

ANDRÉA DIAS KOEHLER

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MAMOEIRO (*Carica papaya* L.):
ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E INFLUÊNCIA DE ACC, AVG E STS E DE
PULSOS DE 2,4-D**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

K77e
2004

Koehler, Andréa Dias, 1977-

Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya*
L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC, AVG e
STS e de pulsos de 2,4-D / Andréa Dias Koehler. – Viçosa : UFV, 2004.
xi, 73f. : il. ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Embriogênese somática - Efeito do etileno. 2. Histoquímica. 3. *Carica papaya* - Morfogênese *in vitro*. 4. Ácido diclorofenoxiacético. 5. Plantas - Anatomia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 581.82

ANDRÉA DIAS KOEHLER

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MAMOEIRO (*Carica papaya* L.):
ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E INFLUÊNCIA DE ACC, AVG E STS E DE
PULSOS DE 2,4-D**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA EM: 18 de março de 2004

Prof^a. Renata Maria Strozi Alves Meira
(Conselheira)

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Conselheiro)

Prof^a. Marília Contim Ventrella

Prof. Aloisio Xavier

Prof. Wagner Campos Otoni
(Orientador)

*À minha família, especialmente aos meus pais Franz
Koehler e Ana Lúcia Dias Koehler*

*Aos meus irmãos e cunhados: Adriane e Toninho ,
Harley e Soraia, Álysson, Andressa e Anderson*

Aos meus sobrinhos: Salisia, Gabriel, Davi e Vinícius

*Aos meus avós (in memorian),
Armando Dias da Costa e Maria das Dores do Carmo
Otto Koehler e Lina Koehler*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo projeto de vida por ele traçado e pelo cumprimento de suas promessas em minha vida.

Aos meus pais, pelo incentivo e pelo amor incondicional demonstrado a cada dia.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Botânica, pela oportunidade concedida para realização do curso.

Ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pelo apoio e suporte na condução deste trabalho.

A empresa Caliman Agrícola, em especial ao meu amigo Suzuki pelo fornecimento de material vegetal.

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal pela amizade e ensinamentos nas diversas áreas da Botânica.

Aos professores Sérgio Motoike e José Maria Moreira Dias, do Laboratório de Cultura de Tecidos da Fruticultura, pelas sugestões e conselhos durante a realização do trabalho.

Às professoras Renata M. S. Alves Meira e Marília C. Ventrella pela amizade, pelos conselhos e sugestões no trabalho de anatomia vegetal.

À professora Rosane Maria de Aguiar Euclides e a Claudia Vanetti, pela ajuda referente à microscopia eletrônica do material.

Aos amigos do LCTII: Elisa, Miranda, Alexandra, Carmem, Luciano, Rodrigo, Léo, Lourdes e Maure, pela agradável convivência e apoio durante a

realização do trabalho. Em especial à Lili, pelos ensinamentos, e conselhos dispensados a cada dia e ao professor Wagner Campos Otoni pela oportunidade concedida de fazer parte desta equipe, pela orientação, incentivo e, acima de tudo, pela amizade que será sempre lembrada.

À Ana Paula pela ajuda nas análises estatísticas e aos colegas Edgard e Leandro, pela grande ajuda na obtenção das fotos apresentadas.

À minha amiga Fabiana, fiel companheira de todas as horas.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANDRÉA DIAS KOEHLER, filha de Franz Koehler, e Ana Lúcia Dias Koehler, nasceu em 16 de maio de 1977, em Linhares, ES.

Em 1991, concluiu o 1^o grau na Escola Estadual de 1^o Grau Cid Adalberto dos Reis, no bairro Juparanã, onde viveu boa parte de sua infância e adolescência.

Em 1995, concluiu o Curso Técnico em Contabilidade na Escola Municipal Arnóbio Alves de Holanda, em São Mateus, ES.

Em 2000, diplomou-se no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo, no município de São Mateus.

Em abril de 2002, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Botânica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em março de 2004.

CONTEÚDO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5

CAPITULO 1

Anatomia e histoquímica da embriogênese somática em *Carica papaya* L. a partir de embriões zigóticos

RESUMO	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1. Material vegetal	11
2.2. Indução de embriogênese somática	11
2.3. Maturação e germinação dos embriões somáticos	12
2.4. Anatomia e histoquímica do processo de embriogênese somática ..	13
2.5. Microscopia eletrônica de varredura	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1. Desenvolvimento e morfologia	15
3.2. Análise anatômica e histoquímica do processo de embriogênese somática	21
4. CONCLUSÕES	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

CAPITULO 2

Efeitos do precursor do etileno ACC e dos inibidores AVG e STS na embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.)

RESUMO.....	35
1. INTRODUÇÃO.....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1. Material Vegetal.....	39
2.2. Indução de embriogênese somática em presença de inibidores de etileno e do precursor ACC.....	39
3. RESULTADOS.....	41
4. DISCUSSÃO.....	46
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

CAPITULO 3

Efeitos de pulsos de 2,4-D sobre a morfogênese *in vitro* de mamoeiro (*Carica papaya* L.) a partir de embriões zigóticos imaturos

RESUMO.....	54
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3. RESULTADOS.....	59
4. DISCUSSÃO.....	66
5. CONCLUSÕES.....	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

RESUMO

KOEHLER, Andréa Dias, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2004. **Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC, AVG e STS e de pulsos de 2,4-D.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Conselheiros: Renata Maria Strozi Alves Meira, Rosane Maria de Aguiar Euclides e Sérgio Yoshimitsu Motoike

O presente trabalho objetivou estudar alguns aspectos relacionados à histologia e histoquímica da embriogênese somática em *Carica papaya* L. 'Improved Sunrise Solo Line 72/12'. Embriões zigóticos imaturos resgatados a partir de frutos imaturos com 80 a 90 dias após a antese foram cultivados em meio MS meia-força, suplementado com 6% de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 400 mg L⁻¹ de L-glutamina, 2 mg L⁻¹ de ácido diclorofenoxiacético e solidificado com 2,8 g L⁻¹ de Phytigel®. Para os estudos anatômicos, amostras de calos embriogênicos foram analisadas em microscópio óptico e submetidas à microscopia eletrônica de varredura. Para análise histoquímica foram utilizadas amostras de material fresco ou incluídas em historesina. A análise histológica de amostras, coletadas em vários períodos de cultivo, mostrou que a reação calogênica induzida teve início nas células do meristema fundamental, próximas aos cordões procambiais e embriogênese somática direta ocorrendo a partir das células protodérmicas e subepidérmicas, ao vigésimo dia de cultivo, especialmente na região meristemática do domo apical do embrião zigótico. As células embriogênicas foram caracterizadas por apresentarem núcleos volumosos, nucléolos proeminentes e citoplasma denso com poucos grãos de amido. Aos 45 dias de cultivo, visualizou-se a formação de inúmeros

complexos proembriogênicos, com variável número de células, isolados das demais por paredes espessas, típicos de um processo de embriogênese somática indireta. Grande quantidade de grãos de amido foi visualizada nos estádios iniciais da calogênese, especialmente nas células periféricas. A reação positiva ao teste com Sudan detectou uma grande quantidade de lipídeos, evidenciando sua importância como material de reserva. Proteínas em forma de grânulos foram evidenciadas pelo teste XP (Xylidine Ponceau), especialmente nos cotilédones intactos dos embriões zigóticos cultivados. Os efeitos do precursor do etileno 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e dois inibidores – aminoetoxivinilglicina (AVG) e tiosulfato de prata (STS) durante o processo de indução da embriogênese somática foram analisados. Neste experimento o meio indutor foi suplementado com essas substâncias, nas concentrações de 3, 10 e 30 μM . A presença do ACC não inibiu a formação de calos e a aquisição de competência embriogênica. Contudo, nos maiores níveis testados, observou-se redução no número de embriões somáticos diferenciados por explante. Em presença de AVG na concentração de 3 μM verificou-se resultados semelhantes ao tratamento controle em relação a formação de calos embriogênicos. Contudo nos níveis de 10 e 30 μM foram observados altos índices de explantes não responsivos, sugerindo possível toxicidade desses níveis. Nos tratamentos com STS observou-se intensa proliferação de calos, porém com pouca diferenciação embriogênica. Em outro experimento, verificou-se os efeitos de pulsos de 2,4-D sobre a morfogênese *in vitro* em mamoeiro, tendo como objetivo inicial determinar o período de exposição necessário para aquisição de competência embriogênica. Foram testadas altas concentrações (10 e 100 mg L^{-1}) em tempos reduzidos de 0, 1, 6, 12, 24, 36, 48, 72 horas e a exposição contínua. Em seguida, os explantes foram transferidos para o meio MS, destituído de reguladores de crescimento. Para cada concentração e períodos de exposição foram observadas respostas morfogênicas diferenciadas como rizogênese, calogênese e embriogênese somática. Melhores respostas embriogênicas foram observadas na concentração de 10 mg L^{-1} durante 72 horas e na concentração de 100 mg L^{-1} no pulso de 48 horas.

ABSTRACT

KOHELER, Andréa Dias, M.S., Universidade Federal de viçosa, march 2004.
Somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya* L.): anatomy, histochemistry and influence of AVG, ACC, STS and pulses of 2,4-D.
Adviser: Wagner Campos Otoni. Committee Members: Renata Maria Strozi Alves Meira, Rosane Maria Aguiar Euclides and Sérgio Yoshimitsu Motoike.

The present study was conducted to evaluate some aspects related to histological and histochemical aspects of somatic embryogenesis of *C. papaya* 'Improved Sunrise Solo line 72/12'. Immature zygotic embryos derived from harvested fruits after 80-90d after anthesis were cultured onto a semi-solid half-strength MS-based medium supplemented with 6% sucrose, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 400 mg L⁻¹ L-glutamine, 2,4-D (2.0 mg L⁻¹), and solidified with 2.8 g L⁻¹ Phytigel, at pH 5.7 ± 0.1. For anatomical studies embryogenic calli samples were characterized under photonic and scanning electron microscopy. Histochemical analyses were carried out using both fresh and hystoresin embedded samples. Histological analyses carried out throughout several cultural periods, revealed that callusing responses initiated from fundamental meristem-derived cells, close to procambial strands, whereas direct somatic embryogenesis occurred from peripheric, protodermic and sub-epidermic cells, at 20th d of culture, mainly from apical dome of the zygotic embryo. Embryogenic cells presented typical meristematic characteristics large nuclei, prominent vacuoles, densely cytoplasmic, and few starch grains. At 45 d of culture, several proembryogenic complexes with variable number of cells were visualized, isolated by thick cell-walls, typical of indirect somatic embryogenesis

process. Large amounts of starch grains were detected at initial stages of callusing processes, especially in the periphery. Positive reactions with Sudan detected large amount of lipids, evidencing its importance as storage material. Protein granules were also evidenced by Xylidine Ponceau mainly in intact cotyledon of zygotic embryos. The effect of the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic (ACC) and two inhibitors – aminoethoxyvinylglycine (AVG) and silver thiosulfate (STS) during the induction process of somatic embryogenesis were analyzed. In this experiment the inductor medium was supplemented with these substances, in the concentrations of 3, 10 and 30 μM . The presence of ACC did not inhibit the callusing responses and the acquisition of embryogenic competence. However, at higher tested levels, there was a significant decrease in number of somatic embryos per explant. In the presence of AVG in the concentration of 3 μM , similar results were verified as compared to the control treatment regarding to the formation of embryogenic calli. Therefore, in the levels of 10 and 30 μM it was observed high percentage of explants without responses, suggesting possible toxicity in these levels. In the treatment with STS it was observed a high proliferation of callus although with few embryogenic differentiation. Another experiment it verified the effects of pulses of 2,4-D upon *in vitro* morphogenesis in papaya, having as initial goal determine the period of the exposition demanded for acquisition of embryogenic competence. The concentrations de 2,4-D (10 and 100 mg L^{-1}) combined with pulsing times 0, 1, 6, 12, 24, 36, 48, 72 hours and the continuous exposition was evaluated. Following, the explants were transferred to the medium MS without growing regulators. For each concentration and exposition period it was observed morphogenic response differing as rhizogenesis, calogenesis and somatic embryogenesis. Better embryogenic response were observed in the concentration of 10 mg L^{-1} during 72 hours and in the concentration of 100 mg L^{-1} in the pulse of 48 hours.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Carica papaya L. (Caricaceae) é uma espécie frutífera nativa da América Tropical, sendo atualmente considerada uma das principais culturas em países da América do Sul, Sri-Lanka, Malásia, Havaí, Austrália, Ásia e África Tropical. Nos últimos anos, o Brasil tem se destacado como maior produtor mundial, totalizando uma produção de 1,7 milhões t/ano de frutos, destinados ao mercado interno e externo, especialmente no mercado europeu (FAO,1999).

O mamão, também conhecido como papaia, é considerado como uma das frutas mais ricas em vitaminas A e C. Além do aspecto alimentar, que é o mais direto e conhecido, frutos, folhas e sementes da planta fornecem produtos de amplo uso medicinal e de utilização na indústria, nos segmentos alimentícios, têxtil e cosmético, como a papaína, uma enzima proteolítica, e a carpaína, um alcalóide empregado como ativador do músculo cardíaco. A papaína é produzida nos laticíferos distribuídos em todo corpo da planta, mas é encontrada principalmente em frutos imaturos (Pereira, 1992).

Entre os principais fatores limitantes para a cultura no mundo destaca-se a infecção de plantas pelo vírus da mancha anelar do mamoeiro (*Papaya ringspot virus*), devido à característica migratória imposta à cultura e a inexistência de variedades resistentes (Medina et al., 1989). A inserção de genes de resistência em variedades comerciais pelo melhoramento tradicional, até então, não apresentou resultados satisfatórios. Sendo assim, novos métodos de proteção baseados em engenharia genética e transferência de genes tem sido investigados (Fitch, 1995).

A propagação do mamoeiro, em escala comercial, é normalmente feita por sementes. No entanto, por ser uma espécie alógama, os plantios comerciais apresentam elevada taxa de heterozigose, resultando numa mistura de genótipos com considerável variação, no que se refere a rendimento, qualidade dos frutos e susceptibilidade a um grande número de doenças (Drew, 1987). Ademais o sexo da planta só é determinado a partir da primeira floração, não existindo nenhuma metodologia de sexagem precoce das plantas.

A obtenção de genótipos selecionados requer um sistema de propagação vegetativa eficiente. Entre as características desejáveis para a cultura, destacam-se resistência a viroses e a outros patógenos, hermafroditismo (garantindo 100% de plantas produtivas), riqueza de papaína e abundância de látex, resistência do fruto à conservação e ao transporte, maturação uniforme do fruto e vigor da planta (Simão, 1998). Segundo Litz (1984) e Winnaar (1988), a estaquia e a enxertia não são métodos eficientes para a propagação em larga escala, principalmente devido ao baixo rendimento e dificuldade de enraizamento das estacas.

Com o desenvolvimento e o aperfeiçoamento dos métodos de cultivo *in vitro*, a cultura de tecidos tem se firmado como uma 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. Entre as alternativas apontadas para o processo de propagação vegetativa de material genético selecionado de mamoeiros, está o uso de sementes sintéticas, obtidas pela técnica de embriogênese somática (Castillo et al., 1998).

A embriogênese somática, também conhecida como embriogênese adventícia ou assexual é uma técnica da cultura de tecidos que consiste na formação de embriões a partir de haplóides ou células somáticas. Por meio de estímulos especiais, células somáticas são induzidas a formarem embriões, que podem, posteriormente, ser convertidos em plantas. Semelhante à embriogênese zigótica, a embriogênese somática caracteriza-se pela formação de estruturas bipolares, contendo os meristemas apicais e radiculares e por apresentarem um sistema vascular fechado, independente do tecido de origem (Guerra et al., 1999). Além do mais, os embriões somáticos passam por

estádios de desenvolvimento similares àqueles observados na embriogênese zigótica (Vicient e Martinez, 1998).

De acordo com Guerra et al. (1999), a indução e o controle da embriogênese somática podem ser afetados por uma série de fatores, tais como, fonte e estágio fisiológico do explante, genótipo da planta-mãe, formulação do meio básico (carboidratos e elementos minerais), agentes gelificantes, níveis e período de tempo em que os reguladores de crescimento são mantidos na cultura. Variações sazonais podem também afetar a eficiência de regeneração de certas origens de explantes como anteras, óvulos e embriões imaturos (Yang et al., 1996). Dentre os reguladores de crescimento, as auxinas, especialmente o 2,4-D, são essenciais na aquisição de competência embriogênica pelos tecidos.

Segundo Jiménez (2001), a embriogênese somática apresenta como principal vantagem a multiplicação em larga escala de embriões geneticamente idênticos, via ciclos repetitivos de divisão celular. Essa característica tem sido explorada, atualmente, para diversas finalidades, tais como: conservação *in vitro* de germoplasma, hibridação somática, transformação genética, produção de metabólitos secundários *in vitro*, servindo, também, como uma importante estratégia para os estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião.

A embriogênese somática tem sido bem estudada em vários cultivares comerciais de mamoeiro. Entre as dificuldades apresentadas na literatura está a falta de sincronização nos processos de maturação dos embriões, o surgimento de anomalias (embriões soldados entre si, ausência do meristema apical, cotilédones fundidos), baixas taxas de germinação e hiperidricidade.

A embriogênese somática também tem sido bem documentada para outras espécies do gênero, tais como *Carica stipulata* V.M. Badillo (Litz e Conover, 1978), *Carica pentagona* Heilborn (Vega de Rojas e Kitto, 1991; Jordan e Velozo, 1997), e *Carica pubescens* Lenné & C. Koch (Jordan e Velozo, 1996; 1997), todas pertencentes a um grupo de espécies conhecido como “papayas highland”, particularmente comuns em algumas regiões subtropicais (Cardenas, 1989). O interesse nessas espécies reside principalmente na procura de genes de resistência a doenças e tolerância a baixas temperaturas.

Diversas fontes de explantes têm sido utilizadas para obtenção de embriões somáticos de mamoeiros: óvulos (Litz, 1986), pecíolos (Yang et al., 1996), segmentos de hipocótilo (Almeida et al., 2001), tegumentos de sementes imaturas (Monmarson et al., 1995), raízes (Chen et al., 1987; Lin e Yang, 2001), protoplastos (Chen e Chen, 1992), segmentos de hipocótilo (Fitch, 1993) e embriões imaturos (Fitch e Manshardt, 1990).

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de investigar alguns assuntos ainda não abordados, ou pouco investigados na embriogênese somática de mamoeiro, dentre os quais descreve-se a caracterização anatômica e histoquímica do processo de embriogênese somática, os efeitos do promotor ACC e dos inibidores de etileno AVG e STS no processo de indução e os efeitos de pulsos de 2,4-D sobre a morfogênese *in vitro* em mamoeiro.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E. P., OLIVEIRA, R. P., DANTAS, J. L. L. 2001. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.51-54
- CARDENAS, M. 1989. **Manual de plantas econômicas de Bolivia**. La Paz : Ed. Los Amigos Del Libro, 333p.
- CASTILLO, B., SMITH, M. A., YADAVA, U. L. 1998. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. **Plant Cell Reports**, v.17, p.172-176
- CHEN, M.H., CHEN, C. C. 1992. Plant regeneration from *Carica* protoplasts. **Plant Cell Reports**, v.11, p.404-407
- CHEN, M. H., WANG, P. J., MAEDA, E. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explant. **Plant Cell Reports**, v.6, p.348-351
- DREW, R. A. 1987. The effects of medium composition and cultural conditions on *in vitro* root initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of Horticultural Science**, v.62, n.4, p.551-556
- FAO. Disponível: Site FAO (07 out. 1999). URL.: <http://apps.fao.org/lim500/nph-wrap.pl.Production.Crops>. Primary&Domaim= USA. Consultado em 25 de maio 2003
- FITCH, M. M. M., MANSCHARDT, R. M. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Cell Reports**, v.9, p.320-324
- FITCH, M. M. M. 1993. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.205-212

- FITCH, M. M. M. 1995. Somatic Embryogenesis in papaya (*Carica papaya* L.). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. New York, Springer-Verlag, v. 30, p.261-279
- GUERRA, M. P., TORRES, A. C., TEIXEIRA, J. B. 1999. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, v.2, p.533-568
- JIMÉNEZ, V. M. 2001. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.196-223
- JORDAN, M., VELOZO, J. 1996. Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, p.189-194
- JORDAN, M., VELOZO, J. 1997. In vitro propagation of highland papayas (*Carica pubescens* and *C. pentagona*). **Acta Horticulturae**, v.447, p.103-106
- LIN, C. M., YANG, J. S. 2001. Papaya somatic embryo from fruit-bearing field plants: effects of root supporting material and position of the root explants. **Acta Horticulturae**, v.560, p.489-492
- LITZ, R. E. 1984. Papaya. In: SHARP, D. A., EVANS, D.A., AMMIRATO, P. V. & YAMADA, Y., (Eds). **Handbook of plant cell culture**. New York, MacMillan, p.349-368
- LITZ, R. E. 1986. Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspensions cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.111, p.969-972
- LITZ, R. E., CONOVER, R.A. 1978. Somatic embryogenesis in cell cultures of *Carica stipulata*. **HortScience**, v.15, p.733-735
- MEDINA, J. C., BLEINROTH, E. W., SIGRIST, J. M. M., MARTINS, Z. J., NISIDA, A. L. A. C., BALDINI, V. L. S., LEITE, R. S. S. F., GARCIA, A. E. B., 1989. **Mamão: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2.ed. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 367p.
- MONMARSON, S., MICHAUX-FERRIERE, N., TEISSON, C. 1995. Production of high-frequency embryogenic calli from integuments of immature seeds of *Carica papaya* L. **Journal of Horticultural Science**, v.70, n.1, p.57-64
- PEREIRA, C. L., 1992. **Mamão, a fruta dos nossos quintais: ótima fonte de vitaminas e de renda para o produtor**. 1 ed. Coleção Brasil Agrícola, Editora Ícone, São Paulo, 78p.
- SIMÃO, S. 1998. **Tratado de Fruticultura**. FEALQ. Piracicaba, SP. p. 541-575.

VEGA DE ROJAS, R., KITTO S. L. 1991. Regeneration of babaco (*Carica pentagona*) from ovular callus. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.116, p.747-752

VICIENT, C. M., MARTINEZ, F. X. 1998. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, n.1, p.1-12

YANG, J. S., YU, T. A., CHENG Y. H., YEH, S. D. 1996. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of petioles of *in vitro* propagated multishoots. **Plant Cell Reports**, v.15, p.459-464

WINNAAR, W. 1988. Clonal propagation of papaya *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.12, n.3, p.305-310

CAPITULO 1

Anatomia e histoquímica da embriogênese somática em *Carica papaya* L. a partir de embriões zigóticos imaturos

RESUMO

Neste trabalho são descritos alguns aspectos relacionados à anatomia e histoquímica do processo morfogênico da embriogênese somática em *Carica papaya* L. 'Improved Sunrise Solo Line 72/12', induzida a partir de embriões zigóticos imaturos, em meio contendo 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Para este propósito foram coletadas amostras de explantes contendo 0, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 45 e 60 dias de cultivo. Após fixação e inclusão em historesina o material foi seccionado e submetido a colorações com azul de toluidina e aos testes histoquímicos PAS, que evidencia carboidratos totais e Xylidine Ponceu para proteínas. A partir de material fresco foram realizados testes histoquímicos complementares que detectam a presença de lipídeos e amido. Os estudos anatômicos revelaram a ocorrência de embriogênese somática direta, a partir de células protodérmicas e subepidérmicas na região do domo apical, ao 20º dia de cultivo, e a formação de complexos embriogênicos nas camadas periféricas do calo, após 45 dias de cultivo. Os testes histoquímicos possibilitaram a identificação de substâncias de reserva como amido, proteínas, abundância de lipídeos e presença de compostos fenólicos.

1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) está entre as principais culturas de importância econômica em países tropicais e subtropicais, tendo expressiva comercialização e aceitação mundial (Schmidt, 1994).

A principal forma de propagação utilizada, em escala comercial é por sementes (Maranca, 1992). Sendo uma espécie alógama e, portanto com elevada taxa de polinização cruzada, a alta segregação gênica nas progênes obtidas impede a manutenção do genótipo manifestado pela planta-mãe (Viana, 1996). Segundo Litz (1984) e Winnaar (1988) os métodos convencionais de estaquia e enxertia não são eficientes para propagação em larga escala do mamoeiro.

Uma forma alternativa para a propagação de genótipos selecionados de mamoeiro está na utilização das técnicas da cultura de tecidos. A embriogênese somática, quando eficientemente estabelecida apresenta vantagens em relação aos demais sistemas de cultivo *in vitro*, permitindo a multiplicação, em larga escala, de embriões capazes de se desenvolverem em plantas completas. Além disso, constitui-se como uma importante estratégia para estudos de transformação genética (Jiménez, 2001).

A realização de estudos histológicos durante os eventos morfogênicos permite a confirmação da via de regeneração *in vitro*, revelando também os tipos celulares a partir dos quais surgem os embriões somáticos. Estas informações são de grande interesse, especialmente, em sistemas de transferência de genes (Matsumoto et al., 1996), servindo também de apoio para o aumento da manipulação da resposta embriogênica (Barbosa, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo apresentar alguns aspectos anatômicos e histoquímicos do processo de embriogênese somática em *Carica papaya* L., utilizando-se como fonte de explantes embriões zigóticos imaturos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Foram utilizados, como fonte de explantes, embriões zigóticos, resgatados a partir de frutos imaturos, obtidos de plantas hermafroditas de *C. papaya* L. 'Improved Sunrise Solo Line 72/12', com idade entre 80 a 90 dias após a antese. Os frutos foram coletados no pomar de produção comercial da empresa Caliman Agrícola, município de Linhares, Espírito Santo.

2.2. Indução de embriogênese somática

No laboratório, os frutos foram lavados com detergente neutro, sob água corrente, sendo mantidos na geladeira, sob temperatura de aproximadamente 10°C, até o momento do inóculo. Antes da extração dos embriões os frutos foram desinfestados superficialmente em solução comercial de hipoclorito de sódio (2:1), durante 15 minutos, seguido de imersão em etanol 95%, durante 30 minutos, dentro da câmara de fluxo laminar. Sob condições assépticas, os embriões foram extraídos com o auxílio de um microscópio estereoscópico e inoculados, em posição horizontal no meio de cultivo para induzir embriogênese somática.

O meio utilizado para indução embriogênica (MI) foi o MS (Murashige e Skoog, 1962) meia força, suplementado com 6% de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 400 mg L⁻¹ de L-glutamina, 0,2 g L⁻¹ de glicina, 0,05 g L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,05 g L⁻¹ de piridoxina.HCl e 0,01 g L⁻¹ de tiamina.HCl, 2 mg L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e 2,8 g L⁻¹ de Phytigel® (Sigma, USA).

O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da autoclavagem, à temperatura de 121°C e pressão de $1,05 \text{ Kg cm}^{-2}$, por 20 minutos.

Foram inoculados 10 embriões em cada placa de Petri (60 x 15 mm, J. Prolab, Brasil), contendo 15 mL de meio. As placas foram vedadas com filme de PVC (Goodyear, Brasil) e incubadas no escuro, sob temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.3. Maturação e germinação dos embriões somáticos

Foram testadas as capacidades de maturação e germinação dos embriões somáticos obtidos em meio semi-sólido. Calos embriogênicos com idade entre 60 a 70 dias, contendo embriões em diferentes estádios de diferenciação foram colocados em meio de maturação (MT), de composição similar ao meio de indução, porém destituído de 2,4-D e suplementado com 0,5 μM de ácido abscísico (ABA). Esta fase foi conduzida em presença de luz, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Após 60 dias de cultivo em meio de maturação, embriões somáticos no estádio cotiledonar foram isolados e colocados para germinar em meio MS na metade da concentração salina, suplementado com 3% de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, vitaminas MS e $2,8 \text{ g L}^{-1}$ de Phytigel[®]. Foram utilizadas placas de Petri descartáveis (60 x 15 mm). As culturas foram incubadas inicialmente no escuro, por um período de sete dias e, em seguida, transferidas para ambiente com o mesmo fotoperíodo e irradiância descritos anteriormente. Após a emissão da radícula e alongamento do hipocótilo, as plântulas foram transferidas para tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo o mesmo meio e mantidas sob as mesmas condições mencionadas.

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II, no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.4. Anatomia e histoquímica do processo de embriogênese somática

A caracterização anatômica e histoquímica do processo de embriogênese somática foi feita em explantes apresentando 0, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 45 e 60 dias de cultivo em meio MI e em embriões somáticos maduros cultivados em meio MT. As amostras foram coletadas e fixadas em FAA₅₀ (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 50%, 1:1:18 v/v) durante 24 horas no dessecador, sob vácuo e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). Os explantes foram desidratados em série etílica e incluídos em metacrilato (Historesin, Leica), preparado conforme instrução do fabricante. Os blocos foram cortados longitudinalmente em secções de 5 µm de espessura no micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 – Leica), com a utilização de navalhas de aço descartáveis. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina em pH ácido, para detectar radicais aniônicos e metacromasia (O'Brien e McCully, 1981) e também submetidas aos testes histoquímicos P.A.S (“periodic acid Schiff”) para polissacarídeos neutros (Maia, 1979) e XP (“Xylidine Ponceau”) para proteínas (O'Brien e McCully, 1981). As lâminas foram montadas em resina sintética (Permount[®]).

Foram também obtidos cortes de material fresco (não fixado) em criomicrotomo de calos com 10 e 45 dias de cultivo e embriões somáticos maduros (CM 1850 – Leica), em secções com 50 µm de espessura para realização de testes histoquímicos complementares. Esses foram submetidos às reações Sudan IV e Sudan black para verificação de compostos lipídicos (Jensen, 1962) e ao reagente de lugol para a confirmação da presença de amido (Johansen, 1940). Para efeito de comparação, cortes longitudinais de sementes imaturas foram também coradas com esses reagentes, para verificar o tipo de substância de reserva encontrada no endosperma.

As observações e a documentação fotográfica foram feitas em um fotomicroscópio Olympus (AX70), equipado com um sistema U-Photo.

Esta parte do trabalho foi conduzida no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal, da UFV.

2.5. Microscopia eletrônica de varredura

Amostras de calos embriogênicos foram fixadas em glutaraldeído 2% durante 24 horas, e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (Bozzola e Russel, 1992), durante 3 horas, preparados com tampão de cacodilato de sódio a 0,1 M. Após a desidratação do material em série etílica, realizou-se a secagem em ponto crítico com CO₂ (Balzers modelo CPD 020). Esses materiais foram pulverizados com uma película de ouro metálico de 10 nm (Bozzola e Russel, 1992), em equipamento de Balzers (modelo FDU 010). As observações e a documentação fotográfica foram feitas em microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM T-200), do Departamento de Fitopatologia, da UFV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Desenvolvimento e morfologia

O cultivo de embriões imaturos de *C. papaya* L., em meio suplementado com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D (MI), resultou na proliferação de calos embriogênicos, na maioria semi-compactos, de coloração creme ou amarronzada, e de consistência viscosa. Em alguns explantes verificou-se a formação de áreas friáveis constituídas por células translúcidas. A reação calogênica ocorreu principalmente na região do eixo hipocótilo-radícula e na base dos cotilédones, sendo manifestada entre o quinto e décimo dia de cultivo, após a abertura dos cotilédones e um pequeno alongamento do hipocótilo.

As primeiras respostas embriogênicas foram observadas na terceira semana de cultivo, mais freqüentemente na região meristemática do domo apical. Inicialmente, verificou-se a formação de estruturas globulares, de coloração branca a amarelo-palha, e estas se diferenciaram assincronicamente, passando pelos estádios cordiforme, torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar. Aos 45 dias, foram obtidos calos com embriões em todos os estádios de desenvolvimento (Figuras 1 e 2).



Figura 1- Embriogênese somática em *Carica papaya* L., induzida a partir de embriões zigóticos imaturos em meio MS, suplementado com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. **A-** Embrião zigótico imaturo antes da indução; **B-** domo apical embriogênico aos 25 dias de cultivo; **C-D:** calos embriogênicos com 60 dias. Barras = 5mm.

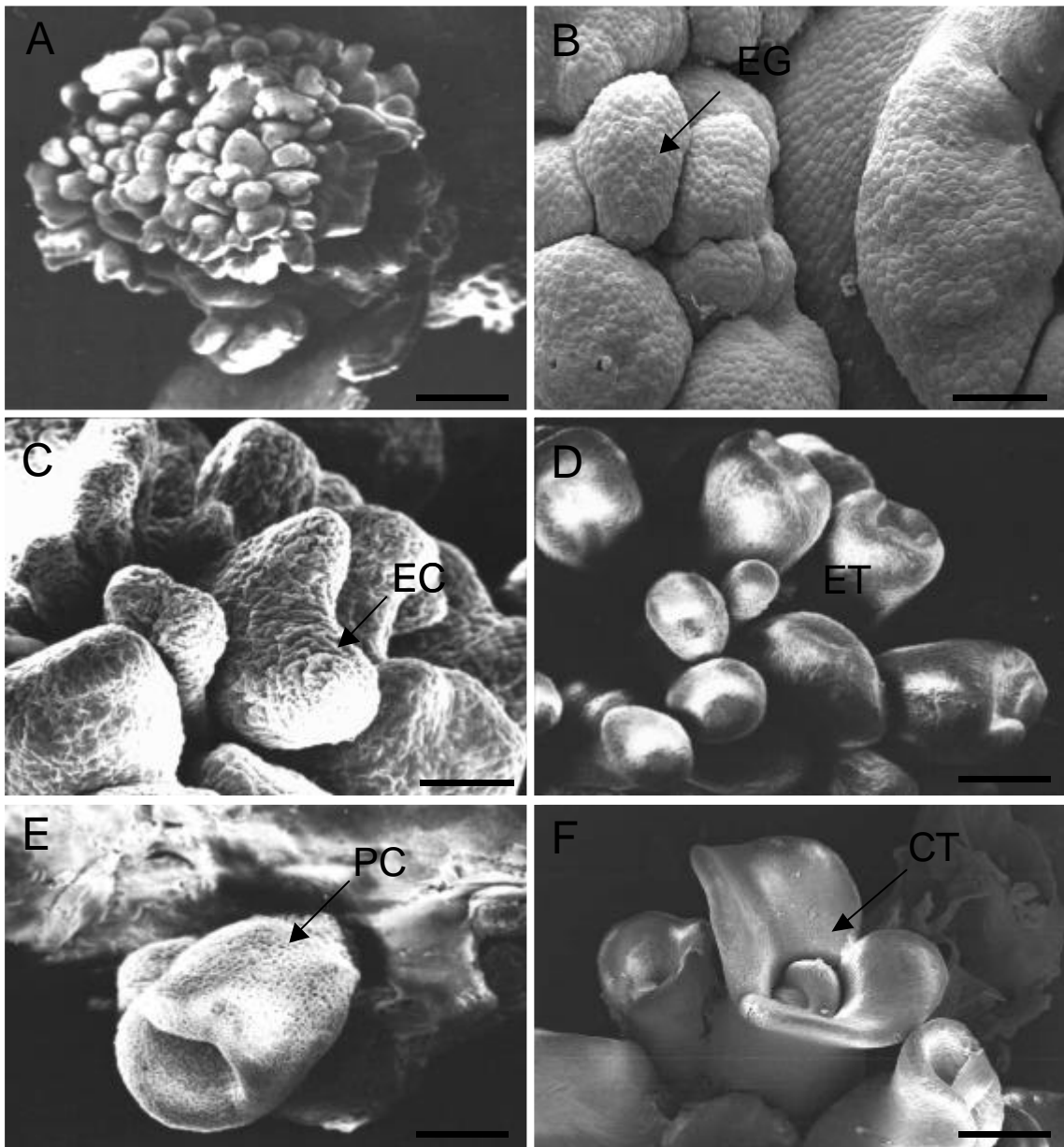


Figura 2- Eletromicrografia de varredura de um calo embriogênico de *Carica papaya* L., com 60 dias de cultivo em meio MS contendo $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. **A-** Vista geral da região do domo apical com embriões somáticos em diversos estádios de desenvolvimento; **B-** Detalhe de embriões somáticos em estágio globular (EG); **C-** detalhe de um embrião cordiforme; **D-** embriões no estágio torpedo (ET); **E-** embrião pré-cotiledonar (PC); **F-** embrião cotiledonar (CT). Barras: A, C, D-E = $10 \mu\text{m}$; B e F = $100 \mu\text{m}$.

A utilização de embriões zigóticos imaturos para indução de embriogênese somática em mamoeiros foi relatada pela primeira vez por Fitch e Manshardt (1990) nos cultivares comerciais Kapoho, Sunrise, Sunset e Waimanalo, utilizando-se de diferentes níveis de 2,4-D. As melhores concentrações de 2,4-D utilizadas variaram entre 1 mg L⁻¹ para o cultivar Sunset, Waimanalo e Kapoho a 5 mg L⁻¹ para o cultivar Sunrise. No presente estudo a concentração de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D foi suficiente para produzir calos altamente embriogênicos.

O uso de embriões zigóticos para iniciação de culturas embriogênicas apresenta algumas vantagens em relação às demais fontes de explantes. Uma delas está na rápida obtenção de resposta. No presente trabalho massas proembriogênicas foram observadas em apenas 3 semanas de indução, comparado com 14 semanas para secções de hipocótilo (Fitch, 1993) e aproximadamente 11 semanas para explantes como folhas cotiledonares, epicótilo e hipocótilo com folhas cotiledonares (Almeida et al., 2000). Dessa forma embriões zigóticos podem ser uma excelente fonte de explantes para a condução de trabalhos, visando estudos relacionados à fisiologia da embriogênese somática em mamoeiro. Uma outra vantagem observada neste trabalho está na baixa frequência de contaminação por microrganismos.

A indução de embriogênese somática por meio de embriões zigóticos tem sido relatada para outras espécies, como em *Larix leptolepis*, onde foi obtida alta frequência de calos embriogênicos em meio suplementado com 2,4-D e BAP (Kim et al., 1999). Em *Araucaria angustifolia* a iniciação embriogênica foi obtida partir de células do suspensor, em meio suplementado com 45 µM de 2,4-D, caseína hidrolisada e 11 µM de BAP. Em girassol (*Helianthus annuus* L.) a embriogênese somática ocorreu na presença de BAP e 12% de sacarose (Charrière e Hahne, 1998). Recentemente Paiva-Neto et al. (2003) obtiveram embriões somáticos primários a partir de embriões imaturos de urucum (*Bixa orellana* L.), após 25 dias de cultivo em meio suplementado com carvão ativado e diferentes combinações de 2,4-D e cinetina.

Contudo tem sido observado que, variações sazonais durante o desenvolvimento do zigoto pode afetar a eficiência do explante na indução de competência embriogênica (Fitch e Manshardt, 1990). Alguns trabalhos também tem demonstrado que a resposta embriogênica pode variar conforme a

época de coleta das sementes. Em *Larix leptolepis*, foi observado que a frequência de iniciação embriogênica variou conforme a época de coleta das sementes (Kim et al., 1999). O mesmo foi observado em culturas de embriões imaturos de *Araucaria angustifolia* (Astarita e Guerra, 1998).

No presente trabalho foi visivelmente observado que, embriões zigóticos oriundos de frutos coletados nos meses de janeiro, fevereiro e março apresentaram melhores respostas em relação a frutos coletados em outras épocas, especialmente nos meses de inverno (dados não mostrados). Ressalta-se ainda que os frutos coletados nos meses de junho a outubro, com a mesma idade de coleta (80 a 90 dias após a antese), apresentavam embriões menos desenvolvidos ou ausência de embriões nas sementes, sendo um indicativo de intensas mudanças fisiológicas na planta, nessa época do ano.

A transferência dos embriões com 60 dias de cultivo para o meio suplementado com 0,5 μ M de ácido abscísico (ABA), propiciou a maturação dos embriões somáticos, desenvolvendo estruturas cotiledonares e o acúmulo de substâncias de reserva, detectadas pelos testes histoquímicos. Contudo foi observado que os embriões mantidos nesse meio, mesmo em presença de luz, permaneceram aclorofilados e pequenos. Em muitas espécies, o ABA tem sido indicado para redução do processo de embriogênese secundária ou para prevenção da germinação precoce (von Arnold et al., 2002), além de estimular a deposição de materiais de reserva como amido, proteínas e lipídeos, acúmulo de metabólitos secundários, exercendo também importante papel no desenvolvimento da coifa (von Aderkas et al., 2002). Entretanto, longos períodos de exposição ao ABA podem ter um efeito negativo no crescimento da planta (Bozhkov et al., 1998).

Observou-se, também uma alta frequência de embriões morfológicamente anormais. Entre as anomalias presentes embriões com cotilédones fusionados formando estruturas cilíndricas (Figura 3A), embriões fundidos na porção basal ou por toda a extensão do eixo embrionário, monocotiledonares (Figura 3B) e embriões destituídos do meristema apical. Variações como esta foram também observadas por Fernando et al. (2001). Possivelmente, a falta de contato da região do domo apical com o meio de cultivo, seja desfavorável ao desenvolvimento normal dos embriões somáticos, contribuindo também para a falta de assincronia no processo de maturação.

Embriões fenotipicamente normais foram capazes de germinar em meio MS0 (sem a adição de reguladores de crescimento), sendo observada a emissão da radícula e o início de desenvolvimento da parte aérea, contudo não foram capazes de regenerar plantas. A maioria das plântulas após vários meses de cultivo apresentava um pronunciado alongamento das raízes e o não desenvolvimento de parte aérea. Foram também observadas raízes com sinais de calejamento, possivelmente não funcionais, impedindo o desenvolvimento normal das plântulas. Outros ao invés de raízes apresentaram apenas formação de calo na base.

Almeida et al. (2000), regeneraram plantas predominantemente anormais, apresentando folhas minúsculas, alongamento reduzido e ausência de enraizamento, mesmo em meio de cultura com altas concentrações de AIB. De acordo com Litz (1986), plântulas de mamoeiro derivadas de calo tendem a apresentar anomalias, tais como policotiledonia, fasciação e falha no crescimento internodal. Similarmente, Paiva-Neto et al. (2003) encontraram dificuldades em regenerar plantas de urucum (*Bixa orellana*), tendo obtido plântulas com considerável desenvolvimento de raízes, mas sem desenvolvimento de parte aérea.

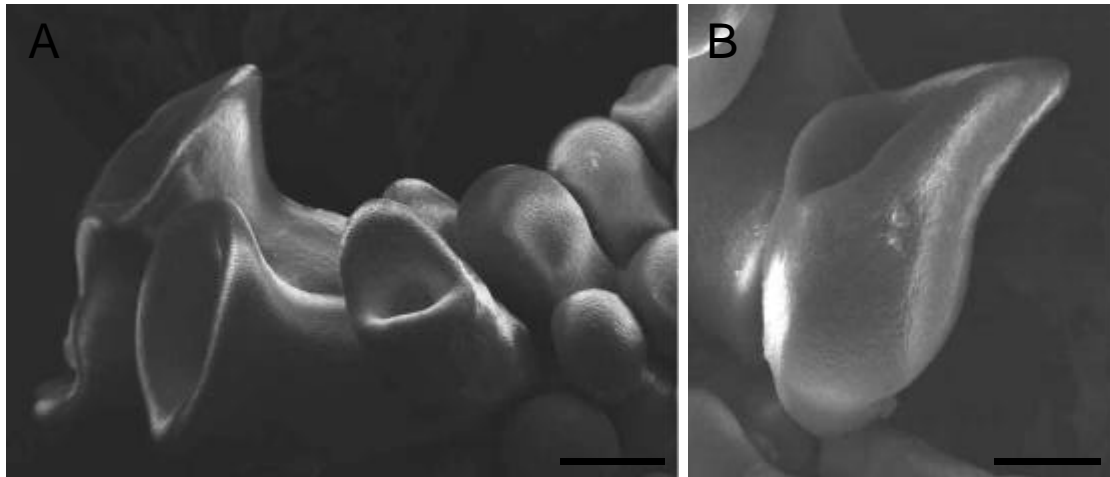


Figura 3- Eletromicrografia de embriões morfologicamente anormais: **A-** embriões com cotilédones fusionados em forma de trompete; **B-** embrião monocotiledonar. Barras: A = 200 μ m; C = 100 μ m.

3.2. Análise anatômica e histoquímica do processo de embriogênese somática

Anatomicamente, o embrião zigótico de *C. papaya* (Figura 4A) assemelha-se aos embriões de outras dicotiledôneas, segundo descrição feita por Esaú (1987), sendo constituído basicamente por uma protoderme bem definida, meristema fundamental e procâmbio. Nos cotilédones observa-se o início da diferenciação dos parênquimas paliçádico e lacunoso (Figura 4A). Compostos lipídicos constituem uma importante fonte de reserva energética, evidenciados pela reação positiva ao teste com Sudan IV.

As figuras 4 e 5 ilustram os eventos iniciais que constituem o processo de calogênese e embriogênese somática. As primeiras evidências de divisões celulares foram observadas ao terceiro de cultivo nas proximidades das iniciais do procâmbio, ao longo de todo eixo-embriônico (Figura 4B).

Ao quinto dia, verificou-se divisões preferencialmente periclinais em direção à periferia (Figura 4F). No ápice radicular foram observadas vários planos de divisão (Figura 4C), formando nessa região um arranjo compacto de células com intensa atividade meristemática, e de características distintas das demais, por apresentarem citoplasma denso, núcleos volumosos e nucléolos proeminentes. Externamente a essa região de proliferação celular as células do

meristema fundamental, correspondentes à região cortical e protoderme tornaram-se mais vacuolizadas, conferindo a região de calejamento duas regiões distintas: a mais externa formada por células vacuolizadas e a mais interna constituída por células menores com intensa atividade mitótica.

Ao quinto dia foi ainda observado o rompimento da protoderme no ápice radicular e em algumas regiões do eixo embrionário e um início de descolamento das células vacuolizadas, possivelmente em função de um processo de degradação de paredes celulares. Nesse período foi observado que o eixo embrionário apresentava um ligeiramente alongado e mais espessado. As células do procâmbio sofreram divisões, mas permaneceram em seu estado indiferenciado.

Em explantes apresentando 10 e 15 dias de cultivo observou-se uma intensa vacuolização das células do ápice radicular. Nesse período foi possível visualizar que as pequenas células meristemáticas da região de proliferação celular, após sucessivas divisões em direção à periferia, também se tornam vacuolizadas e se desprendem do eixo, provocando crescimento do calo (Figuras 4D e 4E). Nesse estágio observou-se um grande número de amiloplastos com grãos de amido compostos, nas células vacuolizadas, externas a zona de proliferação celular, evidenciados mediante a reação com lugol (Figuras 5F e 5G). Contudo na região de proliferação celular o amido foi detectado em proporções bem menores, provavelmente em função de uma maior atividade metabólica (Benelli et al., 2001).

Um aspecto interessante está no fato de que as células que acumulavam amido estavam em contato direto com o meio de cultura, possivelmente exercendo uma função de fonte de carboidratos para as células mais internas. A reação positiva ao PAS confirmou a ocorrência de amido nos locais evidenciados pelo lugol (Figuras 5A, 5D e 5E) e evidencia um acúmulo de carboidratos residuais, entre as células vacuolizadas, possivelmente decorrentes de um processo de dissolução de paredes celulares, especialmente de lamela média e de parte da parede primária (Figura 5C). Contudo, é possível que ocorra a deposição de outros carboidratos como calose e mucilagem, sendo necessária a realização de testes específicos.

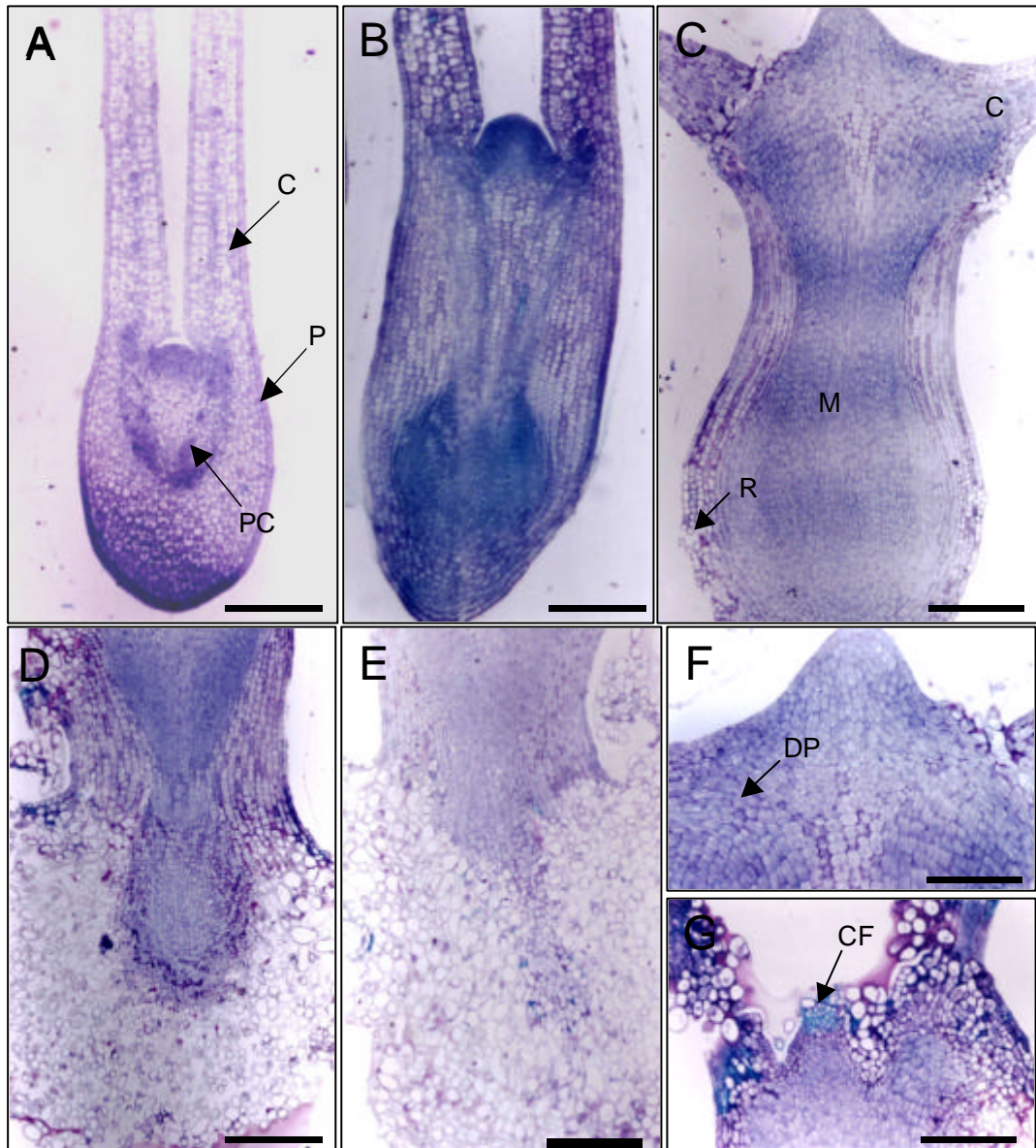
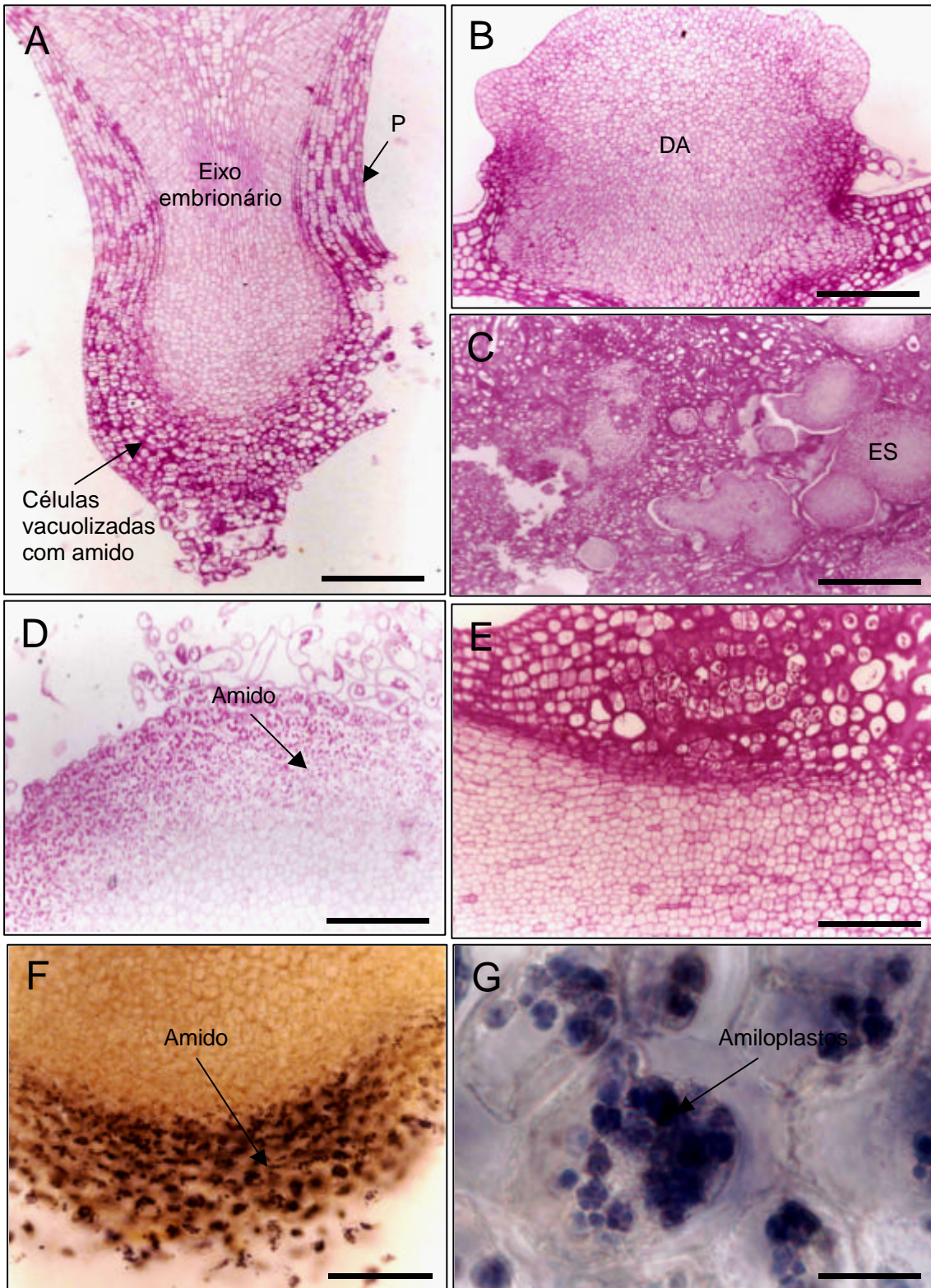


Figura 4 – Secções longitudinais do embrião zigótico de *Carica papaya* L. corados com azul de toluidina, nos estádios iniciais da calogênese: **A**- zero dias ; **B-E**: após 3, 5, 10 e 15 dias de incubação, respectivamente, em meio MS contendo 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D; **F-G** detalhes da região apical do embrião com 5 e 10 dias de cultivo, respectivamente. **C**= cotilédone; **D**= rompimento da protoderme; **M**= Região meristemática com intensa divisão celular; **P**= protoderme; **PC**= procâmbio; **DP**= divisões periclinais; **CF**= compostos fenólicos. Barras: A-E = 100 μ m; F = 50 μ m; G = 100 μ m.

Figura 5- Secções longitudinais de embriões zigóticos de *Carica papaya* L., cultivados em meio MS, suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D nos estádios iniciais da calogênese: **A-B** embrião zigótico aos 15 dias de cultivo em reação positiva ao PAS, evidenciando a presença de amido nas células mais externas; **C-** calo embriogênico com 45 dias de cultivo com grande acúmulo de carboidratos entre as células; **D-** detalhe da região amilífera; **E-** detalhe das células periféricas com amido e o início de dissolução da parede celular em explante com 15 dias de cultivo; **F-** região correspondente a **D** com amido evidenciado por lugol; **G-** Detalhe dos amiloplastos contendo grãos de amido compostos. **P=** protoderme; **DA=** domo apical; **ES=** embriões somáticos. Barras: A-D= 100 μ m; E -F= 50 μ m; G= 20 μ m.



No teste histoquímico específico para proteínas (“Xylidine Ponceu”) foram visualizadas proteínas de reserva, em forma de grânulos, nas células do meristema fundamental e nos cotilédones (Figuras 7E e 7G). Contudo na região central, constituída por células de intensa atividade mitótica, a reação foi positiva apenas para proteínas estruturais, evidenciando bem o núcleo e o nucléolo e proteínas dissolvidas no citoplasma, provavelmente relacionadas com a atividade mitótica (Figura 7F).

Aos 20 dias de cultivo, foram visualizadas faixas meristemáticas, intensamente coradas pelo azul de toluidina, ao longo da protoderme e tecidos subepidérmicos, na região do domo apical (Figura 6A). Na protoderme divisões em sentido anticlinal e periclinal acompanhavam o crescimento do domo apical, enquanto que as células mais internas apresentam vários planos de divisão (Figura 6B). Proembriões, provenientes de células da protoderme e tecidos subepidérmicos, foram visualizados aos 25 dias de cultivo, caracterizando um processo de embriogênese somática direta (Figuras 6C e 6D).

Aos 45 dias de cultivo uma série de complexos proembriogênicos com número variável de células foi visualizada, nas camadas periféricas do calo. Esses complexos se destacavam no calo, por apresentarem células com alta razão núcleo-citoplasma, nucléolos proeminentes, citoplasmas densamente corados com poucos grãos de amido e vários planos de divisão. Além disso, esses grupos de células, com características distintas, encontravam-se perfeitamente delimitados por paredes celulares espessas, permanecendo isolados das demais células do calo (Figura 6E).

Segundo Fernando et al. (2001), a presença desses complexos em calos de *C. papaya*, caracteriza um processo de embriogênese somática indireta, sendo os embriões originados a partir das células superficiais desses complexos proembriogênicos.

A análise ultraestrutural de calos embriogênicos de *Cocus nucifera* revelou que o isolamento das células embriogênicas ocorre em função do fechamento dos plasmodesmas, do rompimento do contínuo simplasto, deposição de calose e espessamento local das paredes celulares, sugerindo que o isolamento físico e fisiológico de células embriogênicas pode ser um pré-requisito para morfogênese futura (Verdeil et al., 2001).

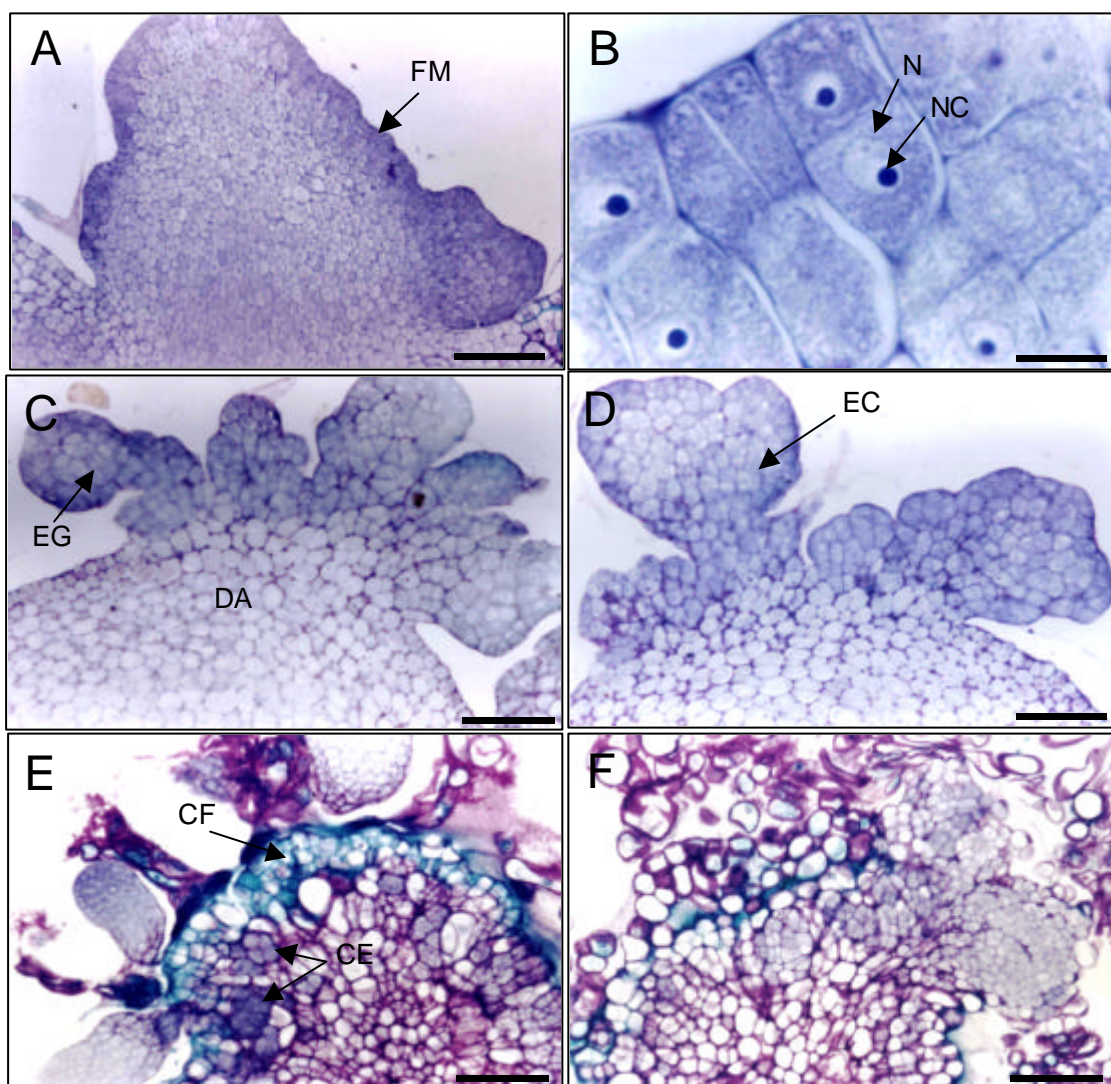


Figura 6 - Secções longitudinais de calos embriogênicos de *C. papaya* corados com azul de toluidina: **A**- proliferação de uma faixa contínua de células meristemáticas na protoderme e células subepidérmicas na região do domo apical; **B**- detalhe de células meristemáticas com divisões anticlinais e periclinais; **C-D**: embriões somáticos em diferenciação; **E-F**: calos com 60 dias de cultivo. **FM**= faixa meristemática; **N**= núcleo; **NC**= nucléolo; **DA**= domo apical; **EG** = embrião globular; **EC**= embrião cordiforme; **CE**= complexos embriogênicos; **CF**= compostos fenólicos. Barras: A-B = 100 µm; C = 100 µm; D = 10 µm; E-F = 100 µm.

Desse modo através da restrição do fluxo de moléculas para fora das células, mudanças metabólicas acabariam facilitando o processo de embriogênese somática.

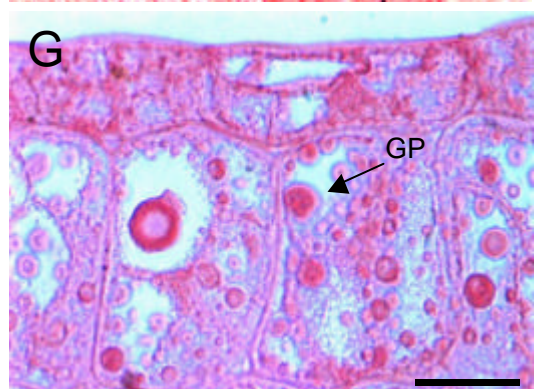
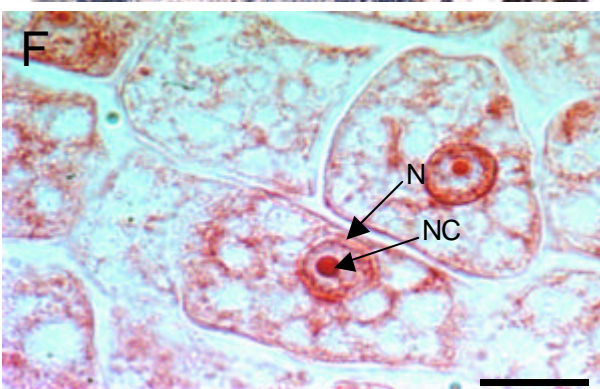
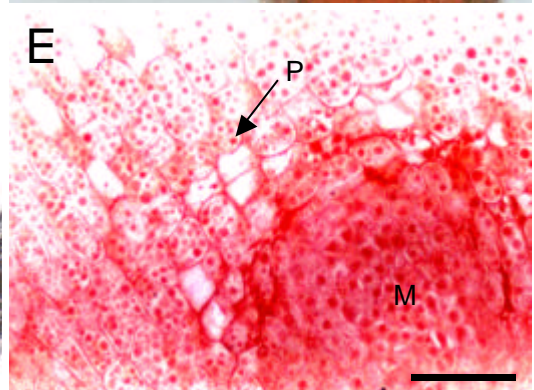
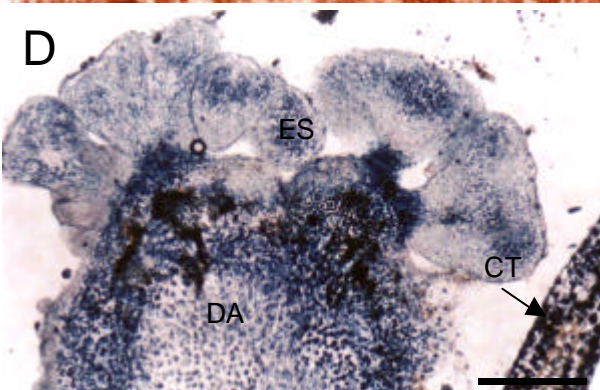
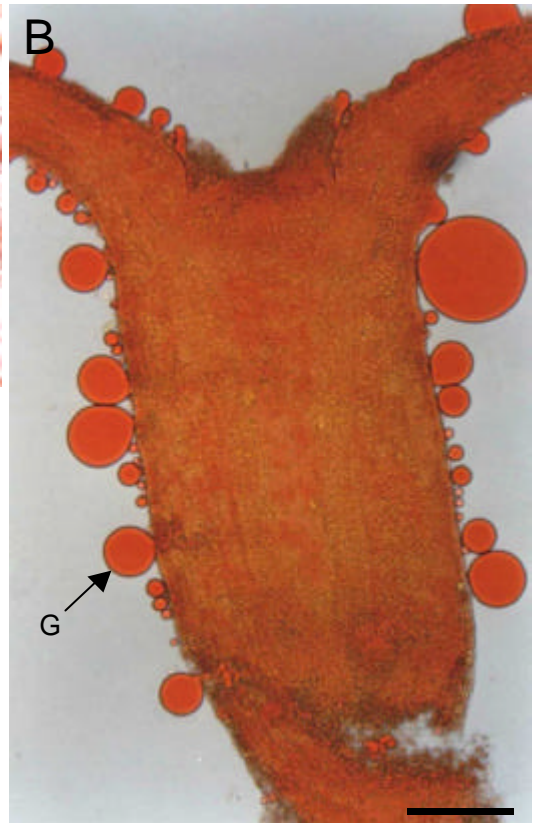
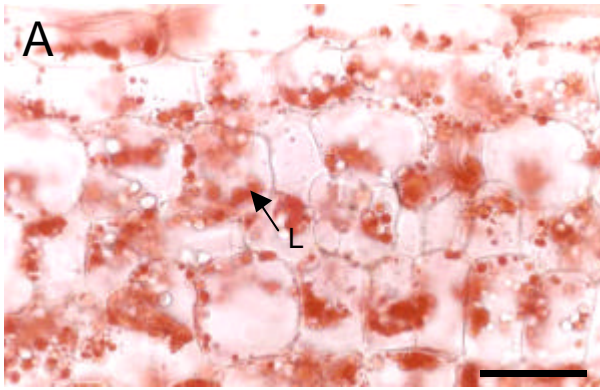
Os resultados obtidos confirmam as observações feitas por Fernando et al. (2001), de que os primeiros embriões somáticos surgiram de um processo direto a partir das células protodérmicas e subepidérmicas no domo apical e os demais de forma indireta a partir de células superficiais de complexos embriogênicos, localizados na periferia do calo.

Calos com 45 dias de cultivo foram caracterizados apresentavam intensa vacuolização das células mais externas, restando uma pequena zona de proliferação celular, constituída por células com características meristemáticas (Figura 6F). As células mais externas do calo apresentam necroses, havendo liberação de compostos fenólicos. Esses compostos foram identificados através da coloração metacromática do azul de toluidina, que adquirem uma coloração verde-azulada, na presença desse corante (Figuras 6E e 6F), conforme O'Brien et al. (1965). De acordo com Michaux-Ferriere et al. (1987), a presença desses compostos se deve à oxidação de substâncias produzidas no metabolismo secundário das células, formando novos compostos como as quinonas. Esses compostos são responsáveis pela coloração amarronzada dos calos.

Calos embriogênicos de *Carica papaya* L. reagiram positivamente ao teste com Sudan IV e ao Sudan Black, evidenciando imensa quantidade de compostos lipídicos. A presença desses compostos foi também evidenciada no embrião zigótico, confirmando a importância desse material de reserva. Nos embriões somáticos, a presença de compostos lipídicos foi observada a partir dos estádios iniciais de desenvolvimento, até o estádio cotiledonar maduro (Figuras 7A, 7B, 7C e 7D). No estudo apresentado por Fernando et al. (2001) não foi mencionada a presença de compostos de natureza lipídica. A presença de compostos lipídicos em calos de *Carica papaya* L. foi também mencionada por Yamamoto e Tabata (1989), em calos oriundos de secções de hipocótilo, através da microscopia eletrônica de transmissão.

Em embriões somáticos maduros foi detectada pouca quantidade de amido, principalmente na região da coifa e no meristema apical.

Figura 7- Secções longitudinais do embrião zigótico e de calos embriogênicos de *Carica papaya* L. **A-** compostos lipídicos no cotilédone do embrião zigótico, evidenciados pela reação positiva ao sudan IV; **B-** embrião somático cotiledonar com óleo de reserva. **C-D** calos embriogênico com acúmulo de lipídeo em reação positiva ao Sudan IV e Sudan black; **E-** embrião zigótico em processo de calogênese, com acúmulo de proteínas em forma de grânulos; **F-** Detalhe da região meristemática mostrada em E, com proteínas estruturais evidenciadas; **G-** Detalhe do cotilédone com proteínas em forma de grânulos. **ES**= embriões somáticos; **L**= compostos lipídicos; **G**= gotas de óleos liberadas durante o seccionamento; **N**= núcleo; **NC**= nucléolo; **DA**= domo apical; **CT**= cotilédone; **P**= proteínas; **M**= região central meristemática do eixo embrionário; **GP**= grânulos de proteínas. Barras: A = 50µm; B, C e D = 20 µm; E e G = 100 µm; F = 10 µm.



4. CONCLUSÕES

O estudo anatômico e histoquímico do processo de embriogênese somática em *Carica papaya* L., permitiu as seguintes conclusões:

- O processo de calogênese e embriogênese somática é o resultado de uma reestruturação dos tecidos, ocorrida principalmente em função das condições de cultivo como alta concentração de reguladores de crescimento, níveis de sacarose e regime de escuro. Embora a formação do calo seja comumente definida como crescimento desorganizado observou-se nesse processo uma seqüência de eventos organizados.
- As substâncias de reserva observadas no calo são coincidentes com aquelas encontradas no embrião zigótico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. P., OLIVEIRA, R. P., DANTAS, J. L. L. 2000. Protocolo para a embriogênese somática do mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.10, p.2017-2024

ASTARITA, L. V., GUERRA, M. P. 1998. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal – suspensor mass cultures. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n. 10, v. 2, p.113-118

BARBOSA, W. M. 2003. **Embriogênese somática em cafés Arábica e Robusta**. Tese (Doutorado em fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, MG, 100p.

BENELLI, C., FABBRI, A., GRASSI, S., LAMBARDI, M., RUGINI, E. 2001. Histology of embryogenesis in mature tissue of olive (*Olea europaeae* L.). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.76, n.1, p.112-119

BOZHKOVA, P., FILONOVA, L., VON ARNOLD S. 1998. Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. **Physiology Plant**, v. 104, p.211-224

BOZZOLA, J. J., RUSSEL, L. D. 1992. **Electron Microscopy**. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 542p.

CHARRIÈRE, F., HAHNE, G. 1998. Induction of embryogenesis versus caulogenesis on *in vitro* cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. **Plant Science**, v. 137, p.63-71

ESAÚ, K. 1987. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda. 293p.

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

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

FITCH, M. M. M. 1993. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 32, p.202-212

JENSEN, W. A. 1962. **Botanical histochemistry, principles and practice**. San Francisco, W. H. Freeman, 408 p.

JIMÉNEZ, V. M. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.196-223

JOHANSEN, D. 1940. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 523p.

KIM, Y. W., YOUN, Y., NOH, E. R., KIM, J. C. 1999. Somatic regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 55, p.95-101

LITZ, R. E. 1984. Papaya. In: SHARP, D.A., EVANS, D. A., AMMIRATO, P. V., YAMADA, Y. (eds). **Handbook of Plant Cell Culture**. New York, MacMillan,. p.349-368

LITZ, R. E. 1986. Papaya (*Carica papaya* L.) In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry tress**. Berlin: Springer, 1986. v. 1, p.220-232

MAIA, V. 1979. **Técnica histológica**, 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 246p.

MARANCA, G. 1992. **Cultura do mamão**. São Paulo: Nobel, 105p.

MATSUMOTO, T. K., WEBB, D. T., KUEHNLE, A. R. 1996. Histology and origin of somatic embryos derived from *Anthurium andraeanum* Linden ex André Lamina. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.121, p.404-407

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

MICHAUX-FERRIERE, N., DUBLIN, P. S., SCHWENDIMAN, J. 1987. Etude histologique de l' embrogenèse somatique à partir d' explantes foliaires de *Coffea Arabica* L. **Café Cacao Thé**, v. 31, p.103-111

O' BRIEN, T. P., FEDER, N., MCCULLY, M. E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v.59, n.2, p.368-373

O' BRIEN, T. P., McCULLY, M. E. 1981. **The study of structure principles and selected methods**. Melbourne, Termarcarphi Pty. Ltd, 280p.

PAIVA NETO, V., BOTELHO, M. N., AGUIAR, R., SILVA, E. A. M, OTONI, W. C. 2003. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.39, p. 629-634

SCHMILDT, E. R. 1994. **Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 1994. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa – UFV, MG. 84p.

VERDEIL, J. L.; HOCHER, V.; HUET, C.; GROSDEMANGE, F.; ESCOUTE J.; FERRIERE, N.; NICOLE, M. 2001. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. **Annals of Botany**, v. 88, pp.9-18.

VIANNA, G. R. 1996. **Micropropagação do mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizando ápices caulinares de plantas adultas**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, MG. 66p.

VON ADERKAS, P., ROHR, R., SUNDBERG, B., GUTMANN, M., DUMONT-BEBOUX, N., LELU, M. A. 2002. Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite in hybrid larch somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p.111-120

VON ARNOLD, S., SABALA, I., BOZHOKOV, P., DYACHOK, J., FILONOVA, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p.233-249

WINNAAR, W. 1988. Clonal propagation of papaya *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.12, n.3, p.305-310

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

CAPITULO 2

Efeitos do precursor do etileno ACC e dos inibidores AVG e STS na embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do precursor do etileno 1-aminociclopropano (ACC) e dos inibidores aminoetoxivinilglicina (AVG) e tiosulfato de prata (STS) na indução da embriogênese somática em *Carica papaya* L. Para tal utilizou-se como fonte de explantes embriões zigóticos imaturos. Com base nos resultados obtidos, foram avaliadas as frequências de calos embriogênicos e não-embriogênicos e a porcentagem de explantes não responsivos aos tratamentos. A suplementação do meio com ACC, em todos os níveis testados, não inibiu a aquisição de competência embriogênica, sendo observada uma frequência média de 58% de calos embriogênicos na concentração de 10 μ M. Em presença de 3 μ M de AVG foram visualizados resultados semelhantes ao tratamento controle em relação a frequência de calos embriogênicos, sendo, porém observadas menores intensidades de calejamento e redução do número de embriões somáticos por explante. Nas concentrações de 10 e 30 μ M foi observada alta porcentagem de explantes não-responsivos. A suplementação do meio com STS, na concentração de 3 μ M apresentou resultados semelhantes ao tratamento controle em relação à formação de calos embriogênicos. Nas maiores concentrações foi observada redução na frequência de calos embriogênicos e aumento na porcentagem de calos não-embriogênicos.

1. INTRODUÇÃO

Diversos fatores estão envolvidos no controle da morfogênese *in vitro*, dentre os quais, a presença de reguladores de crescimento como as auxinas e citocininas. O etileno é o único regulador encontrado na forma gasosa, que embora não seja suplementado, acumula-se facilmente nos recipientes de cultura, juntamente com outros compostos voláteis. Essa quantidade acumulada depende, primeiramente, da taxa de produção exibida pelos tecidos cultivados e do nível de trocas gasosas, permitida pelos recipientes de cultura (Reis et al., 2003).

O mecanismo de ação do etileno na regeneração *in vitro* ainda não é bem conhecido. Sabe-se, entretanto que esses efeitos variam muito em função da espécie, do tipo de tecido cultivado e da presença de fitorreguladores (George, 1993). O papel do etileno na regeneração *in vitro* vem sendo estudado em várias espécies, entre as quais: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Barbosa et al., 2001; Reis et al., 2003), *Bixa orellana* (Paiva Neto, 2002), *Brassica* sp. (Eapen et al., 1997), *Prunus persica* x *P. amygdalus*. (Dimasi-Therious e Economou, 1995), *Phaseolus vulgaris* (Carvalho et al., 2000), *Nicotiana tabacum* (Biondi et al., 1998), *Malus domestica* (Ma et al., 1998), *Triticum aestivum* e *Nicotiana plumbaginifolia* (Purnhauser et al., 1987).

A atuação do etileno na morfogênese *in vitro* pode ser verificada mediante a aplicação direta de etileno nos frascos de cultura ou pela suplementação do meio com o precursor imediato de biossíntese ACC (ácido 1-aminociclopropano carboxílico) ou com a presença de inibidores de biossíntese e ação fisiológica (George, 1993). Dentre os inibidores de

biossíntese, o AVG (aminoetoxivinilglicina) é considerado um potente inibidor, bloqueando a formação do ACC a partir do SAM (S-adenosilmetionina). A síntese de etileno também pode ser afetada por altas concentrações de íons cobalto que inibem a ação da oxidase do ACC, impedindo a conversão do ACC em etileno, baixas concentrações de oxigênio, acetilcolina e agentes quelantes. O controle da ação fisiológica do etileno pode ser obtido com a presença de íons prata, na forma de tiosulfato (AgS_2O_3) e/ou nitrato de prata (AgNO_3). Agentes quelantes e altas concentrações de dióxido de carbono podem também suprimir a ação fisiológica do etileno (George, 1993).

A aplicação de inibidores de biossíntese tem indicado um possível relacionamento entre a produção de etileno e poliaminas, ambos competindo pelo mesmo precursor, o SAM. Segundo Rounstan et al. (1994), os efeitos do etileno e das poliaminas parecem ser antagônicos e dessa forma altos níveis de etileno inibiriam a formação das poliaminas, comprometendo os eventos morfogênicos.

A atuação do etileno sobre a embriogênese somática também tem sido descrita em algumas espécies. Em *Coffea canephora*, foi observado que a aplicação de íons cobalto e íons prata, inibiram a formação de embriões somáticos em explantes foliares. Fuentes et al. (2000) observaram, em diferentes genótipos dessa espécie, um aumento no número de embriões somáticos por explante em concentrações de 30 e 60 μM de AgNO_3 , após 70 dias de cultura. Doses superiores afetaram a capacidade regenerativa dos genótipos avaliados. Esses resultados podem indicar uma possível e importante função regulatória do etileno sobre a embriogênese somática dessa espécie (Hatanaka et al., 1995).

O mamão é um fruto climatérico, cujas transformações resultantes do amadurecimento ocorrem rapidamente após a colheita do fruto fisiologicamente maduro, desencadeadas por uma alta produção do etileno e por um aumento da taxa respiratória (Paull, 1993).

Alguns estudos têm demonstrado que o desenvolvimento de plantas de mamoeiro (*C. papaya* L.) cultivadas *in vitro*, pode ser também influenciado por este regulador de crescimento de natureza volátil, indicando que, além de exercer um papel durante o amadurecimento dos frutos, o etileno pode também apresentar uma importante função regulatória no crescimento e no

desenvolvimento de plantas. Magdalita et al. (1997) relataram que o acúmulo de etileno, em altas concentrações nos frascos de cultura, afetou negativamente o potencial morfogênico de plantas de mamoeiro. Culturas de segmentos nodais enriquecidas com etileno ou com o precursor ACC apresentaram uma baixa taxa de multiplicação das gemas, redução de área foliar e incremento de senescência e abscisão foliar.

Lai et al. (1998) demonstraram que o controle de gases na atmosfera interna dos frascos, através de sistemas de ventilação, podem resultar em melhor rendimento e qualidade dos brotos de *C. papaya*. Esses sistemas consistem na utilização de tampas com membranas facilitadoras de trocas gasosas, impedindo o acúmulo de gases, entre estes o etileno.

A influência do etileno na embriogênese somática de mamoeiro tem sido, entretanto, até o momento, pouco discutida. Adkins et al. (1998) observaram que a suplementação do meio de cultivo com 50 μM de STS promoveu uma maior frequência de calos embriogênicos. O STS na concentração de 1 μM , também promoveu maiores taxas de germinação e conversão de embriões em plantas.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes concentrações do promotor de biossíntese ACC e dos inibidores AVG, ACC sobre o processo de indução da embriogênese somática *in vitro* em mamoeiro (*C. papaya* L.).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Foram utilizados como fonte de explantes embriões zigóticos extraídos de frutos Imaturos, coletados a partir de plantas hermafroditas de *Carica papaya* L. 'Improved Sunrise Solo Linhagem 72/12', com idade entre 80 a 90 dias após a antese. A desinfestação dos frutos e a extração dos embriões foram realizadas conforme protocolo descrito no item 2.1 do capítulo 1.

2.2. Indução de embriogênese somática em presença de inibidores de etileno e do precursor ACC

Para avaliar o efeito do precursor ACC e dos inibidores AVG e STS durante a indução da embriogênese somática em mamoeiro, foram adicionados ao meio indutor, descrito no item 2.2 do capítulo 1, alíquotas de soluções-estoque filtro-estéreis, correspondentes às concentrações de 3, 10 e 30 μM de ACC, AVG (Sigma Chemical Co.) e STS, após a autoclavagem. As soluções de ACC e AVG foram filtro-esterilizadas em membrana com poros de 0,22 μm de diâmetro (Millex-GS[®], Millipore, US). O STS foi preparado segundo a metodologia descrita por Reid et al. (1980).

Os explantes foram inoculados em placas de Petri (60 x 15 mm, J. Prolab), contendo 15 mL de meio. Em cada placa foram inoculados 10 explantes, sendo mantidas no escuro, sob temperatura de 27 ± 2 °C.

A avaliação do experimento foi realizada após 60 dias de cultivo. Com base nos resultados obtidos foram observadas as frequências de calos

embriogênicos e não embriogênicos e a porcentagem de explantes não responsivos aos tratamentos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, sendo cada placa uma repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para comparação entre as médias dos tratamentos com a média do controle foi realizado o teste de Dunnett a 1% de probabilidade. Tomou-se também como dados a intensidade de calejamento dos explantes, classificada em baixa, média e alta e o número de embriões somáticos por explante, em categorias de 1 a 20, 21 a 50 e mais que 50 embriões somáticos por explante. Para maior validação dos resultados, o experimento foi repetido uma vez.

3. RESULTADOS

A adição de 3 μM de AVG no meio de indução, não afetou significativamente a frequência de calogênese e embriogênese somática (Figuras 1A, 1B e 2A). Entretanto, em relação ao controle (Figura 3A), observou-se um menor número de embriões somáticos/explante e o desenvolvimento de estruturas anormais. As maiores concentrações, 10 e 30 μM , reduziram drasticamente o número de explantes responsivos (Figuras 1C, 2B e 2D). Na concentração de 10 μM , embora tenha se observado baixa porcentagem de embriogênese somática, em torno de 20% (Figura 1A), verificou-se que os explantes responsivos apresentavam um alto número de embriões somáticos, geralmente superior a 50 embriões/explante (Figura 2D).

A incorporação do ACC ao meio de indução não inibiu a aquisição de competência embriogênica em embriões imaturos de *Carica papaya* L., não sendo observadas diferenças significativas na frequência média de explantes responsivos em todas as concentrações testadas, em relação ao tratamento controle (Figura 1A).

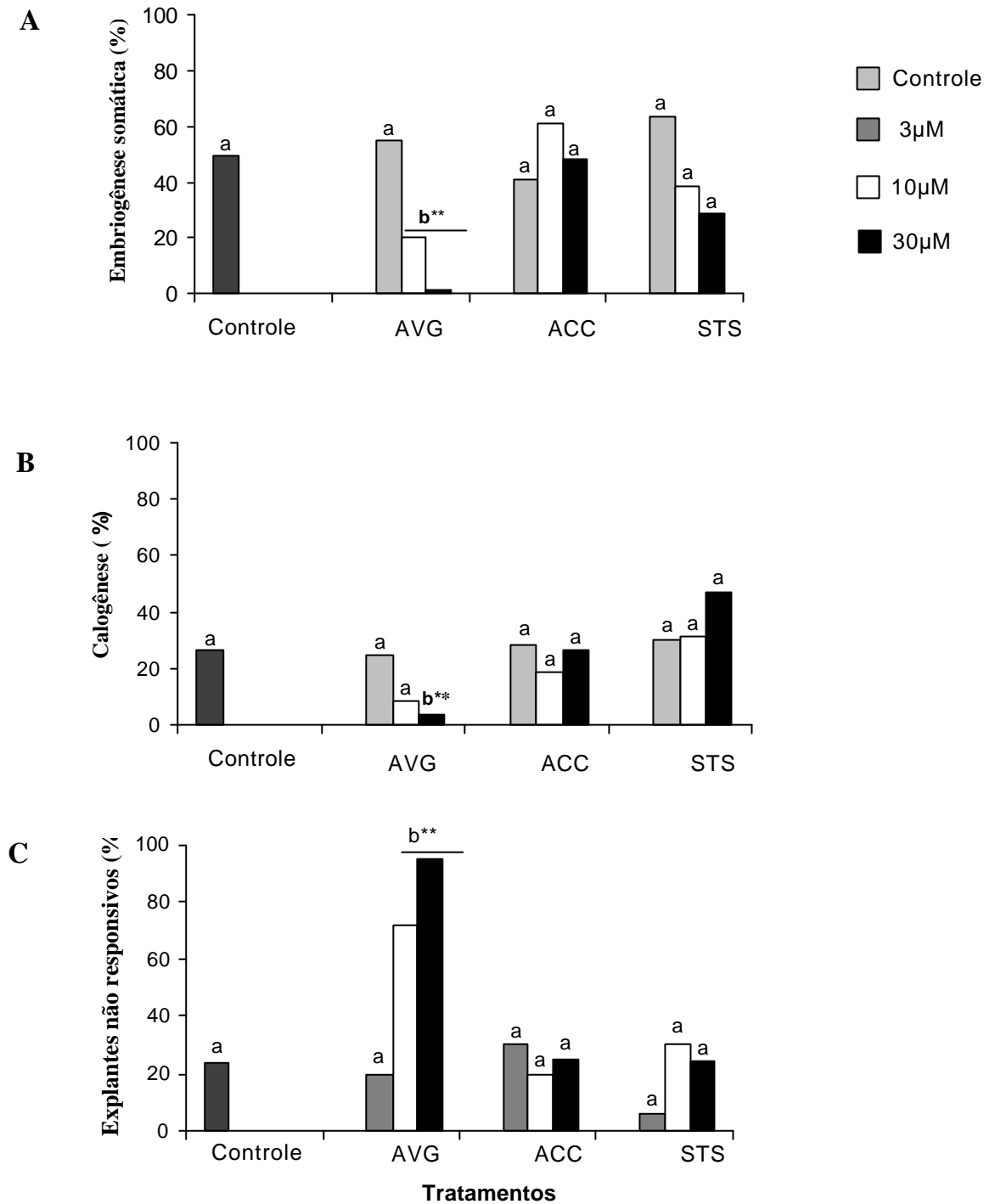


Figura 1– Efeitos do precursor do etileno ACC e dos inibidores AVG e STS sobre a indução de embriogênese somática em embriões imaturos de *Carica papaya* L. **A**- frequência de embriogênese somática; **B**- frequência de calos não-embriogênicos; **C**- porcentagem de explantes não responsivos. Os tratamentos seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente; letras diferentes seguidas por asteriscos indicam diferenças significativas entre o controle e os demais tratamentos pelo teste de Dunnett (P 0,01).

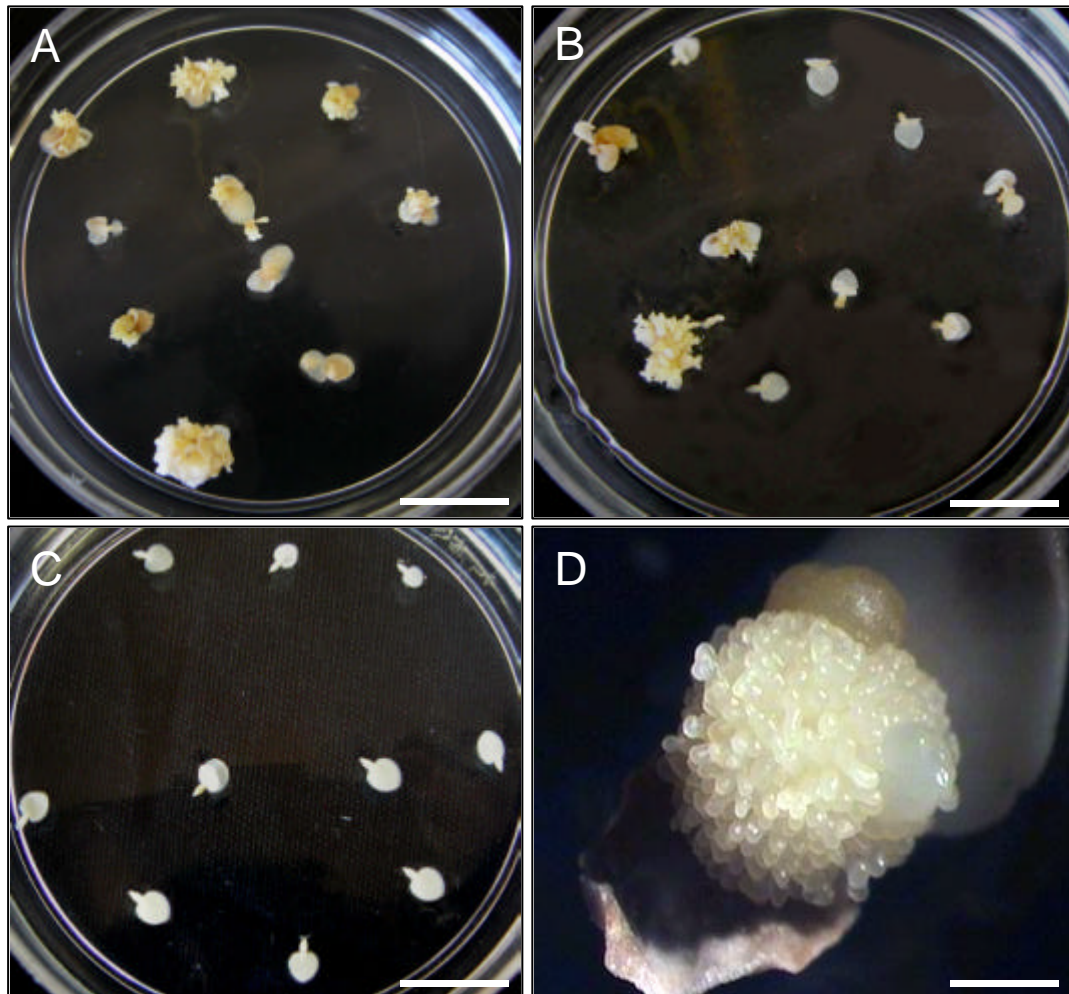


Figura 2- Efeitos do AVG sobre o processo de indução da embriogênese somática em *Carica papaya* L., após 60 dias de cultivo. **A-** tratamento com 3 μ M de AVG; **B-** explantes cultivados em meio suplementado com 10 μ M de AVG; **C-** explantes não responsivos ao meio de indução contendo 30 μ M de AVG; **D-** detalhe de um explante cultivado em meio com 10 μ M de AVG. Barras: A-C = 10 mm; D = 5 mm.

O meio suplementado com 3 μM do ACC , diferentemente do controle, provocou um intenso calejamento dos explantes, sendo observada a formação de calos embriogênicos de alta intensidade e número de embriões somáticos variando entre 20 e 50 por explante (Figuras 3B e 3C). Os maiores níveis de ACC (10 e 30 μM), levaram à formação de calos embriogênicos (Figura 3B) de intensidade baixa ou média, e de pouca expressão embriogênica (1 a 20 embriões somáticos por explante). Ao final de 60 dias, os primeiros embriões formados encontravam-se em estágio de desenvolvimento avançado, muitos apresentando anomalias. A frequência média de calos não-embriogênicos também não diferiu estatisticamente, em todos os níveis testados, sendo porém observada uma menor intensidade de calejamento nas maiores concentrações, predominando a presença de calos de baixa intensidade (dados não mostrados). A presença do ACC no meio induziu um alto grau de oxidação dos explantes. Alguns explantes apresentaram sintomas de toxicidade, mesmo na menor concentração (Figuras 3B e 3C).

As frequências de calogênese e embriogênese somática foram menos afetadas com a adição do STS em relação ao AVG (Figura 1A), não diferindo significativamente em relação ao controle. Entretanto observou-se uma redução na quantidade de explantes induzidos nos níveis de 10 e 30 μM . A presença do STS provocou um intenso calejamento dos explantes, formando calos embriogênicos e não embriogênicos (Figuras 2C e 2F), porém com menor número de embriões somáticos/explante (1-20), quando comparado aos tratamentos com ACC e ao controle.

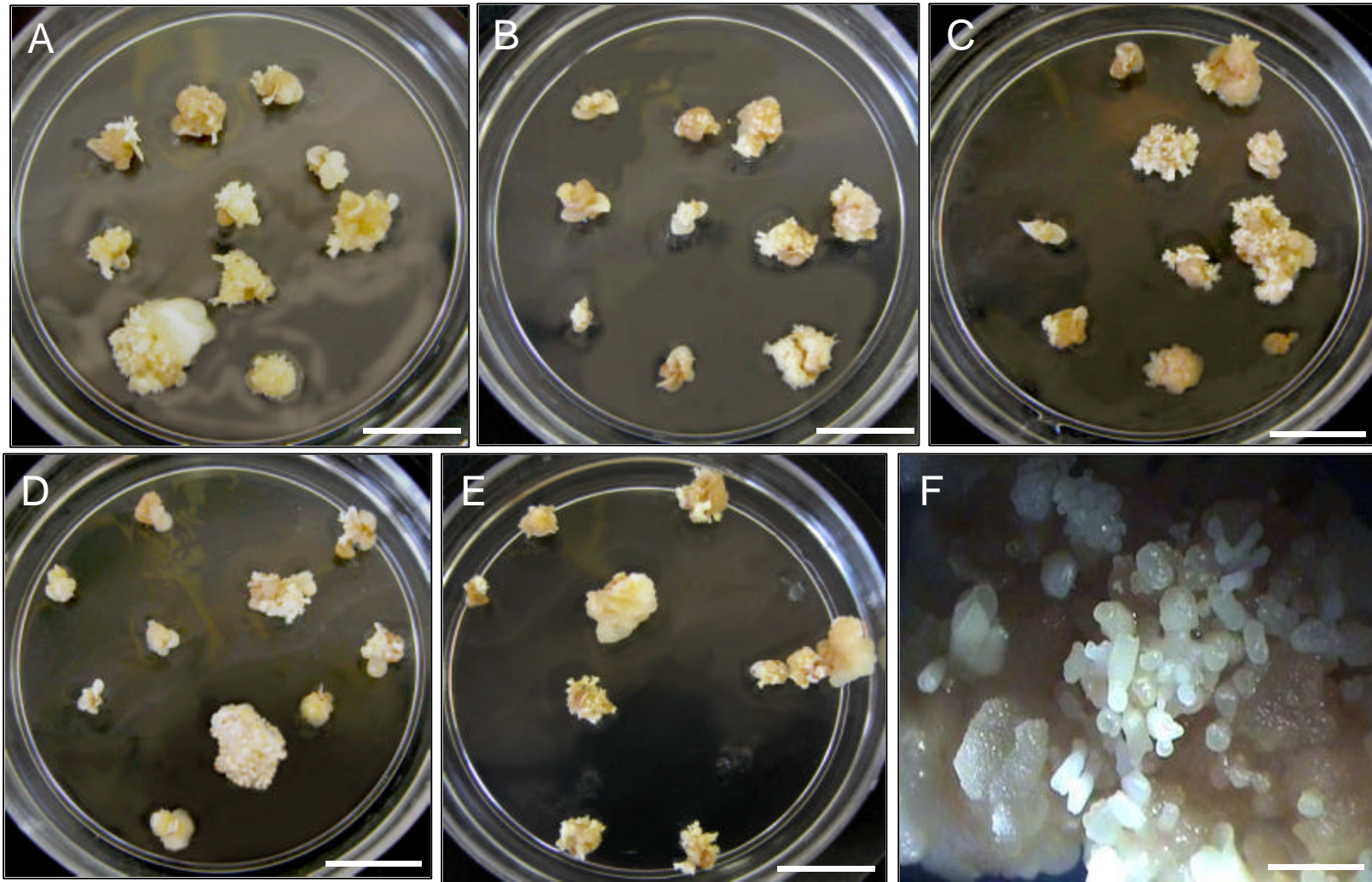


Figura 3-Efeitos do ACC e do STS sobre a embriogênese somática em *Carica papaya* L. **A**- tratamento controle; **B** e **C**- calos embriogênicos obtidos em meio indutor suplementado com 3 e 10 μ M de ACC; **C** e **D**- Calos obtidos em meio indutor com 3 e 10 μ M de STS; **E**- detalhe de calo embriogênico obtido no tratamento com 10 μ M de ACC. Barras: A – D = 10 mm; E = 5 mm.

4. DISCUSSÃO

Os efeitos do etileno na morfogênese *in vitro*, assim como outros reguladores de crescimento, dependem de sua concentração exógena e dos níveis endógenos presentes nos tecidos, bem como da sensibilidade dos tecidos a este regulador (Thorpe, 1994). Segundo Biddington (1992), existe sempre uma concentração crítica de etileno pela qual a morfogênese é afetada. Concentrações acima ou abaixo podem apresentar efeitos inibitórios ou benéficos.

Os resultados do presente trabalho indicam que o etileno, possivelmente, produzido no tratamento controle, até certo nível, não afetou a aquisição de competência embriogênica por embriões imaturos de *Carica papaya* L., cultivados em presença de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D. Interessantemente, a inclusão do ACC, em todos os níveis, não interferiu significativamente nas respostas das culturas em relação ao controle. Os dados sugerem que o etileno parece ser importante no desencadeamento da aquisição da competência das células e conseguinte capacitação e determinação das mesmas para embriogênese somática.

Segundo Nissen (1994), a adição de ACC, ethephon e etileno, em baixas concentrações, estimularam a embriogênese somática em suspensões celulares de cenoura, todavia inibidores do etileno retardaram o processo. De acordo com esse autor, as respostas e resultados contrastantes podem ser explicados, pelos níveis endógenos de etileno, sendo em alguns sistemas, considerados sub-ótimos. Rounstan et al. (1994) apresentaram que o etileno pode afetar estádios específicos da embriogênese somática em cenoura,

mostrando que a presença do etileno não afetou a fase de indução, mas foi inibitória durante o desenvolvimento dos embriões somáticos.

Em *Coffea canephora* a incorporação de CoCl_2 , um inibidor da produção de etileno reduziu em 40% a formação de embriões e a adição de AgNO_3 , em concentrações a partir de 5 μM inibiu completamente a embriogênese somática. Por outro lado, a adição de 12 $\mu\text{l/l}$ de etileno, aumentou o número de embriões a 45%, quando comparado ao controle. A aplicação de etileno reverteu totalmente a inibição da embriogênese, induzida por CoCl_2 , indicando que o etileno desempenha um importante papel na formação de embriões somáticos em explantes foliares desta espécie (Hatanaka et al., 1995).

A adição de 3 μM de AVG, apesar de não ter afetado o processo de indução inibiu a diferenciação de embriões somáticos, formando estruturas anormais. Contudo, os maiores níveis testados afetaram significativamente a morfogênese, resultando em até 95% de explantes não responsivos (Figura 1C). Possivelmente, essas concentrações utilizadas foram muito altas, causando toxicidade nos tecidos. A possível toxicidade desses inibidores sintéticos foi mencionada por Kumar (1998). Segundo esse autor, as interpretações precisam ser cautelosas, pois é possível que a resposta inibitória não esteja correlacionada ao efeito do inibidor sobre o etileno, mas aos efeitos tóxicos do inibidor.

Em culturas de segmentos nodais de *Carica papaya* L. a suplementação do meio com 1,2 μM de AVG, melhorou significativamente o rendimento das culturas, observado no crescimento das plantas, no aumento de área foliar e redução da senescência foliar. Entretanto doses superiores a esta reduziram drasticamente a organogênese. A presença do STS a 0,3 mM também melhorou o aspecto das culturas, enquanto que a adição de 0,7 a 1,0 mM afetaram o crescimento (Magdalita et al., 1997). No presente trabalho, o STS (10 e 30 μM), apesar de não atuar como inibidor da aquisição de competência embriogênica, afetou a formação de embriões somáticos, que foi reduzida aproximadamente à metade, em relação ao nível de 3 μM , apesar da inexistência de diferenças estatísticas.

Em *Cocos nucifera* o número de embriões somáticos aumentou em até 100% com a adição de 1,5 μM de AVG, enquanto que uma melhor proliferação de embriões somáticos foi observada a 1 μM . Os efeitos benéficos sobre a

embriogênese somática decresceram quando a concentração aumentou para 3 μM . A adição de ACC em concentrações superiores a 50 μM não afetou o crescimento de calos, mas inibiu significativamente a multiplicação de embriões somáticos, por estimular a produção endógena de etileno. A adição de STS no meio, nas concentrações de 1,5 a 6,0 μM , promoveu o crescimento de calos embriogênicos, entretanto, concentrações maiores que 10 μM reduziram significativamente o número de embriões somáticos (Adkins et al., 1998).

No mesmo trabalho, foi também discutida a influência do STS na embriogênese somática de mamoeiro, sendo observado um aumento de até 300% da resposta embriogênica com a adição de 50 μM de STS em meio indutor com 10 mg L^{-1} de 2,4-D. Esse resultado é discordante com os dados obtidos no presente trabalho, em que a concentração de 30 μM já apresentou tendência de induzir incrementos nas freqüências de calogênese (Figura 1B) e queda nas freqüências de embriogênese somática (Figura 1A). Todavia, deve-se ressaltar que no presente trabalho empregou-se a concentração de 2 mg L^{-1} de 2,4-D. Tratamentos à base de auxinas tendem a aumentar a produção de etileno por estimular a produção da sintase do ACC. Essa enzima é responsável pela conversão do SAM a ACC, o precursor imediato da biossíntese de etileno (George, 1993).

Adkins et al. (1998) sugerem que embriões zigóticos de mamoeiro requerem maiores concentrações de STS (50 μM), comparado a embriões de coqueiro, devido a presença de uma camada externa de tecido, impermeável ao STS. A maturação e germinação dos embriões somáticos também foi estimulada pela adição de 1 e 2 μM de STS, aumentando em até 52% o número de embriões somáticos germinados. Entretanto, em nenhum momento, é mencionada a natureza estrutural ou química dessa camada protetora.

Um fato interessante foi observado na concentração de 10 μM de AVG, em que, apesar da baixa freqüência de calos embriogênicos (Figura 1A), foram verificados explantes induzidos com um grande número de embriões somáticos (Figura 2E). Isso pode ter ocorrido, possivelmente, em função da variabilidade genética. Mesmo utilizando-se sementes do mesmo cultivar, embriões zigóticos de mamoeiro estão sujeitos a modificações no genótipo, devido à segregação gênica, em decorrência da polinização cruzada.

A influência do genótipo na morfogênese *in vitro*, em função do uso de inibidores de etileno tem sido discutido por outros autores. Por exemplo, o crescimento de calos e embriogênese somática em resposta ao nitrato de prata foi variável entre diferentes genótipos de *Phoenix dactylifera* L. (Al-Khayri e Al-Bahrany, 2004). O mesmo foi apresentado por Fuentes et al. (2000) para diferentes cultivares de *Coffea canephora*.

Litz e Yurgalevitch (1997) compararam os efeitos do ACC e do AVG, em diferentes concentrações, sobre a indução da embriogênese somática em dois cultivares de manga 'Tutehau' e 'Tommy Atkins'. Ambos cultivares foram sensíveis ao ACC e tiveram a embriogênese somática parcial ou completamente inibida entre os níveis de 0,25 a 1 mM. Em 'Tommy Atkins' a indução foi completamente inibida em todas as concentrações de AVG testadas (0,25 a 1 μ M), enquanto que 'Tutehau' foi inibida somente a 1 μ M. A produção endógena de etileno, em resposta ao ACC, foi diferenciada entre os cultivares, sendo observado notável efeito do genótipo na resposta ao ACC. Segundo esses autores, a biossíntese de etileno em tecidos de embriões imaturos é diferencialmente sensível ao ACC e AVG, dependendo do genótipo e, possivelmente, do tipo de semente.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- A suplementação do meio com ACC, não inibiu a aquisição de competência embriogênica, sendo observada a formação de calos embriogênicos e não embriogênicos de intensidade alta. As concentrações de 10 e 30 μM , entretanto, reduziram significativamente o número de embriões somáticos por explante.
- A adição de AVG, na concentração de 3 μM , possibilitou taxas de indução comparáveis ao controle, entretanto reduziu o número de embriões somáticos. A concentração de 10 μM reduziu drasticamente a porcentagem de indução calogênica e embriogênica, enquanto a concentração de 30 μM inibiu completamente ambos os processos.
- Em relação ao STS, apesar da intensa proliferação de calos, foi observada redução significativa no número de embriões somáticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADKINS, S. W., SAMOSIR, Y. M., ERNAWATI, A. GODWIN, I. D. 1998. Control of ethylene and use of polyamines can optimise the conditions for somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.) and papaya (*Carica papaya* L.). **Acta Horticulturae**, v. 461, p.459-466
- AL-KHAYRI, J. M., AL-BAHRANY, A. M. 2004. Genotype-dependent *in vitro* response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to silver nitrate. **Scientia Horticulturae**, v. 99, p.153-162
- BARBOSA, W. M., OTONI, W. C., CARNELOSSI, M., SILVA, E., AZEVEDO, A. A., VIEIRA, G. 2001. Rhizogenesis *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) is affected by ethylene precursors and by inhibitors. **International Journal of Horticultural Science**, v. 7, p. 47-51
- BIDDINGTON, N. L. 1992. The influence of ethylene in plant tissue culture. **Plant Growth Regulators**, v.11, p. 173-187
- BIONDI, S., SCARAMAGLI, S., CAPITANI, F., MARINO, G., ALTAMURA, M. M., TORRIGIANI, P. 1998. Ethylene involvement in vegetative bud formation in tobacco thin layers. **Protoplasma**, v. 202, p. 134-144
- CARVALHO, M. H. C., LE, B. V., ZUILY-FODIL, Y., THI, A. T. P., VAN, K. T. T. 2000. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. **Plant Science**, v. 159, p. 223-232
- DIMASI-THERIOUS, K., ECONOMOU, A. S. 1995. Ethylene enhances shoot formation in cultures of the peach rootstock GF-677 (*Prunus persica* x *P. amygdalus*), **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 87-90
- EAPEN, S., GEORGE, L. 1997. Plant regeneration from peduncle segments of oil seed *Brassica* species: Influence of silver nitrate and silver thiosulfate. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 229-232

FUENTES, S. R. L., CALHEIROS, M B. P., MANETTI-FILHO, J., VIEIRA, G. E. 2000. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, p.5-13

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1: The Technology. 2. ed. Edington, Exegetics Limited, 1993. 574 p.

HATANAKA, T., SAWABE, E., AZUMA, T., UCHIDA, N., YASUDA, T. 1995. The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. **Plant Science**, v.107, p.199-204

KUMAR, P. P., LAKSHANAN, P., THORPE, T. A. 1998 Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 34, p. 94-103

LAI, C. C., YU, T. A., YEH, S. D., YANG, J. S. 1998. Enhancement of *in vitro* growth of papaya multishoots by aeration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.53, p. 221-225

LITZ, R. E., YURGALEVITCH, C. 1997. Effects of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, aminoethoxyvinylglycine, methylglyoxal bis- (guanylhydrazone) and dicyclohexylammonium sulfate on induction of embryogenic competence of mango nucellar explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, p.171-176

MA, J. H., YAO, J. L., COHEN, D., MORRIS, B. 1998. Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation from apple shoot cultures. **Plant Cell Reports**, v.17, p.211-214, 1998

MAGDALITA, P. M., GODWIN, I. D., DREW, R. A., ADKINS, S. W. 1997. Effect of ethylene and culture environment on development of papaya nodal cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 93-100

NISSEN, P. 1994. Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. **Physiologia Plantarum**, v.92, p.397-403

PAIVA NETO, V. B. 2002. **Morfogênese *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa, MG. 127 p.

PAULL, R. E. 1993. Pineapple and papaya. In: SEYMOUR, G.B., TAYLOR, J.E., TUCKER, G. A. (Eds). **Biochemistry of Fruit Ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. p.291-323

PURNHAUSER, L.; MEDGYESY, P.; DIX, P. J.; MÁRTON, L. 1987. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. **Plant Cell Reports**, v.6, p.1-4

REIS, L. B., PAIVA NETO, V. B., PICOLI, E. A T., COSTA, M. G. C., RÊGO, M. M., CARVALHO, C. R., FINGER, F. L., OTONI, W. C. 2003. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.39, p. 618-622

REID, M. S., PAUL, J. L., FARHOOMAND, M. B., KOFRANEK, A. M., STABY, G. L. 1980. Pulse treatments with the silver thiosulfate complex extend the vase life of cut carnations. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v.105, p. 25-27

ROUNSTAN, J. P., LATCHÉ, A., FALLOT, J. 1994. Role of ethylene on induction and expression of carrot somatic embryogenesis: relationship with polyamine metabolism. **Plant Science**, v.103, p.223-229

THORPE, T. A. 1994. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (eds). **Plant Cell and Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.17-36

CAPITULO 3

Efeitos de pulsos de 2,4-D sobre a morfogênese *in vitro* de mamoeiro (*Carica papaya* L.) a partir de embriões zigóticos imaturos

RESUMO

Com o objetivo de avaliar os efeitos de pulsos de 2,4-D na morfogênese *in vitro*, embriões imaturos de *Carica papaya* L. 'Improved Sunrise Solo Line 72/12' foram submetidos a pulsos de 0, 1, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas e à exposição contínua desse regulador, nas concentrações de 10 e 100 mg L⁻¹. Após o pulso os embriões foram recultivados em meio basal, destituído de 2,4-D, onde permaneceram até o trigésimo dia de cultivo. Diferentes respostas morfogênicas foram observadas, sendo avaliadas as frequências de rizogênese, calogênese e embriogênese somática. Nos menores períodos de exposição (1 a 48 horas), à concentração de 10 mg L⁻¹ de 2,4-D foi observada alta frequência de rizogênese, gradativamente inibida com o aumento do período de exposição ao 2,4-D e com o eventual calejamento do eixo hipocótilo radícula. O pulso de 72 horas promoveu a maior frequência de embriogênese somática. Na concentração de 100 mg L⁻¹ observou-se uma alta frequência de calogênese, logo nos menores tempos de exposição. A partir desses calos diferenciaram-se raízes e embriões somáticos. Quando os embriões foram expostos continuamente a essa concentração foi observada a diferenciação de embriões somáticos primários e secundários na região meristemática do domo apical e hipocótilo, todavia, com alto grau de oxidação.

1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma espécie pertencente à família Caricaceae, de relevante importância comercial, especialmente em países tropicais e subtropicais. Para atender a demanda comercial e as exigências do mercado, muitos programas de melhoramento vêm sendo conduzidos nesta espécie. Além do melhoramento convencional, o emprego de biotecnologia como a cultura de tecidos tem se tornado indispensável, principalmente no que se refere à obtenção de células e tecidos apropriados para transformação genética. Para esta e outras finalidades muitos protocolos de embriogênese somática vêm sendo desenvolvidos para vários cultivares comerciais.

Explantos juvenis oriundos de plântulas de mamoeiros, cultivadas *in vitro*, como segmentos de hipocótilos, folhas cotiledonares, pecíolos e embriões zigóticos têm sido apresentados como explantes potencialmente responsivos à indução de competência embriogênica (Fitch e Manshardt, 1990; Chen et al., 1991; Fitch, 1993; Fitch, 1995; Jordan e Velozo 1996; Yang et al., 1996; Castillo et al., 1998; Almeida et al., 2001).

Diversos fatores podem interferir na aquisição de competência embriogênica, dentre os quais são considerados como determinativos o genótipo, a idade e o tipo de explante utilizado (Guerra et al., 1999), que, por sua vez, podem estar relacionados ao conteúdo endógeno de hormônios (Jiménez, 2001). Em nível celular, tem sido observadas uma completa reorganização do estado fisiológico e metabólico e expressão gênica diferenciada (Fehér et al., 2002).

O processo de embriogênese somática é, freqüentemente, iniciado em meio contendo altos níveis de auxinas, sendo a mais utilizada o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Entretanto, na maioria dos casos, o desenvolvimento subsequente dos embriões somáticos requer a redução ou mesmo a retirada desses reguladores do meio de cultivo. Segundo George (1993), concentrações excessivas ou longos períodos de incubação com esses reguladores podem resultar na produção de calos não regenerativos, ao invés de tecidos embriogênicos.

A utilização de pulsos, que consiste na exposição do material a um regulador de crescimento em doses relativamente altas, durante um curto período são, em muitos casos, considerados como efetivos para desencadear o processo morfogênico desejado. George (1993) sugeriu que com o uso de pulsos de reguladores, durante períodos progressivos é possível monitorar o ganho de competência e o início da determinação nos tecidos.

Os efeitos da interação tempo x concentração (pulso) na morfogênese *in vitro* é discutida por vários autores. Em goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana*), choques de 2,4-D de duas semanas foram suficientes para proporcionar valores similares de indução e produção de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos maduros, àqueles obtidos com choques de 4 a 8 semanas (Guerra et al.,2001). Em *Carica pubescens*, o melhor período de indução e formação de embriões somáticos ocorreu após um pulso de seis dias em meio de cultura suplementado com 2,4-D e BAP (Jordan e Velozo, 1996). Bronsema et al. (2001) demonstraram que um pulso de sete dias em meio com 2,4-D, na concentração de 2 mg L⁻¹, induziu a formação de calos embriogênicos friáveis em embriões imaturos de milho.

Em *C. papaya*, os efeitos negativos de longos períodos de exposição dos explantes aos reguladores de crescimento na morfogênese *in vitro*, têm sido demonstrados por alguns autores. Schimildt (1994) observou que a exposição contínua de ramos de mamoeiro em meio com AIB inibia a rizogênese e proporcionava a formação de calos na base dos explantes O melhor resultado para enraizamento foi obtido mediante a exposição dos ramos ao AIB por um período de cinco dias. O desenvolvimento de plantas transgênicas de papaia de aparência anormal, foi atribuído por Yang et al. (1996) ao longo período de exposição ao meio indutor com 2,4-D.

O 2,4-D é a auxina usualmente utilizada na indução da embriogênese somática *in vitro* em mamoeiro (Litz, 1986; Fitch e Manshardt 1990; Chen et al., 1991; Fitch, 1993; Jordan e Velozo 1996; Yang et al., 1996; Castillo et al., 1998; Almeida et al., 2001). Outras fontes de auxina, como o ácido naftalenoacético (ANA), dicamba e picloram, também têm sido utilizadas nos processos de indução (Chen et al., 1987; Fitch, 1995; Renukdas et al., 2003).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial morfogênico *in vitro* de embriões imaturos de *Carica papaya*, após submetê-los a diferentes tratamentos de pulsos de 2,4-D nas concentrações de 10 e 100 mg L⁻¹ de 2,4-D.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Embriões zigóticos imaturos de *Carica papaya* L. foram extraídos assepticamente e inoculados em meio basal (descrito no item 2.2 capítulo 1) suplementado com 2,4-D, nas concentrações de 10 e 100 mg L⁻¹. Para cada concentração, foram utilizados nove períodos de exposição, sendo esses: 0, 1, 6, 12, 24, 36, 48, 72 horas e exposição contínua durante 30 dias (720 h), constituindo cada período um tratamento. Após o período de incubação com 2,4-D, os explantes foram transferidos para placas de Petri contendo meio basal, destituído de 2,4-D, permanecendo nessas condições durante 30 dias. As culturas foram mantidas em regime de escuro, sob temperatura de 26 ± 2 °C.

O experimento foi avaliado ao final de 30 dias após o recultivo, sendo avaliadas as freqüências de explantes responsivos para rizogênese (FR), calogênese (FC) e embriogênese somática (FE).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, num esquema fatorial (tempo x concentração de 2,4-D), com cinco repetições por tratamento. Cada placa, contendo 10 explantes, foi considerada uma repetição. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e para comparação das médias foi realizado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

A utilização de pulsos de 2,4-D, nas concentrações de 10 e 100 mg L⁻¹ estimulou respostas morfogênicas diferenciadas em embriões imaturos de *C. papaya* L. A figura 1 apresenta a distribuição das médias em relação às freqüências de rizogênese, calogênese e embriogênese somática, obtidas em resposta aos tratamentos de pulso.

Na ausência de pulsos de 2,4-D (tempo zero) foi verificada alta freqüência de germinação dos embriões (próxima a 100%), que emitiram raízes e exibiam um pequeno alongamento do hipocótilo.

A exposição dos embriões à concentração de 10 mg L⁻¹ de 2,4-D, em períodos de 1 a 48 horas resultou em altas taxas de rizogênese, não sendo encontradas diferenças significativas entre esses tratamentos (Figura 1A). Contudo, foram observadas diferenças morfológicas no padrão de rizogênese na medida em que se aumentou o período de exposição ao meio indutor. No pulso de 1 hora foi observada rizogênese direta na maioria dos explantes, sem intervenção de calo (Figura 2A). Nos maiores pulsos verificou-se uma forte tendência de calejamento do eixo embrionário, com formação de raízes adventícias (Figura 2B). Essa tendência culminou no total calejamento do embrião, quando estes foram mantidos durante trinta dias em meio com 2,4-D. No pulso de 72 horas a rizogênese foi significativamente reduzida, e completamente inibida após exposição contínua ao 2,4-D (Figuras 1A, 2C e 2D).

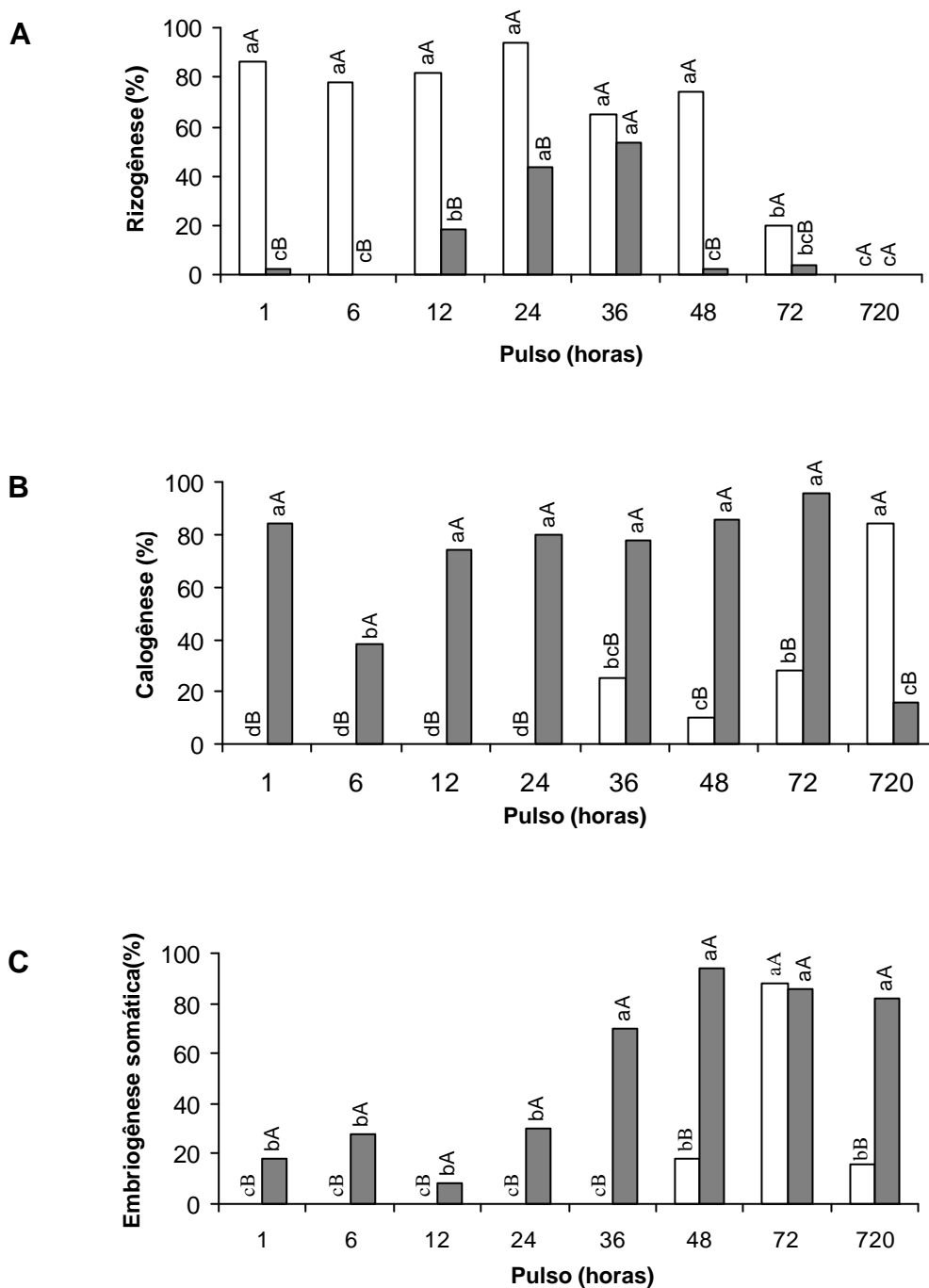


Figura 1- Efeito do tempo de exposição, em horas, ao 2,4-D sobre as freqüências de rizogênese (A), calogênese (B) e embriogênese somática (C) em embriões zigóticos imaturos de *Carica papaya* L. 'Improved Sunrise Solo Line 72/12', avaliados após 30 dias de cultivo. Os tratamentos seguidos pelas mesmas letras maiúsculas, dentro de cada pulso, e minúsculas dentro de cada concentração de 2,4-D e diferentes pulsos não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

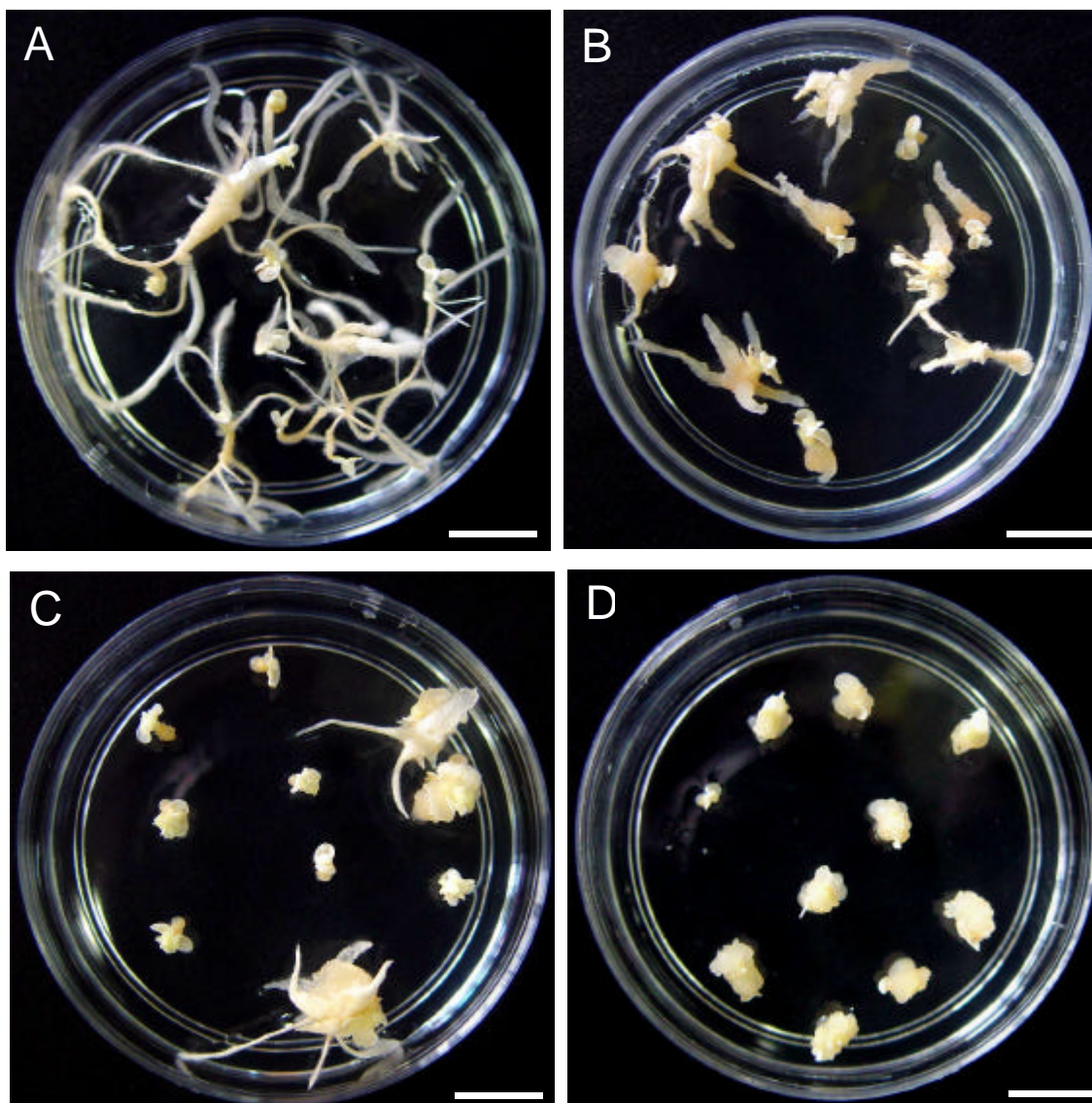


Figura 2- Influência de pulsos de 2,4-D a 10 mg L^{-1} sobre a morfogênese *in vitro* em *Carica papaya* L. **A-** rizogênese após pulso de 1 hora; **B-** rizogênese indireta após 48 horas de indução; **C-** embriogênese somática a partir do domo apical após pulso de 72 horas; **D-** calogênese após exposição contínua de 30 dias. Barra = 10 mm.

Na concentração de 100 mg L⁻¹ foram observadas baixas freqüências de rizogênese e uma marcante tendência de calejamento nos menores períodos de exposição (Figuras 1B e 3A). O pulso de apenas 1 hora foi suficiente para induzir calogênese, com subsequente expressão de rizogênese e embriogênese somática, em menor freqüência. A maior porcentagem de rizogênese foi observada nos pulsos de 12 a 36 horas, com diferenças significativas entre os tratamentos (Figuras 1A e 3B).

Em relação a freqüência de embriogênese somática verificou-se que o pulso de 48 horas na concentração de 10 mg L⁻¹ foi suficiente para induzir embriogênese somática em pelo menos 18% dos explantes cultivados. Contudo, a maior porcentagem foi observada no pulso de 72 horas, com a redução significativa dos explantes apresentando rizogênese (Figura 2C). Os embriões somáticos formaram-se diretamente a partir do meristema apical e ao final do experimento encontravam-se em estádios avançados de desenvolvimento (Figura 4A). A exposição contínua dos explantes ao 2,4-D durante 30 dias, todavia, resultou na formação de calos semcompactos, de coloração clara, porém com pouca expressão embriogênica. Quando presentes, os embriões somáticos encontravam-se na superfície dos calos em estágio globular (Figura 2D). Na concentração de 100 mg L⁻¹ a embriogênese somática foi freqüente em todos os tratamentos. A partir do pulso de 48 horas a rizogênese foi drasticamente inibida, sendo observada uma porcentagem de até 98% de explantes responsivos para embriogênese somática, sem diferenças estatísticas entre os tratamentos.

A exposição contínua dos explantes à concentração de 100 mg L⁻¹ de 2,4-D resultou em alta freqüência de resposta embriogênica, todavia, houve uma drástica inibição em relação ao crescimento de calos e uma alta taxa de oxidação, levando ao escurecimento e necrose de muitos explantes. Os embriões presentes surgiam diretamente da superfície do domo apical e do hipocótilo. Freqüentemente, observou-se a diferenciação de embriões secundários, a partir de embriões somáticos primários (Figura 4D).

A principal diferença observada entre as concentrações de 2,4-D testadas, foi a alta frequência de calogênese já nos primeiros períodos de exposição à concentração de 100 mg L⁻¹, formando calos com células determinadas tanto para rizogênese quanto para embriogênese somática. Frequentemente, foi observadas em um mesmo explante, a formação de calo com raízes e embriões somáticos (Figuras 3A, 3B e 3C).

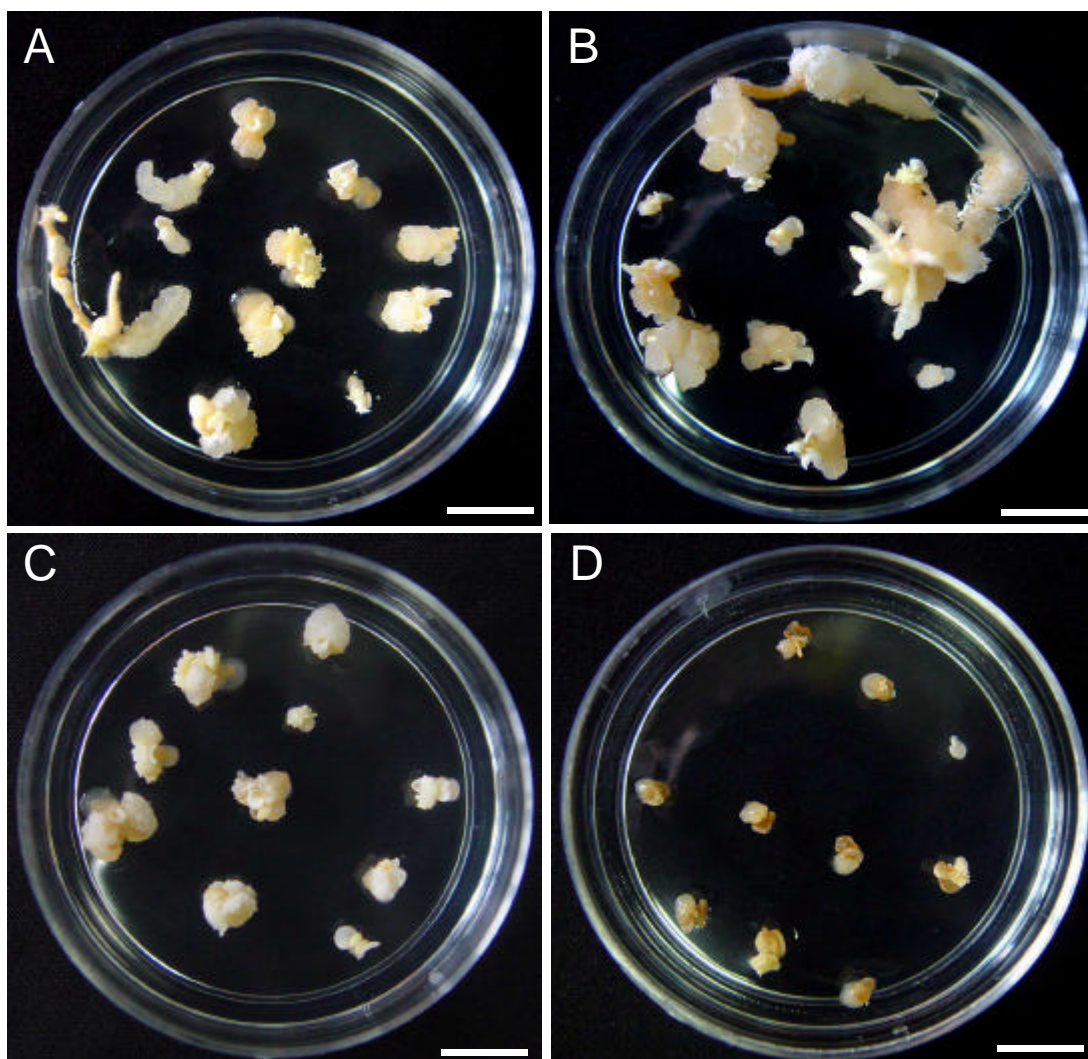


Figura 3- Efeitos de pulsos de 2,4-D a 100 mg L^{-1} sobre a morfogênese *in vitro* de *Carica papaya* L. **A-** rizogênese, calogênese e embriogênese somática após pulso de 6 horas; **B-** expressão calogênica e rizogênica após pulso de 36 horas; **C-** formação de calos embriogênicos após pulso 48 horas; **D-** embriogênese somática e oxidação dos explantes após exposição contínua ao meio indutor. Barras = 10 mm.

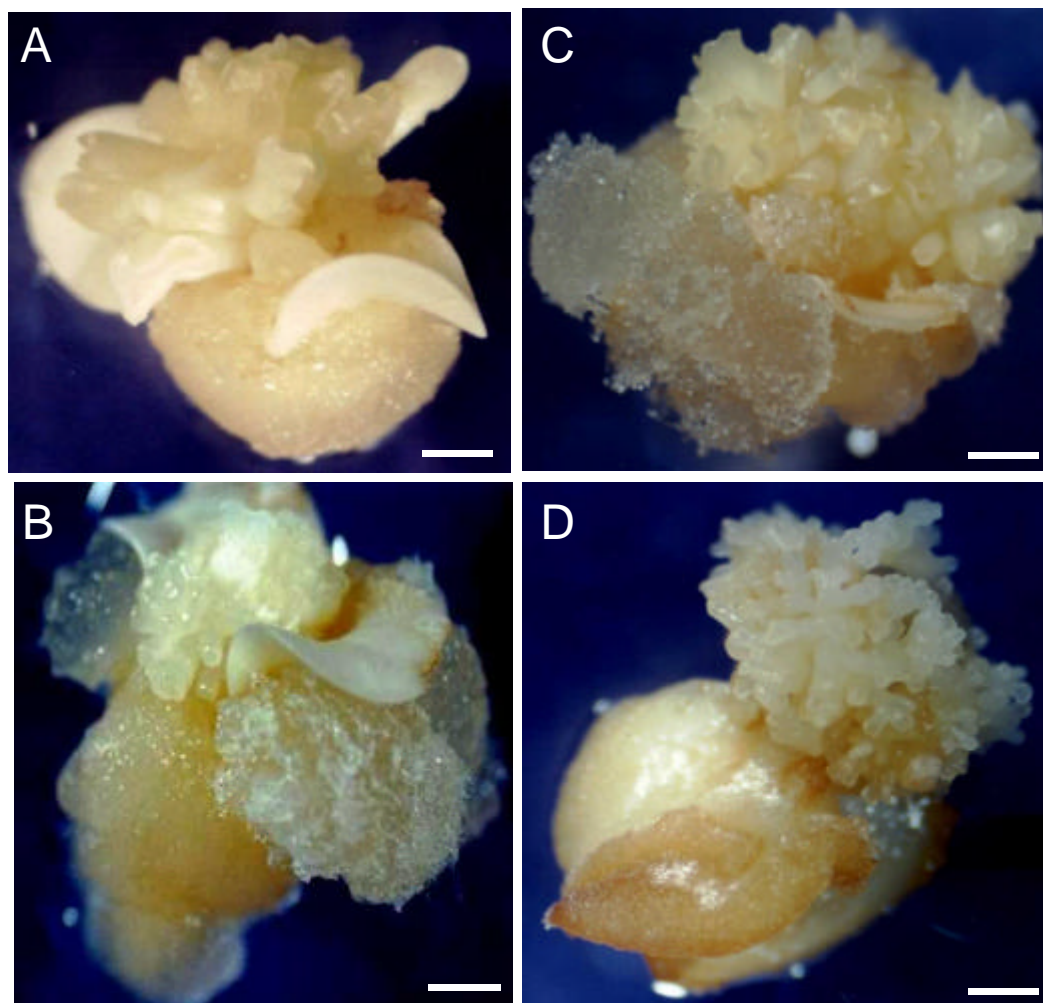


Figura 4- Influência de pulsos de 2,4-D sobre a embriogênese somática em *Carica papaya* L. **A-** 72h em 10 mg L^{-1} ; **B-** 36h em 100 mg L^{-1} ; **C-** 48h em 100 mg L^{-1} ; **D-** massa embriogênica na região do domo apical, após exposição contínua do explante por 30 dias à concentração de 100 mg L^{-1} . Barras = 10 mm.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi verificado que a permanência dos explantes em meio indutor com 10 mg L⁻¹, por 1 a 48 horas resultou em altas taxas de rizogênese, após o recultivo em meio MS0. Com o aumento da concentração para 100 mg L⁻¹ ou, do período de exposição, a rizogênese foi significativamente reduzida ou inibida, havendo um efeito mais pronunciado da calogênese.

A expressão rizogênica, em resposta a tratamentos de pulsos de auxinas foi também verificada em plântulas intactas de *Eucalyptus grandis* (Picoli e colaboradores, dados não publicados). Esses autores observaram que explantes mantidos durante 4 horas em meio com 2,4-D ou ANA a 100 mg L⁻¹, indiferentemente, apresentaram altas porcentagem de rizogênese. Em maiores concentrações e/ou período de exposição foi observado decréscimo na porcentagem de rizogênese. Embriões imaturos de milho também apresentaram maior tendência de calejamento com o aumento do período de exposição ao 2,4-D, sendo observada formação de calos potencialmente embriogênicos, após 7 dias de indução em meio suplementado com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D. Contudo, quando os embriões foram cultivados em concentrações mais elevadas (20 a 200 mg L⁻¹ de 2,4-D) por 2 a 4 semanas, foram observadas menores freqüências de calos embriogênicos e na presença de 2000 mg L⁻¹ mostraram-se não responsivos, permanecendo nessa condição por vários meses, tornando-se inclusive hiperídricos (Bronsema et al., 2001).

O processo de calogênese, a partir do eixo hipocótilo-radícula, parece ser uma resposta natural à presença desse regulador, sendo também observada

quando os embriões foram mantidos constantemente em meio indutor com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, conforme observado no capítulo 1.

Com relação a frequência de embriogênese somática, melhores resultados foram observados quando os explantes foram submetidos aos pulsos de 72 horas em meio indutor com 10 mg L⁻¹ e nos pulsos de 48 e 72 horas a 100 mg L⁻¹ de 2,4-D. Após o recultivo e ao final dos 30 dias de cultivo, foram observados embriões somáticos em todos os estádios de desenvolvimento. Entretanto, quanto a qualidade dos embriões somáticos, deve-se ressaltar a ocorrência de elevada frequência de embriões morfológicamente anormais, em todos os tratamentos.

Para embriões zigóticos de *Feijoa sellowiana*, duas semanas em meio indutor com 5 mg L⁻¹ foram suficientes para induzir altas taxas de embriogênese somática. A permanência em meio indutor durante 16 semanas, todavia, afetou drasticamente a porcentagem de indução e o desenvolvimento dos embriões somáticos, sugerindo que o longo período de exposição de culturas primárias a esse regulador pode originar anormalidades no desenvolvimento dos embriões somáticos (Guerra et al., 2001). A exposição de explantes foliares ao 2,4-D por um período de 6 horas em *Curcubita pepo* L. (100 mg L⁻¹) e de 48 horas em *Cucumis melo* L (50 mg L⁻¹) foi suficiente para indução de calos altamente embriogênicos (Kintzios et al., 2002).

Ao final de 30 dias, em meio de indutor com 100 mg L⁻¹ de 2,4-D, foi verificada redução significativa de embriões responsivos para calogênese. Contudo foi observado um grande número de embriões somáticos originados por processo direto a partir do domo apical e no eixo embrionário e formação de embriões secundários, contudo com altos níveis de oxidação dos explantes.

A manutenção dos embriões durante 30 dias em meio indutor com 10 mg L⁻¹ de 2,4-D resultou na proliferação de calos, com pouca expressão embriogênica. Possivelmente, o subcultivo desses calos em meio com menor concentração ou destituído de 2,4-D poderia aumentar a expressão embriogênica.

As diferentes respostas observadas com relação à concentração ou período de exposição podem estar associadas às taxas de absorção e/ou metabolização do 2,4-D, bem como à interação desse regulador com níveis endógenos de reguladores, de modo especial auxinas e citocininas.

Bronsema et al. (1996) observaram que embriões zigóticos de milho absorvem rapidamente o 2,4-D, durante os três primeiros dias, acumulando-o nos

tecidos. Esse acúmulo sugere que embriões imaturos necessitam de certas quantidades de 2,4-D acumuladas para formar calos embriogênicos e conseguinte desenvolvimento de embriões somáticos.

Com relação à atuação dessas auxinas nos tecidos, Michalczuk et al. (1992) demonstraram que a aplicação de auxinas semelhantes ao 2,4-D promove mudanças significativas nos níveis endógenos de AIA em células de cenoura, durante a aquisição de competência embriogênica. Esses autores observaram que várias fontes de explantes de cenoura, como pecíolos, hipocótilos e células, requerem o mínimo de exposição ao 2,4-D para aquisição e determinação embriogênica. Quando os embriões somáticos globulares foram mantidos em meio suplementado com auxina, eles se dediferenciaram e retornaram à condição de calo, sugerindo que o 2,4-D é requerido nos estádios iniciais da embriogênese somática, mas a sua permanência no meio inibe o desenvolvimento do embrião. Segundo esses autores, uma baixa atividade de auxina endógena após o estágio globular permite o estabelecimento de um gradiente auxínico, aparentemente necessário para iniciar e manter um crescimento polarizado. Inibidores do transporte polar de auxina, por exemplo, o TIBA, também podem interferir na habilidade de embriões globulares iniciarem um crescimento polarizado.

Os efeitos da auxina exógena, particularmente o 2,4-D, no metabolismo endógeno de AIA em células embriogênicas de cenoura foi também examinado por (Ribnicky et al., 1996). Contrariando os resultados obtidos por Michalczuk et al. (1992) eles concluíram que o 2,4-D atua diretamente nos tecidos cultivados, não induzindo mudanças nos níveis endógenos de AIA.

Os resultados obtidos nesse trabalho enfatizam a idéia de que é possível monitorar o ganho de competência morfogênica em tecidos de mamoeiro por meio da utilização de pulsos de reguladores de crescimento, evitando assim os efeitos negativos provocados por longos períodos de exposição, como o surgimento de anomalias em embriões somáticos e variações somaclonais. Para isso sugere-se a realização de novos experimentos, testando-se outras concentrações de 2,4-D e períodos diferentes de exposição.

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos pode-se concluir que:

- As respostas morfogênicas obtidas através do cultivo de embriões zigóticos imaturos foram diretamente influenciadas pela combinação concentração x tempo de exposição ao 2,4-D.
- Maiores porcentagens de rizogênese foram observadas nos pulsos de 1 a 48 horas na concentração de 10 mg L^{-1} de 2,4-D.
- A frequência de calejamento foi superior nos maiores períodos de exposição sob a concentração de 10 mg L^{-1} de 2,4-D e com o aumento da concentração para 100 mg L^{-1} .
- Melhores respostas embriogênicas na concentração de 10 mg L^{-1} de 2,4-D foram observadas no pulso de 72 horas, e na concentração de 100 mg L^{-1} no pulso de 48 horas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E. P., OLIVEIRA, R. P., DANTAS, J. L. L. 2001. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.51-54
- BRONSEMA, F. B. F., VAN OOSTVEEN, W. J. F., VAN ONCKELEN, H. A., VAN LAMMEREN, A. A. M. 1996. Uptake and biochemical analysis of 2,4-D in cultured zygotic embryos of *Zea mays* L. J. **Plant Physiology**, v.149, p.163-171
- BRONSEMA, F. B. F., VAN OOSTVEEN, W. J. F., VAN LAMMEREN, A. A. M. 2001. Influence of 2,4-D, TIBA and 3,5-D on the growth response of cultured maize embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.65, p.45-56
- CASTILLO, B., SMITH, M. A., YADAVA, U. L. 1998. Liquid system scale up of *Carica papaya* L. somatic embryogenesis. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 73, n. 3, p.307-311
- CHEN, M. H., WANG, P. J., MAEDA, E. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explant. **Plant Cell Reports**, v.6, p.348-351
- CHEN, M. H., CHEN, C. C., WANG, D. N., CHEN, F. C. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* x *Carica cauliflora* cultured *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, v.69, n.9, p.1913-1918
- FEHÉR, A., PASTERNAK, T., ÖTVÖS, K., MISKOLCZI, P., DUDITS, D. 2002. Induction of embryogenic competence in plant cells: a review. **Biologia, Bratislava**, v.57, n.1, p.5-12
- FITCH, M. M. M. 1993. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.32, p.205-212
- FITCH, M. M. M. 1995. Somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya* L.). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. New York, Springer-Verlag, v.30, p.261-279

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

GEORGE, E. F. 1993. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1: The Technology. 2. ed. Edington, Exegetics Limited, 574 p.

GUERRA, M. P., DAL VESCO, L. L., DUCROQUET, J. P. H. J., NODARI, R. O., REIS, M. S. 2001. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.117-128

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

JIMÉNEZ, V. M. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.196-223

JORDAN, M.; VELOZO, J. 1996. Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, p.189-194

KINTZIOS, S., SERRETI, E., BLUCHOS, P., DROSSOPOULOS, J. B., KITSAKI, C. K., TSAKALIDIS, A. L. 2002. Growth regulator pretreatment improves somatic embryogenesis from leaves of squash (*Cucurbita pepo* L.) and melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Cell Reports**, v.21, p.1-8

LITZ, R. E. 1986. Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspensions cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.111, p.969-972

MICHALCZUK, L., COOKE, T. J., COHEN, J. D. 1992. Auxin levels at differing stages of carrot embryogenesis. **Phytochemistry**, v.31, n.4, p.1097-1103

PICOLI, E. A. T., ALFENAS, A. C., GERALDINE, R. M., GONCALVES, L. A., OTONI, W. C., DIAS, L. L. C., NEVES, D. A, ODA, S. 2004. Growth regulators pulsing pre-treatment on the *Eucalyptus grandis* shoot and adventitious root morphogenesis (Submetido)

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

RIBNICKY, D. M., ILIC, N., COHEN, J. D., COOKE, T. J. 1996. The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism: the

implications for carrot somatic embryogenesis. **Plant Physiology**, v.112, p.549-558

SCHMILDT, E. R. 1994. **Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, MG. 84p.

YANG, J. S., YU, T. A., CHENG Y. H., YEH, S. D. 1996. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of petioles of *in vitro* propagated multishoots. **Plant Cell Reports**, v.15, p.459-464