedo (D) número de embriões cotiledonares (E), número de embriões cotiledonares normais (F), número de embriões cotiledonares anormais (G) e número de embriões somáticos cotiledonares germinados (H) por calo de mamoeiro ‘Golden THB’ em meio de maturação com diferentes concentrações de extrato de malte (0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 g L⁻¹), após 45 dias de cultivo.

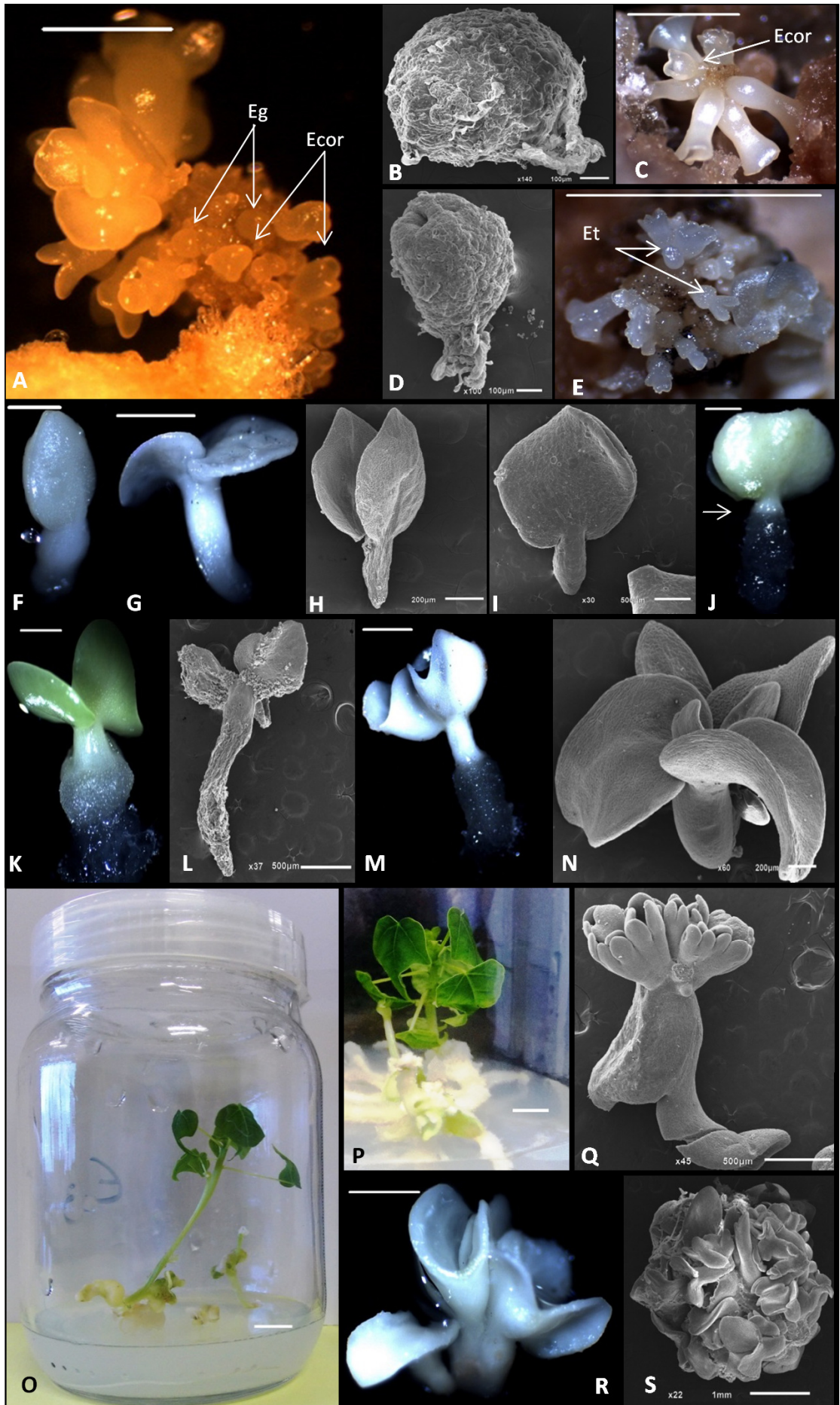


Figura 3. Maturação de embriões somáticos de mamoeiro ‘Golden THB’. Embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento: (A) Calo embriogênico com embriões somáticos; (B) Embrião globular; (C, D) Embriões somáticos cordiformes; (E, F) Embriões somáticos no estágio torpedo; (G, H) Embriões cotiledonares morfológicamente normais; (I) Embrião zigótico. Embriões somáticos germinados: (J) Embrião normal (seta) detalhe da região de transição entre o sistema radicular x parte aérea; (K) Embrião normal germinado com folhas cotiledonares clorofiladas; (L) Embrião normal germinado. Embriões anormais: (M) Embrião anormal germinado; (N) Embrião policotiledonar. Plântulas normais geradas a partir de embriões somáticos: (O) 30 dias após a germinação; (P) 65 dias após a germinação. (Q) Embriogênese secundária. (R) Embriões somáticos fusionados. (S) Massa globular de embriões somáticos. *Abreviações:* Eg. Embrião globular; Ecor. Embrião cordiforme; Et. Embrião torpedo. Barra: 100 μm (B, D); 200 μm (H, N); 500 μm (I, L, Q); 0,5 mm (F); 1,0 mm (A, C, E, G, J, K, M, R, S); 0,5 cm (P); 1,0 cm (O).

Foram observadas anormalidades morfológicas nos embriões somáticos, como embriões com os cotilédones fundidos (Figura 3M), embriões policotiledonares (Figura 3N) e embriões fusionados (Figura 3R). A presença de anormalidades foi maior na concentração de $0,19 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de malte ($9,42 \text{ calo}^{-1}$) (Figura 2G). A formação de estruturas, aparentemente globulares, formadas por embriões aglomerados (Figura 3S) contribuiu na ampliação desta variável na respectiva concentração.

A ausência de extrato de malte apresentou maior presença de embriões germinados ($1,76 \text{ ESG calo}^{-1}$) (Figura 2H). O comportamento linear decrescente evidencia a eficiência da adição do extrato de malte no meio de maturação, cujo objetivo é retardar o processo de germinação.

4.2 Germinação

Após a fase de maturação, os embriões somáticos foram transferidos para meio de germinação variando a concentração de myo-inositol a fim de verificar protrusão da raiz primária e a viabilidade de conversão em plântulas normais. Pela análise de variância foi observada diferença significativa em nível de 1% de probabilidade pelo teste de F para a porcentagem de embriões germinados (Tabela 3).

A concentração estimada de myo-inositol de $0,45 \text{ mM L}^{-1}$ resultou em maior porcentagem de germinação (47,37%) (Figura 4). Entretanto, para o número médio de raiz por embrião não houve diferença significativa, apresentando média de 1,51 raiz por embrião (Tabela 3), possibilitando o desenvolvimento de plântulas normais após 30 e 65 dias de cultivo (Figura 3 O, P).

Tabela 3. Análise de variância da porcentagem de germinação (G) e número médio de raízes (NMR) para embriões somáticos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) 'Golden THB', em meio de germinação com diferentes concentrações de myo-inositol.

Variáveis	Variações entre	Variações dentro	F _{Calculado}	Médias	CV (%)
G (%)	111,58	18,410	6,058**	42,125	10,18
NMR	0,112	0,068	1,65 ^{ns}	1,51	17,28

^{ns} Não significativo; ** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

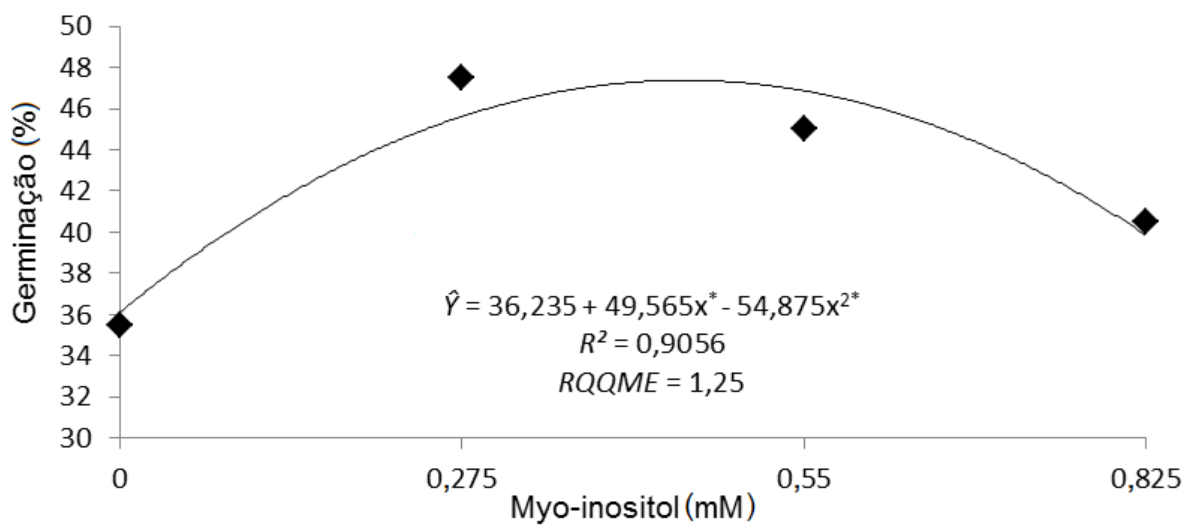


Figura 4. Porcentagem de germinação de embriões somáticos de mamoeiro 'Golden THB' em meio de germinação com diferentes concentrações de mio-inositol (0,0; 0,275; 0,550; 0,825 mM), após 30 dias.

5. DISCUSSÃO

5.1 Maturação

5.1.1 Experimento 1 – Polietilenoglicol (PEG) na maturação de embriões somáticos de mamoeiro ‘Golden THB’.

No presente trabalho, o tratamento controle, suplementado com ABA (0,5 μM) + CA (15 g L⁻¹) e sem a adição de PEG 6000, foi capaz de desenvolver um maior número de embriões somáticos totais e normais maduros (Figura 1A e 1B). De acordo com Rancé et al. (1994), os tratamentos de dessecação do embrião, como o produzido pelo PEG, podem resultar em rápidas mudanças bioquímicas, desencadeando a atividade de proteínas específicas. Entretanto, os tratamentos com PEG foram inferiores e prejudicaram o processo de formação dos embriões e sua utilização na concentração de 70 g L⁻¹ reduz em 31,85% a produção de embriões somáticos total e normais do mamoeiro ‘Golden THB’. No entanto, na maturação de embriões somáticos de mamoeiro cv. Pusa Delicious ocorreu o máximo de conversão de embriões somáticos do estágio globular para o estágio cotiledonar quando utilizaram 4,2% de PEG, com cerca de 28%, sendo que estes formaram plântulas normais (MISHRA et al., 2010).

Na embriogênese somática a partir de embriões zigótico imaturos de mamão híbrido Uenf/Caliman 01, o tratamento contendo 60 g L⁻¹ de PEG 3350 resultou nas maiores respostas de maturação (83,3%), com o maior número de embriões somáticos formado por calo (78) (HERINGER et al., 2013). Os autores ainda relatam que, as culturas mantidas no tratamento de PEG 3350 (60 g L⁻¹) apresentaram a

concentração média mais elevada de proteínas solúveis (9,4 mg g⁻¹ de massa fresca). Este aumento de proteínas pode estar relacionado com a síntese de proteínas (*Lea*), nas quais, a expressão está associado com a aquisição de tolerância à dessecação das sementes, e algumas proteínas *Lea* são induzidos por estresse causado pelo frio ou osmótico. Koehler et al. (2013) relataram que a adição de 50 g L⁻¹ de PEG 2000, juntamente com 2 g L⁻¹ de carvão ativado e 5 µM de ABA, levou à melhoria da qualidade dos embriões somáticos e a formação de plântulas de mamoeiro cv. Golden. Os autores acima citados trabalharam com PEG 3350 (HERINGER et al., 2013) e PEG 2000 (KOEHLER et al., 2013), diferente deste estudo, o qual foram testadas concentrações de PEG 6000, esse com um peso molecular mais elevado o que pode explicar em parte as diferenças encontradas.

Em algumas espécies como em pinheiro-do-canadá (*Picea glauca*) (STASOLLA et al., 2003b; BELMONTE et al., 2005) e *Aesculus hippocastanum* (TROCH et al., 2009) a presença de PEG 8000 foi essencial para a conversão dos embriões somáticos em plântulas, que só teve início com a indução do estresse hídrico induzido pelo PEG 8000. Entretanto, Márquez-Martín et al. (2011) ao utilizarem o PEG 8000 na maturação, a produção de embrião somático de *Persea americana* Mill. foi significativamente mais baixa do que no controle.

Quanto à germinação (Figura 1C), esse padrão irregular, com a suplementação de PEG 6000, também foi reportado por Rai et al. (2009), ao trabalharem na maturação de embriões somáticos de *Psidium guajava* L., com meio suplementado com PEG 6000. Segundo estes autores, nas concentrações de PEG 6000 de 0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 g L⁻¹, observaram conversões de plântulas médias de 68,6; 42,0; 52,9; 59,6; 38,5% de germinação, respectivamente.

5.1.2 Experimento 2 – Extrato de malte na maturação de embriões somáticos de mamoeiro 'Golden THB'.

O processo de maturação é uma etapa crítica no desenvolvimento do embrião somático. Esta fase é distinta pela expansão, diferenciação e acúmulo de substância de reserva do embrião, assim, sendo determinante na germinação e

conversão em plântulas bem sucedidas dos embriões somáticos (MISHRA et al., 2012).

A adição de extrato de malte, nas concentrações 0,1 e 0,2 g L⁻¹ (Figura 2A.), no meio de maturação potencializou o desenvolvimento embrionário de mamoeiro 'Golden THB', respectivamente com 41,88 e 44,72 ES calo⁻¹, superior à taxa de embriogênese somática (35 ES calo⁻¹), proposta para mamoeiro 'Golden' (CLARINDO et al., 2008) e 'Improved Sunrise Solo line 72/12' (KOEHLER, 2004), trabalhos desenvolvidos em meio de cultura suplementado com 0,5 µM de ABA. Jumin & Nito (1996) evidenciam que o extrato de malte no meio de cultura, resulta em maior número de divisões mitóticas, o que aumenta a eficiência na multiplicação de protoplasto de *Citropsis schweinfurthii*. Vardi & Galun (1988) descrevem que para acelerar o desenvolvimento de embriões somáticos em estágio globular de *Citrus* e obter embriões de morfologia normal com folhas cotiledonares expandidas, estes devem ser transferidos para o meio contendo extrato de malte (0,5 g L⁻¹).

O extrato de malte estimula a atividade de enzimas hidrolíticas (KIM et al., 2010), por ser uma importante fonte de α-amilase, β-amilase, α-glicosidase (EVANS et al., 2010), enzimas que facilitam a quebra de amido em açúcares redutores, tais como a glicose e maltose (JUNG et al., 2011). Entretanto, nas concentrações de extrato de malte superiores à do ponto de máximo (0,17 g L⁻¹), ocorre uma alta disponibilidade de glicose para as células vegetais, o que impede o funcionamento fototrófico e possibilita o crescimento heterotrófico, com subsequentes efeitos foto-oxidativos prejudiciais (ASHTON & ZIEGLER, 1987). Couée et al. (2006) verificaram que o acúmulo de açúcares solúveis está associado à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Segundo estes autores, o acúmulo de açúcares regula negativamente a expressão gênica da fotossíntese, incluindo a expressão do ciclo de Calvin, o qual pode fazer com que ocorra a redução da reciclagem de NADP e a transferência de elétrons excessiva, que pode levar à produção de ROS.

Entretanto, açúcares não só impulsionam o crescimento e desenvolvimento vegetal como fontes de carbono e energia, mas, também exercem funções reguladoras importantes como moléculas sinalizadoras de diferentes mecanismos moleculares, que controlam a transcrição, a tradução, a estabilidade da proteína e

atividade enzimática da hexoquinase (HXK-dependente e HXK-independente), catalizadora da fosforilação das hexoses (BOLOURI-MOGHADDAM et al., 2010).

O surgimento de embriões em diversas fases de diferenciação (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) (Figura 3A) está relacionada com o estímulo à embriogênese secundária, devido à constituição do meio de maturação, como a sua suplementação com extrato de malte, em que a concentração de $0,2 \text{ g L}^{-1}$ proporcionou a maior formação de embriões secundários. Essa indução pode ser explicada pela presença de uma quantidade relativamente grande de ácido indolacético (AIA) no extrato de malte (DIX & VAN STADEN, 1982).

Oliveira et al. (1994) observaram no cultivo de calos nucelares embriogênicos de limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck), em meio MT (MURASHIGE & TUCKER, 1969) suplementado com $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de malte, e sem fitorreguladores de crescimento, 38,8% de indução de embrióides, além de serem mais friáveis e com menor nível de oxidação, superando aos demais meios com BAP ($44,4 \text{ } \mu\text{M}$) e a combinação de IAA x KIN ($5,7 \text{ } \mu\text{M} \times 0,5 \text{ M}$).

No presente trabalho, o meio de maturação ausente de extrato de malte, foi capaz de desenvolver embriões somáticos maduros. Todavia, o meio de cultura suplementado com extrato de malte ($0,15 \text{ g L}^{-1}$) resultou em maior número de embriões somáticos normais. Esses resultados sugerem que o extrato de malte não possui ação determinante para a formação dos embriões somáticos de mamoeiro, mas a sua utilização potencializa a produção de embriões somáticos normais, com clara distinção entre o eixo embrionário e os cotilédones (Figura 3G).

Observou-se a formação de embriões anormais de mamoeiro 'Golden THB', quando os mesmos foram cultivados em meio com extrato de malte (Figura 2G). Essas anomalias também foram relatadas no desenvolvimento de embriões somáticos de mamoeiro cv. Improved Sunrise Solo line 72/12 (KOEHLER, 2004), cv. Golden (ANANDAN et al., 2012), 'Golden THB' (DETONI, 2013), cv. Golden e geração F₂ do híbrido Uenf/Caliman 01 (VALE, 2013), como em outras espécies, como *Cassia angustifolia* (AGRAWAL & SARDAR, 2007), *Desmodium motorium* (DEVI & NARMATHABAI, 2011). *Glycine max* (KORBES & DROSTE, 2005; SANTOS et al., 2006; HIRAGA et al., 2007) e *Gossypium hirsutum* (HUSSAIN et al., 2009).

A presença de estruturas globulares (Figura 3S), resultante do desenvolvimento aglomerado e desordenado dos embriões somáticos do mamoeiro 'Golden THB' no calo, gera uma competição por espaço. O seu surgimento pode estar ligado ao meio de cultivo, que no presente trabalho os meios foram solidificados com agar-agar, que pelo fato dos embriões desenvolverem de forma estática, diferentemente de meios líquidos, onde crescem sob agitação, despreendendo do calo e desenvolvendo livres, sem que ocorra a competição por espaço. Castillo et al. (1998) compararam a maturação de embriões somáticos e posterior conversão em plantas de *Carica papaya* L. cv. Solo, produzidos em meio semi-sólido e meio líquido, em que os cultivados em meio de maturação fase líquida resultou em uma frequência maior de embriogênese somática do que aqueles em meio solidificado com ágar. Trabalhando com mamoeiro cv. Co7, Anandan et al. (2010) relatam que as culturas em suspensão (meio líquido) foram superiores às culturas estáticas (meio sólido) para a maturação de embriões somáticos.

Para o mamoeiro 'Golden THB', a concentração de 15 g L^{-1} de CA parece ser ótima ou próxima de ótima, uma vez que, combinado com ABA ($0,5 \text{ }\mu\text{M}$), provavelmente exerce a função de adsorção de substâncias inibidoras, além de permitir a liberação de forma contínua e adequada desse hormônio para o tecido embriogênico, favorecendo o seu desenvolvimento (DETONI, 2013). Segundo a autora, outro efeito positivo do ABA ($0,5 \text{ }\mu\text{M}$) + CA (15 g L^{-1}) é a germinação dos embriões com aproximadamente 4% ($2,82 \text{ ESG calo}^{-1}$). Contudo, o presente trabalho para as mesmas concentrações de ABA e CA apresentou uma média de $1,7 \text{ ESG calo}^{-1}$ (Figura 2H) e, à medida que foi adicionado extrato de malte no meio, houve maior redução na germinação de embriões, $0,06 \text{ ESG calo}^{-1}$, quando o meio de cultura foi suplementado com $0,4 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de malte, sugerindo um efeito benéfico da sua suplementação no meio de maturação.

5.2 Germinação

O efeito da suplementação de myo-inositol no meio de germinação na concentração de $0,45 \text{ mM L}^{-1}$ proporcionou ganhos significativos na porcentagem de germinação de embriões somáticos de mamoeiro 'Golden THB', com um incremento de 11,19%, em que, no meio sem a adição de myo-inositol a germinação foi de

36,23% e no meio suplementado com myo-inositol a 45 mM L⁻¹ a taxa de germinação foi de 47,42% (Figura 4). O myo-inositol é um poliálcool cíclico, sendo um importante constituinte celular, estando envolvido em diferentes processos bioquímicos (ALMEIDA et al., 2003). Nas plantas é um precursor para a síntese de vários metabólitos, entre eles, a fosforilação sequencial de myo-inositol pela myo-inositol-3-fosfato síntase (MIPS), o que leva à produção de ácido fítico (ABREU & ARAGÃO, 2007). Este utilizado pela planta como uma importante forma de armazenamento de fósforo e myo-inositol para a utilização durante a germinação e o crescimento das plântulas (SHI et al., 2005).

6. CONCLUSÕES GERAIS

Para a embriogênese somática do mamoeiro 'Golden THB' não se recomenda a maturação em meio contendo PEG 6000.

A suplementação de extrato de malte ($0,15\text{g L}^{-1}$) na maturação potencializa o desenvolvimento de embriões somáticos cotiledonares normais.

Para a germinação dos embriões somáticos recomenda-se a adição de myo-inositol a $0,45\text{ mM}$.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E. F. M.; ARAGÃO, F. J. L. Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress. **Annals of Botany**, v. 99, p. 285-292, 2007.

ABREU, I. S. **Monitoramento da embriogênese somática de *Carica papaya* L. por técnicas citogenéticas e de citometria de fluxo**. 2010. 43f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa, 2010.

AGRAWAL, V.; SARDAR, P. R. *In vitro* regeneration through somatic embryogenesis and organogenesis using cotyledons of *Cassia angustifolia* Vahl. **In Vitro Cell Developmental Biology-Plant**, v. 43, p. 585-592, 2007.

AHMADI, B.; SHARIATPANAH, M. E.; SILVA, J. A. T. da. Efficient induction of microspore embryogenesis using abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid in *Brassica napus* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 116, p. 343-351, 2014.

ALMEIDA, E. P. de; OLIVEIRA, R. P. de; DANTAS, J. L. L. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 1, p. 51-54, 2001.

ALMEIDA, M. V. de; SILVA, A. D. da; SOUZA, M. V. N. de; BENÍCIO, A. A. A. A cascata dos fosfoinosítídeos. **Química Nova**, v. 26, p. 105-111, 2003.

ANANDAN R.; PHAP, P. D.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; KUMAR, N.; THIRUGNANAKUMAR, S.; SUDHAKAR, D.; BALASUBRAMANIAN, P. Somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. through zygotic embryo derived callus culture. **Acta Horticulturae**, v. 851, p. 201-208, 2010.

ANANDAN, R.; SUDHAKARA, D.; BALASUBRAMANIANA, P.; GUTIÉRREZ-MORAB, A. *In vitro* somatic embryogenesis from suspension cultures of *Carica papaya* L. **Scientia Horticulturae**, v. 136, p. 43-49, 2012.

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.

ASHTON, A. R.; ZIEGLER, P. Lack of effect of the photosystem II based herbicides diuron and atrazine on growth of photoheterotrophic *Chenopodium rubrum* cells at concentrations inhibiting photoautotrophic growth of these cells. **Plant Science**, v. 51, p. 269-275, 1987.

BELMONTE, M. F.; MACEY, J.; YEUNG, E. C.; STASOLLA, C. The effect of osmoticum on ascorbate and glutathione metabolism during white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 337-346, 2005.

BISPO, N. B.; GRANDO, M. F.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M. Indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia (*Avena sativa* L.). **Ciência Rural**, v. 37, p. 890-893, 2007.

BOLOURI-MOGHADDAM, M. R.; ROY, K. L.; XIANG, L.; ROLLAND, F.; VAN DEN ENDE, W. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. **FEBS Journal**, v. 277, p. 2022-2037, 2010.

BOZHKO, P. V., VON ARNOLD, S. Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 211-224, 1998.

BUENDÍA-GONZÁLEZ, L.; ESTRADA-ZÚÑIGA, M. E.; OROZCO-VILLAFUERTE, J.; CRUZ-SOSA, F.; VERNON-CARTER, E. J. Somatic embryogenesis of the heavy metal accumulator *Prosopis laevigata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, p. 287-296, 2012.

CASTILLO, B.; SMITH, M. A. L.; YADAVA, U. L. Liquid system scale up of *Carica papaya* L. somatic embryogenesis. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 73, p. 307-311, 1998.

CHRISTIANSON, M.L. An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis. In: HENKE, R. R., HUGHES, K. W., CONSTANTIN, M. J., HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. New York: Plenum Press, 1985. p.83 - 103.

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

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. (Ed.). **A cultura do mamão: tecnologia e produção**. Vitória: Incaper, 2003. p. 59-102.

COUÉE, I.; SULMON, C.; GOUESBET, G.; EL AMRANI, A. An involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 449-459, 2006.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**. v. 35, p. 271-276, 2013.

DANTAS, J.L.L.; CASTRO NETO, M.T. Aspectos botânicos e fisiológicos. In: TRINDADE, A.V. (Org.). **Mamão, produção**: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 11-14

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

DEVI, B. C.; NARMATHABAI, V. Somatic embryogenesis in the medicinal legume *Desmodium motorium* (Houtt.) Merr. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 409-418, 2011.

DIX, L.; VAN STADEN, J. Auxin and gibberellin-like substances in coconut milk and malt extract. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 1, p. 239-245, 1982.

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.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Produção brasileira de mamão em 2012**. EMBRAPA, 2013. Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Mamao_Brasil_2012.pdf Acesso em: 21 dez. 2013.

EVANS, D. E.; LI, C.; EGLINTON, J. K. The properties and genetics of barley malt starch degrading enzymes. In: Zhang, G.; Li, C. (Ed.) **Advanced topics in science and technology in China 2010**: Genetics and improvement of barley malt quality. Berlin, Springer-Verlag, p. 143-189, 2010.

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.

FELTRIN SEMENTES. **Mamão THB segmento: Solo**, 2009. Disponível em: http://www.sementesfeltrin.com.br/uploads/pdf/InfoTecnicaP_231.pdf Acesso em: 21 dez. 2013.

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

FINKELSTIEN, R.; CROUCH, M. Rapeseed development in culture on high osmoticum is similar to that in seed. **Plant Physiology**, v. 81, p. 907-912, 1986.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Food and agricultural commodities production**: papayas. 2012. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Acesso em 10 mar. 2014.

GARCIA, R.; CIDADE, D.; CASTELAR, 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.

GROLL, J.; GRAY, V. M.; MYCOCK, D. J. Development of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) somatic embryos during culture with abscisic acid and activated charcoal. **Journal Plant Physiology**, v. 159, p. 437-443, 2002.

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.

HABERLANDT, G. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitz-Ber. Mat. Nat. Kl. Kais. **Akad. Wiss. Wien**, v. 111, p. 69 – 92, 1902.

HALLAK, R.; PEREIRA FILHO, A. J. Metodologia para análise de desempenho de simulações de sistemas convectivos na região metropolitana de São Paulo com o modelo ARPS: sensibilidade a variações com os esquemas de advecção e assimilação de dados. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 26, p. 591-608, 2011.

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

HIRAGA, S.; MINAKAWA, H.; TAKAHASHI, K.; TAKAHASHI, R.; HAJIKA, M.; HARADA, K.; OHTSUBO, N. Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of Japanese soybean cultivars. **Plant Biotechnology**, v. 24, p. 435-440, 2007.

HUSSAIN, S. S.; RAO, A. Q.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. Cotton somatic embryo morphology affects its conversion to plant. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 2, p. 307-311, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Frutas frescas**: Comparativo das Exportações Brasileiras de Frutas Frescas. Disponível em: http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp. Acesso em: 10 mar. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. Disponível em: <http://www.ibge.com.br>. Acesso em: 10 mar. 2014.

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.; GUEVARA, E.; HERRERA, J.; BANGERTH, F. Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 567-572, 2005.

JUMIN, H. B.; NITO, N. Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of Uganda cherry orange (*Citropsis schweinfurthii*). **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 754-757, 1996.

JUNG, K.; KIM, Y.; LEE, G. Effect of different levels of malt extract on antinutrients, *in vitro* digestibilities and viscosity during fermentation of jeungpyun. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 679-685, 2011.

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.

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

KIM, M.; K. YOON, K.; LEE, G. Effects of enzyme treatment on the physicochemical properties of non-glutinous rice flour and effects of malt extract treatment on retrogradation extension of non-glutinous rice flour. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 798-802, 2010.

KIST, B. B.; VENCATO, A. Z.; SANTOS, C.; CARVALHO, C. de; REETZ, E. R.; POLL, H.; BELING, R. R. **Anuário brasileiro da fruticultura 2012**. Santa Cruz do Sul, Editora Gazeta Santa Cruz, 2012. 128 p.

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

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

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

KORBES, A. P.; DROSTE, A. Carbon sources and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 211–216, 2005.

KRAJŇÁKOVÁ, J.; HÄGGMAN, H.; GÖMÖRY D. Effect of sucrose concentration, polyethylene glycol and activated charcoal on maturation and regeneration of *Abies cephalonica* somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, p. 251–262, 2009.

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 & Developmental Biology - Plant**, v. 41, p. 345–363, 2005.

MA, H.; MOORE, P. H.; LIU, Z.; KIM, M. S.; YU, Q.; FITCH, M. M. M.; SEKIOKA, T.; PATERSON, A. H.; MING, R. High density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in papaya. **Genetics**, v. 166, p. 419-436, 2004.

MA, J.; HE, Y.; WU, C.; LIU, H.; HU, Z.; SUN, G. Cloning and molecular characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, p.195-203, 2012.

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

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.

MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; SESMERO, R.; QUESADA, M.A.; PLIEGO-ALFARO, F.; SÁNCHEZ-ROMERO, C. Water relations in culture media influence maturation of avocado somatic embryos. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 2028–2034, 2011

MATSUNO, K.; FUJIMURA, T. Induction of phytic acid synthesis by abscisic acid insuspension-cultured cells of rice. **Plant Science**, v. 217-218, p. 152- 157, 2014.

MISHRA, M.; SHUKLA, N.; CHANDRA, R. Role of polyethylene glycol in maturation and germination of transformed somatic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). **Acta Horticulturae**, v. 851, p. 227-230, 2010.

MISHRA, S.; SANYAL, I.; AMLA, D. V. Changes in protein pattern during different developmental stages of somatic embryos in chickpea. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 4, p. 613-619, 2012.

MISRA, S., ATREE, S., LEAL, I., FOWKE, L. Effect of abscisic acid, osmoticum and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. **Annals of Botany**, v. 71, p. 11–22. 1993.

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. & TUCKER, D.P.H. Growth factor requirements of citrus tissue culture. Proceeding First Internacional Citrus Symposium, **Riverside**, v. 3, p. 1155-1161, 1969.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 437 – 496, 1962.

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

O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Termarcarphi Pty, Melbourne. 1981.

OLIVEIRA, R. P. de; MENDES, B. M. J.; TULMANN NETO, A. Obtenção e cultura de calos nucleares de limão Cravo, tangerina Cleópatra e *Poncirus trifoliata*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 6, n. 2, p. 115-119, 1994.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações**. Lavras: Ed. Brasil, 1997, p. 159.

PENA-RAMÍREZ, Y. J.; GARCÍA-SHESEÑA, I.; HERNÁNDEZ-ESPINOZA, A.; Alfredo DOMÍNGUEZ-HERNÁNDEZ, A.; BARREDO-POOL, F. A.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, J. A.; ROBERT, M. L. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the tropical timber tree Spanish red cedar [*Cedrela odorata* L. (Meliaceae)]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, p. 203-209, 2011.

PERES, L. E. P.; MERCIER, H.; KERBAUY, G. B.; ZAFFARI, G. R. Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinados por HPLC e ELISA. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 9, p. 169-176, 1997.

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

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

QUINTAL, S. S. R.; VIANA, A. P.; GONÇALVES, L. S. A.; PEREIRA, M. G.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Divergência genética entre acessos de mamoeiro por meio de variáveis morfoagronômicas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 131-142, 2012.

RAI, M. K.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 121, p. 233-236, 2009.

RANCÉ, I. M.; TIAN, W.; MATHEWS, H.; KOCHKO, A. de; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. Partial desiccation of mature embryo-derived calli, a simple treatment that dramatically enhances the regeneration ability of indica rice. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 647-651, 1994.

SÁENZ, L.; HERRERA-HERRERA, G.; UICAB-BALLOTE, F.; CHAN, J. L.; OROPEZA, C. Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 301-308, 2010.

SANTOS, K. G. B. D.; MARIATH, J. E. D. A.; MOCO, M. C. C.; ZANETTINI, M. H. B. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]: ontogeny of somatic embryos. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 49-55, 2006.

SAVONA, M.; MATTIOLI, R.; NIGRO, S.; FALASCA, G.; DELLA ROVERE, F.; COSTANTINO, P.; DE VRIES, S.; B. RUFFONI, B.; TROVATO, M.; ALTAMURA, M. M. Two SERK genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 471-488, 2012.

SCHIMIDT, E. D.; GUZZO, F.; TOONEN, M. A.; DEURIES, S. C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, v. 124, p. 2049-2062, 1997.

SERRANO, L. A. L.; CATTANEO, L. F. O cultivo do mamoeiro no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, texto de capa, 2010.

SHI, J.; WANG, H.; HAZEBROEK, J.; ERTL, D. S.; HARP, T. The maize low-phytic acid 3 encodes a myo-inositol kinase that plays a role in phytic acid biosynthesis in developing seeds. **The Plant Journal**, v. 42, p. 708-719, 2005.

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.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-231, 1957.

SMULDERS, M. J. M.; KLERK, G. J. de. Epigenetics in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**, v. 63, p. 137-146, 2011.

SOUZA, A. P. de; ESCOBEDO, J. F. Estimativas da radiação global incidente em superfícies inclinadas com base na razão de insolação. **Revista Brasileira de Ciências. Agrárias**, v. 8, p.-483-491, 2013.

SOUZA, A. P.; ESCOBEDO, J. F.; DAL PAI, A.; GOMES, E. N. Estimativas das componentes da radiação solar incidente em superfícies inclinadas baseadas na radiação global horizontal. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, p. 277-288, 2011.

STASOLLA, C.; ZIL, L.; EGERTSDOTTER, U.; CRAIG, D.; LIU, W.; SEDEROFF, R.R. The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. **Plant Physiology**, v. 131, p. 49-60, 2003a.

STASOLLA, C.; ZYL, L. van; EGERTSDOTTER, U.; CRAIG, D.; LIU, W.; SEDEROFF, R. R. Transcript profiles of stress-related genes in developing white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos cultured with polyethylene glycol. **Plant Science**, v. 165, p. 719-729, 2003b.

STEWART, F. C., MAPES, M. O., MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v. 45, p. 705-708, 1958.

SUN, D-Q.; LU, X.-H.; LIANG, G-L.; GUO, Q-G.; MO, Y-W.; XIE, J.-H. Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, n. 1, p. 23-29, 2011.

TEXEIRA, L. R.; BRACCINI, A. de L.; CHURATA, B. G. M.; VIEIRA, E. S. N.; MARTINS, P. K.; SCHUSTER, I. Evaluation of soybean cultivars on the embryogenic and organogenic potential. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 1, p. 67-74, 2011.

TREWAVAS, A. How do plant growth substances work? **Plant, Cell and Environment**, v. 4, p. 203-228, 1981.

TROCH, V.; WERBROUCK, S.; GEELEN, D.; LABEKE, M. V. Optimization of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryo conversion. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 98, p. 115-123, 2009.

VALE, E. de M. **Análise proteômica e determinação de carboidratos na embriogênese somática do mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 2013. 104f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ, 2013.

VARDI, A.; GALUN, E. Recent advances in protoplast culture of horticultural crops: *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, v. 37, p. 217-230, 1988.

VIEIRA, M. L. C. GLÓRIA, B. A. da. Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento plantas**. Rodonópolis: Fudação MT, 2001, p. 911- 938.

VON 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.

YEUNG, E.C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: BAJAJ, Y.P.S. **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995, p. 205-248.

ZENG, F.; ZHANG, X.; ZHU, L.; TU, L.; GUO, X.; NIE, Y. Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. **Plant Molecular Biology**, v. 60, p. 167-183, 2006.