

ISABELLA SANTIAGO DE ABREU

**MONITORAMENTO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE
Carica papaya L. POR TÉCNICAS CITOGENÉTICAS E DE
CITOMETRIA DE FLUXO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

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

T

A162m
2010

Abreu, Isabella Santiago de, 1985-
Monitoramento da embriogênese somática de
Carica papaya L. por técnicas citogenéticas e de citometria
de fluxo / Isabella Santiago de Abreu. – Viçosa, MG, 2010.
xii, 43f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 29-43.

1. Plantas - Propagação. 2. Embriogênese somática.
3. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura. 4. Mamão -
Propagação in vitro. 5. *Carica papaya*. 6. Citometria de
fluxo. 7. Citogenética. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 631.53

ISABELLA SANTIAGO DE ABREU

**MONITORAMENTO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE
Carica papaya L. POR TÉCNICAS CITOGENÉTICAS E DE
CITOMETRIA DE FLUXO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2010.

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Co-orientador)

Prof. Wellington Ronildo Clarindo
(Co-orientador)

Prof. Edgard Augusto de Toledo Picoli

Pesq. Eveline Teixeira Caixeta

Prof. Carlos Roberto de Carvalho
(Orientador)

Aos meus pais, Messias e Cleonice, ao meu irmão Guilherme, e ao Daniel,
sempre presentes.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do Curso e pelo crescimento acadêmico e profissional nessa instituição de ensino superior de alta qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro fundamental para o incentivo e o desenvolvimento desse trabalho.

À Empresa Caliman Agrícola S.A. do Espírito Santo, pelo suporte financeiro de parte da pesquisa e fornecimento de material biológico.

Àqueles que são o alicerce dessa conquista: meus pais, que sempre atribuíram à educação o meio para nos tornarmos bons cidadãos e alcançarmos sucesso dignamente. Obrigada pelo amor incondicional e dedicação constantes!

Ao meu irmão, pelo carinho e amizade.

Ao Daniel, meu companheiro de todas as horas e melhor amigo, pelo seu amor, paciência e incentivo em mais esta etapa da minha vida.

Ao Professor Carlos Roberto de Carvalho, pelos ensinamentos, pela orientação indispensável no Curso, pela amizade e, principalmente, pelo exemplo de profissional ético, dedicado e apaixonado pelo que faz.

Ao co-orientador Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike, pela amizade e atenção dispensadas a este trabalho.

Ao co-orientador Prof. Wellington Ronildo Clarindo, pela valiosa contribuição prática e teórica no desenvolvimento dessa pesquisa, pelas críticas e sugestões, e pela amizade desde os tempos de meros estudantes.

Ao Prof. Edgard Augusto de Toledo Picoli e à Pesq. Eveline Teixeira Caixeta, pela atenção, críticas e sugestões dadas a este trabalho.

Aos professores da UFV, pelos inúmeros ensinamentos que contribuíram para minha formação.

Aos meus colegas do Laboratório de Citogenética e Citometria, Christiane, Fernanda, Guilherme e Milene, pelo auxílio técnico, convivência agradável e momentos de descontração, dentro e fora do ambiente de

trabalho. Em especial à Thaís, pela amizade conquistada no decorrer desse período.

Ao funcionário do Laboratório José Francisco, pela amizade e auxílio; representante de tantos outros funcionários da UFV que, com profissionalismo e atenção, facilitaram a realização desse e de outros trabalhos.

Aos colegas do curso de Ciências Biológicas e do curso de Genética e Melhoramento, pelo convívio em todos os meus anos de vida acadêmica.

A Deus, amor maior, por ter me proporcionado tudo isso.

A todos os demais amigos e familiares que, de alguma forma, contribuíram para esta minha conquista.

BIOGRAFIA

ISABELLA SANTIAGO DE ABREU, filha de Messias Moreira de Abreu Neto e Cleonice Carlos Santiago de Abreu, nasceu em Timóteo, Minas Gerais, no dia 12 de maio de 1985.

Em 2004, iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, graduando-se em Bacharel em dezembro de 2007.

Durante o período de graduação, foi bolsista do PIBIC/CNPq do Departamento de Biologia Geral, onde desenvolveu atividades de pesquisa em Citogenética e Citometria Vegetal.

Em março de 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Genética e Melhoramento da UFV, bolsista da CAPES, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2010. Durante este período de pós-graduação, foi contemplada com o Prêmio Pós-Graduação de melhor trabalho na área de Genética, Evolução e Melhoramento de Plantas, apresentado no 54º Congresso Brasileira de Genética, SBG.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Aspectos Gerais de <i>Carica papaya</i>	1
1.2 – Problemas Referentes à Cultura do Mamoeiro	2
1.3 – Cultura de Tecidos em <i>C. papaya</i>	4
1.3.1 – Embriogênese Somática	5
1.3.2 – Regeneração <i>in vitro</i> e Aclimatização	7
1.3.3 – Variação Somaclonal vs. Citometria de Fluxo e Citogenética	8
2 – OBJETIVOS	12
2.1 – Objetivo Geral	12
2.2 – Objetivos Específicos	12
3 – MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 – Material Vegetal	13
3.2 – Desinfestação do Material Vegetal	13
3.3 – Indução de Calos Embriogênicos Friáveis	13
3.4 – Estabelecimento da Suspensão de Agregado Celular	15
3.5 – Indução de Embriões Somáticos	15
3.6 – Germinação de Embriões Somáticos	15
3.7 – Aclimatização	16
3.8 – Determinação do Nível de Ploidia de DNA pela Citometria de Fluxo	16
3.9 – Preparação e Prospeção Citogenética	17

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 – Embriogênese Somática e Regeneração <i>in vitro</i>	18
4.2 – Análises Citométrica e Citogenética	25
5 – CONCLUSÕES	29
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

LISTA DE ABREVIATÖES

2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ABA – ácido abscísico

AIA – ácido indol-3-acético

AIB – ácido indolbutírico

APM – amiprofos-metil

BAP – 6-benzilaminopurina

CF – citometria de fluxo

CV – coeficiente de variação

DAPI – 4'6'-diamino-2-fenilindol

ES – embriogênese somática

GA₃ – ácido giberélico

M1 – meio de indução de calos embriogênicos friáveis

M2 – meio líquido de estabelecimento de suspensão de agregados celulares

M3 – meio líquido de indução de embriões somáticos

M4 – meio de germinação de embriões somáticos

M5 – meio MS basal

MS – Murashige & Skoog (1962)

VS – variação somaclonal

RESUMO

ABREU, Isabella Santiago, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Monitoramento da embriogênese somática de *Carica papaya* L. por técnicas citogenéticas e de citometria de fluxo**, Orientador: Carlos Roberto de Carvalho, Co-orientadores: Sérgio Yoshimitsu Motoike e Wellington Ronildo Clarindo.

A embriogênese somática é uma técnica alternativa de micropropagação clonal em *Carica papaya*, tendo em vista os problemas gerados pela propagação convencional, via semínifera, e a ausência de um método eficaz para determinação sexual precoce dessa espécie trióica. Considerando o interesse pela produção em larga escala de plântulas do mamoeiro, o sistema líquido e o uso de embriões zigóticos imaturos como fonte de explante têm se mostrado mais eficientes para a geração de embriões somáticos de forma rápida e em quantidade relativamente elevada. Entretanto, técnicas de cultura de tecidos estão, frequentemente, associadas com a ocorrência de variação somaclonal. Portanto, a detecção e a eliminação de somaclones tornam-se necessárias, e diferentes metodologias têm sido empregadas para tal fim. Nesta perspectiva, este estudo adaptou um protocolo para produção em massa de embriões somáticos em meio líquido e adotou estratégias citométricas e citogenéticas para o monitoramento de variação somaclonal, em mamoeiro. Inicialmente, embriões zigóticos imaturos, que apresentam alto potencial embriogênico, foram cultivados em meio semi-sólido, na presença de 2,4-D, para indução de calos embriogênicos friáveis. A transferência desses calos para um sistema líquido, sob a ação dos reguladores 2,4-D e BAP, possibilitou a ampliação da proliferação de agregados celulares. Esta combinação de auxina e citocinina foi ideal por possibilitar somente a proliferação celular e não a diferenciação das suspensões em embriões somáticos. A conversão e a maturação destes ocorreram após a inoculação dos agregados em meio líquido suplementado com ABA. Nesta condição, foram obtidas suspensões de embriões somáticos, nos estágios cordiforme, torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar. Embriogênese somática direta, sem a formação de calos, também foi observada a partir dos embriões somáticos primários. Embriões

no estágio cotiledonar foram extraídos e germinados em meio semi-sólido contendo GA₃. Cerca de 80% de plântulas foram regeneradas e submetidas à aclimatização *in vitro*. A potencialidade da técnica de citometria de fluxo pôde ser demonstrada pela verificação do nível de ploidia dos regenerantes e, conseqüentemente, pela avaliação da ocorrência de variação somaclonal. Neste escaneamento, foram detectadas plântulas diplóides (88%), tetraplóides (6%) e aneuplóides (6%). Pela metodologia citogenética, plântulas conhecidamente diplóides tiveram seus kariogramas montados, nos quais não foi observada nenhuma alteração numérica ou estrutural. A associação de metodologias citométricas de fluxo e citogenéticas se mostrou eficaz para a caracterização de variantes somaclonais e para a seleção das plântulas diplóides de interesse para a propagação clonal. Principalmente, a citometria de fluxo pode ser considerada uma técnica viável para fins comerciais.

ABSTRACT

ABREU, Isabella Santiago, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Monitoring of somatic embryogenesis of *Carica papaya* L. by cytogenetic techniques and flow cytometry**, Adviser: Carlos Roberto de Carvalho, Co-advisers: Sérgio Yoshimitsu Motoike and Wellington Ronildo Clarindo.

Somatic embryogenesis is an alternative technique of clonal micropropagation in *Carica papaya*, taking into account the problems generated by the conventional seed propagation and the absence of an effective method for early sex determination of this trioecious species. Considering the interest in large-scale seedlings production of papaya, liquid system and the use of immature zygotic embryos as explant source have proved to be more efficient for the somatic embryos generation in quickly way and in relatively high amount. However, tissue culture techniques are frequently associated with somaclonal variation occurrence. Therefore, detection and selection of somaclones become necessary, and different methodologies have been employed for this purpose. In this perspective, this study adapted a protocol for mass production of somatic embryos in liquid medium and adopted cytometry and cytogenetics strategies for monitoring somaclonal variation in papaya. Firstly, immature zygotic embryos, which show a high embryogenic potential, were cultured in semi-solid medium, in the presence of 2,4-D, for friable embryogenic callus induction. The transferring of these callus to a liquid system, under the 2,4-D and BAP regulators action, allowed the increase of the cell aggregates proliferation. This auxin and cytokinin ratio was ideal for allowing only cell proliferation rather than differentiation of the suspensions in somatic embryos. These were converted and matured after inoculation of aggregates in liquid medium supplemented with ABA. In this condition, somatic embryos suspensions were obtained, in the early heart, torpedo, pre-cotyledonary and cotyledonary stages. Direct somatic embryogenesis, without callus formation, was also observed from the primary somatic embryos. Cotyledonary embryos were extracted and germinated on semi-solid medium containing GA₃. About 80% of plantlets were regenerated and subjected to *in vitro* acclimatization. The

potential of the flow cytometry technique could be demonstrated by verifying the ploidy level of regenerants and, thus, the evaluation of somaclonal variation occurrence. In this screening, diploid (88%), tetraploid (6%) and aneuploid (6%) seedlings were detected. For cytogenetic methodology, known diploid seedlings had their karyograms assembled, in which it did not observe any numerical or structural change. The association of flow cytometry and cytogenetics methodologies has proven effective for somaclonal variants characterization and the interest diploid seedlings selection for clonal propagation. Mainly, flow cytometry can be considered a viable technique for commercial purposes.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Aspectos Gerais de *Carica papaya*

A família Caricaceae contém um total de 6 gêneros e 35 espécies de árvores e arbustos produtores de látex, das quais 32 são dióicas, 2 trióicas e 1 monóica (DREW 2003, MING *et al.* 2007, YU *et al.* 2008, FARIA *et al.* 2009). Dentre essas espécies, o mamoeiro, *Carica papaya* L., $2n = 18$ cromossomos (KUMAR & ABRAHAM 1942), é a mais importante economicamente (BADILLO 1993). Trata-se de uma planta herbácea e frutífera, originária da América Central, mas com ocorrência principalmente em regiões tropicais e subtropicais da América e África (MARIN & GOMES 1986, BHATTACHARYA & KHUSPE 2001, FERNANDO *et al.* 2001, MING *et al.* 2007).

O mamoeiro é uma das frutíferas mais produzidas e consumidas no mundo, sendo seu cultivo de grande importância na Austrália, Malásia, Nigéria, Havaí, México (FRUTISÉRIES 2000) e no Brasil, com destaque (LIMA *et al.* 2005, FAO 2008). De acordo com os dados da Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca (SEAG 2007), o Brasil é o maior produtor e o terceiro maior exportador de mamão, e responde por, cerca de, 25% da produção mundial, com 1,6 milhões de toneladas por ano. O mamão é a sétima fruta *in natura* mais exportada no país, sendo cultivado em aproximadamente 30 mil hectares, concentrados nos estados do Espírito Santo e Bahia. Juntos, esses Estados são responsáveis por 70% da produção nacional.

O interesse na cultura de *C. papaya* reside em dois principais produtos, o fruto e o látex (DREW 2003). O mamão papaia é suculento e apresenta sabor agradável, características que atraem a preferência de muitos consumidores. Além de ser ingerido *in natura*, o fruto também é utilizado em saladas, sucos, doces e em uma variedade de bebidas. Independente da forma, o consumo do mamão é recomendado por ser um alimento rico nutricionalmente. Constitui-se numa das principais fontes de vitaminas A, C e do complexo B (folato, tiamina, niacina, riboflavina), fósforo,

potássio, ferro, cálcio e fibra (MING *et al.* 2007, SEAG 2009). Além do aspecto alimentar, o látex do mamoeiro contém a enzima proteolítica papaína, utilizada nas indústrias alimentícias, têxteis, farmacêuticas, de laticínios e de perfumes (PARASNIS *et al.* 1999, BAJPAI & SINGH 2006); e a carpaína, um alcalóide empregado como ativador do músculo cardíaco (PEREIRA 1992, PARASNIS *et al.* 1999); ambos de grande importância comercial.

1.2 – Problemas Referentes à Cultura do Mamoeiro

O plantio em escala comercial do mamoeiro é conduzido, convencionalmente, por meio de sementes provenientes de polinização livre. Por ser uma espécie alógama, os plantios comerciais apresentam elevada taxa de heterozigose (DREW 1987, 2003, BHATTACHARYA & KHUSPE 2001). Em decorrência disto, há uma mistura de genótipos com considerável variação em relação ao rendimento, qualidade dos frutos e susceptibilidade a várias doenças, incluindo o vírus da mancha anelar do mamoeiro – *Papaya Ringspot Virus* (PRSV), seu patógeno mais importante (RAJEEVAN & PANDEY 1986, CHEN *et al.* 1987, FITCH 1993, YANG *et al.* 1996, FERNANDO *et al.* 2001). A estaquia e a enxertia, que são empregados em muitas culturas, não são métodos eficientes para a propagação em larga escala do mamoeiro (SAKER *et al.* 1999), em razão do baixo rendimento e da dificuldade de enraizamento das estacas (VIANNA 1996).

A determinação do sexo é outro aspecto inerente à espécie *C. papaya*, a única do gênero que é polígama e que apresenta três tipos sexuais: plantas masculinas, femininas e hermafroditas (STOREY 1941, 1953, BAJPAI & SINGH 2006, RIMBERIA *et al.* 2006, GANGOPADHYAY *et al.* 2007). Este é um sistema que tem atraído a atenção de geneticistas e melhoristas por causa da sua biologia reprodutiva e dos problemas econômicos causados tanto pela segregação dos tipos sexuais (LIU *et al.* 2004, MING *et al.* 2007) quanto pela reversão sexual sazonal. Este último fenômeno é observado em plantas masculinas e hermafroditas do mamoeiro, cujas flores variam em expressão sexual sob diferentes

condições ambientais (STOREY 1941, 1953, YU *et al.* 2008). Conforme relatado por STOREY (1941), o processo de reversão sexual pode ser interpretado como uma resposta fisiológica das plantas masculinas e hermafroditas a alterações ambientais, principalmente em decorrência de mudanças de estações do ano. Esse fenômeno é particularmente importante em regiões tropicais, uma vez que o hermafrodita é o sexo de interesse dos produtores.

Além da morfologia estrutural geral da planta, as três formas sexuais são distintas também quanto às taxas de segregação. As plantas hermafroditas são, principalmente, auto-polinizadas, sendo suas sementes segregadas em hermafroditas e fêmeas na razão 2:1. O cruzamento entre plantas fêmea e hermafrodita resulta numa progênie destes dois sexos na mesma proporção. O cruzamento entre macho e fêmea produz uma descendência de machos e fêmeas na razão 1:1; enquanto uma geração de macho, fêmea e hermafrodita (1:1:1) é gerada quando o hermafrodita é fecundado pelo pólen do macho (URASAKI *et al.* 2002, MING *et al.* 2007).

Em regiões subtropicais, o plantio de plantas femininas é preferido para a produção de papaína, em razão das suas flores serem estáveis a baixas temperaturas (sendo que as hermafroditas tendem a fundir as anteras aos carpelos e produzir frutos deformados) (MING *et al.* 2007), e pelo superior rendimento e atividade proteolítica desta enzima (DREW 2003). Ao contrário, a produção comercial do fruto nas regiões tropicais é baseada em variedades hermafroditas, cujos frutos piriformes são preferidos em detrimento dos frutos esféricos das fêmeas (URASAKI *et al.* 2002, YU *et al.* 2008). No Brasil, tal fruto tem se destinado aos mercados interno e externo. Portanto, é desejável que somente indivíduos hermafroditas sejam cultivados no campo. Entretanto, não há um meio prático e de baixo custo para a seleção prévia deste tipo sexual, nem na fase embrionária, plântula ou estágio vegetativo de crescimento. A identificação dos tipos sexuais do mamoeiro só é feita quando se atinge a maturidade reprodutiva, que se dá após 5 a 8 meses do plantio. Assim, ao florescerem, as plantas indesejáveis são removidas da área de cultivo, fato que onera os custos de produção por acarretar desperdícios de recursos, demanda de espaço, tempo e manejo de

plantio (PARASNIS *et al.* 1999, URASAKI *et al.* 2002, CHAVES-BEDOYA & NUÑEZ 2007).

1.3 – Cultura de Tecidos em *C. papaya*

Para atender as exigências dos mercados nacional e internacional, os programas de melhoramento do mamoeiro procuram obter linhagens que sejam, sobretudo, hermafroditas, resistentes a patógenos, ricas em papaína e látex, e que produzam frutos com maturação uniforme e resistentes à conservação e ao transporte (KOEHLER 2004). Tendo em vista os problemas gerados pela propagação seminífera e a ausência de um método prático e barato para determinação sexual precoce, torna-se necessária a busca por alternativas na produção em larga escala de plantas hermafroditas de *C. papaya* (SCHMILDT *et al.* 2007).

Nas últimas décadas, diversas técnicas biotecnológicas têm sido desenvolvidas e empregadas com sucesso para gerar subsídios aos programas de melhoramento do mamoeiro, a exemplo da cultura de tecidos. A cultura de tecidos vegetais consiste no conjunto de técnicas que possibilitam a manutenção ou o cultivo de plântulas, embriões, órgãos, tecidos e células *in vitro*, em meio de cultura apropriado e asséptico, sob condições controladas de temperatura, umidade, fotoperíodo e intensidade luminosa. Essas técnicas têm sido empregadas no desenvolvimento e propagação de cultivares ecológica e/ou agronomicamente relevantes (TORRES *et al.* 1998).

Para a cultura do mamoeiro, as técnicas de cultura de tecidos têm possibilitado a produção de um grande número de mudas com características genéticas e fitossanitárias desejáveis, provenientes de um único explante de linhagens/cultivares de interesse agrônômico (ALMEIDA *et al.* 2000, 2001, BHATTACHARYA & KHUSPE 2001, DREW 2003, SCHMILDT *et al.* 2007). Além da multiplicação massal, a manutenção *in vitro* de plantas elite possibilita conservar recursos genéticos de *C. papaya*, pela utilização de sistemas lentos de crescimento. Tais recursos genéticos são de grande importância para programas de melhoramento. Neste sentido, a

criopreservação de meristemas e sementes de mamão, com subsequente regeneração *in vitro*, é outro método de sucesso na conservação a longo prazo de germoplasmas (DREW 2003). A cultura de tecidos, portanto, vem fornecendo alternativas que podem minimizar e/ou resolver muitos dos problemas oriundos do cultivo via sementes dessa espécie (MANSHARDT & DREW 1998, ALMEIDA *et al.* 2000).

O resgate de embriões, a cultura de anteras (RIMBERIA *et al.* 2005, 2006), o isolamento e cultivo de protoplastos (CHEN & CHEN 1992, CHEN 1994), a embriogênese somática (ES) (CHEN *et al.* 1987, FITCH & MANSHARDT 1990, YANG & YE 1992, FITCH 1993, JORDAN & VELOZO 1996, VIANNA 1996, CASTILLO *et al.* 1998a,b, ALMEIDA *et al.* 2000, 2001, FERNANDO *et al.* 2001, RENUKDAS *et al.* 2003, ASCENCIO-CABRAL *et al.* 2008, HOMHUAN *et al.* 2008), a produção de sementes sintéticas (CASTILLO *et al.* 1998b), a micropropagação (DREW & MILLER 1989, DREW *et al.* 1993, LAI *et al.* 2000, YU *et al.* 2000, 2003, RABELLO *et al.* 2007, SCHMILDT *et al.* 2007) e a transformação genética (YANG *et al.* 1996, CARMO & JÚNIOR 2003) são algumas das ferramentas da cultura de tecidos que vêm sendo aplicadas em explantes de mamoeiro.

1.3.1 – Embriogênese Somática

Considerando a importância da cultura de tecidos no cultivo do mamão, diferentes protocolos têm sido propostos (CLARINDO *et al.* 2008). E entre as técnicas, a ES tem se constituído um sistema alternativo e competitivo para a multiplicação e a manutenção em larga escala de plântulas de *C. papaya* com características de grande interesse agrônomo (FITCH 1993), principalmente do sexo hermafrodita. Na ES, uma única célula ou um pequeno conjunto de células, reprodutivas ou somáticas, são submetidos ao processo de desdiferenciação e rediferenciação celular para produzir embriões somáticos similares aos embriões zigóticos (CHANDRA & PENTAL 2003). Geralmente, o processo de ES é induzido por tratamentos com auxinas, especialmente o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Esses

reguladores de crescimento são essenciais na aquisição de competência embriogênica pelas células (von ARNOLD *et al.* 2002, KOEHLER 2004).

A partir da década de 1980, a ES no mamoeiro vem sendo melhor estudada e explorada, principalmente, para a propagação clonal *in vitro* (HOMHUAN *et al.* 2008). No entanto, pode-se também incluir aplicações para a tecnologia de transferência gênica e para a regeneração de células transformadas (FITCH & MANSARDT 1990, ALMEIDA *et al.* 2001).

O sistema ES tem sido estabelecido a partir de diferentes explantes da planta de *C. papaya*, como: pecíolo (DE BRUIJNE *et al.* 1974, YANG & YE 1992), internodo caulinar (YIE & LIAW 1977), hipocótilo (FITCH 1993, CASTILLO *et al.* 1998a, ALMEIDA *et al.* 2000, 2001), ápice caulinar (MEDHI & HOGAN 1976), gema axilar (JORDAN & VELOZO 1996), folha ou cotilédone (CABRERA-PONCE *et al.* 1996, HOMHUAN *et al.* 2008), raiz (CHEN *et al.* 1987), antera (RIMBERIA *et al.* 2006), integumento de semente imatura (MONMARSON *et al.* 1995), embriões zigóticos maduros (FERNANDO *et al.* 2001) e imaturos (FITCH & MANSARDT 1990, CASTILLO *et al.* 1998b, BHATTACHARYA *et al.* 2002, RENUKDAS *et al.* 2003, ASCENCIO-CABRAL *et al.* 2008, CLARINDO *et al.* 2008). Independente do explante explorado, o mamão papaia tem respondido bem às técnicas de ES (MONMARSON *et al.* 1995), desde que esses explantes sejam oriundos de plantas saudáveis, vigorosas, mantidas em crescimento ativo e sem estresse ambiental (VIANNA 1996), e que as condições *in vitro* sejam adequadas para o desenvolvimento da ES (DREW 2003). Observa-se, portanto, que a maioria dos trabalhos em ES utiliza embriões zigóticos imaturos, visto que este tipo de explante apresenta alto potencial embriogênico e baixo índice de contaminação bacteriana e fúngica, ao contrário de tecidos adultos (MONMARSON *et al.* 1995).

Outro enfoque pode ser dado ao tipo de sistema de ES utilizado em *C. papaya*. A indução de ES tem sido obtida, principalmente, em meio de cultura semi-sólido (solidificado em fitagel) (FITCH & MANSARDT 1990, CASTILLO *et al.* 1998a, RENUKDAS *et al.* 2003, CLARINDO *et al.* 2008). No entanto, numerosos embriões somáticos podem ser eficientemente produzidos em sistema líquido (LITZ & CONOVER 1983, LITZ 1986, BERTHOULY & MICHAUX-FERRIERE 1996, JORDAN & VELOZO 1996,

van BOXTEL & BERTHOULY 1996, CASTILLO *et al.* 1998a,b, RIMBERIA *et al.* 2005, YANG *et al.* 2010). CASTILLO *et al.* (1998a,b) desenvolveram um protocolo de sistema líquido para a produção em larga escala de embriões somáticos de *C. papaya*, usando calos embriogênicos oriundos de hipocótilo. Concluiu-se que esse sistema é um método prático e apropriado para a rápida produção, manipulação e coleta de embriões somáticos vigorosos, com alta frequência de conversão e regeneração em plântulas. Os autores predizem, ainda, que o sistema líquido é um método adequado para uma propagação contínua em biorreator.

Apesar dos sucessos reportados da aplicação das técnicas de cultura de tecidos para o mamoeiro, como resultado de uma considerável atenção dada por pesquisadores, o estabelecimento *in vitro* apresenta alguns desafios. Uma de suas principais limitações consiste na necessidade de um exato ajuste no balanço entre nutrientes, reguladores de crescimento e condições de cultura, que são determinados em função de cada cultivar e do estado fisiológico das plantas (ALMEIDA *et al.* 2001). Outros desafios se concentram no estabelecimento de eficientes protocolos de regeneração, no qual incluem os processos de enraizamento *in vitro* e de aclimatização *in vitro* e *ex vitro* (YANG & YE 1992, YU *et al.* 2000, DREW 2003).

1.3.2 – Regeneração *in vitro* e Aclimatização

Uma das etapas mais críticas da micropropagação do mamoeiro é a transferência das plântulas para condições *ex vitro*. Para se obter sucesso durante a aclimatização, faz-se necessário aperfeiçoar a fase de enraizamento (YU *et al.* 2000, SCHMILDT *et al.* 2007).

A fase de enraizamento no processo micropropagativo foi conceituada como estágio III por MURASHIGE (1974), sucedendo aos estádios I e II, que se referem à iniciação e multiplicação *in vitro*, respectivamente. O processo de enraizamento inclui fatores fisiológicos, bioquímicos e biológicos que interagem com fatores externos. Além disso, a complexidade é aumentada pela variabilidade genética, dado à multiplicidade de espécies e cultivares (RABELLO *et al.* 2007).

Um desafio, portanto, refere-se ao desenvolvimento de um método prático e reproduzível para a produção de plântulas vigorosas e sadias a partir de embriões somáticos de papaia. O principal problema consiste na baixa taxa de germinação, decorrente da produção de calo na base da radícula do embrião e ocorrência de hiperhidricidade (ASCENCIO-CABRAL *et al.* 2008).

O principal fator responsável pela produção de altas porcentagens (90%) de raízes com características propícias para aclimatização é o tempo de exposição ao hormônio de iniciação radicular, a auxina. O ácido indolbutírico (AIB) é a auxina mais utilizada para este propósito (MANSHARDT & DREW 1998, DREW 2003). Um sistema radicular morfológicamente bem formado se caracteriza por raízes principais finas e muitas adventícias, sendo que essas últimas são formadas quando a auxina não é mais requerida (DREW *et al.* 1993). Variações na nutrição mineral, no tipo de agente gelificante e na qualidade da luz, incluindo fotoperíodo e irradiância, também têm sido reportados por afetar o processo de aclimatização *in vitro* (DREW & MILLER 1989, RABELLO *et al.* 2007, ASCENCIO-CABRAL *et al.* 2008).

O enraizamento *ex vitro* é um método alternativo para a micropropagação; entretanto, esta proposta é limitada pelas condições rigorosas de enraizamento, tempo, fatores sazonais e tipo de explante (YU *et al.* 2000).

1.3.3 – Variação Somaclonal vs. Citometria de Fluxo e Citogenética

Técnicas de cultura de tecidos estão frequentemente associadas com a ocorrência de variação somaclonal (VS) (RENAU-MORATA *et al.* 2005, CLARINDO *et al.* 2008, JIN *et al.* 2008), termo dado por LARKIN & SCOWCROFT (1981). Entende-se por VS, a variação encontrada entre células, embriões, órgãos ou plantas derivadas de cultura *in vitro*, e que não é previsível na natureza. As condições de estresse impostas pelo sistema *in vitro* durante o isolamento de explantes e a reprogramação celular favorecem tal evento (JAIN 2001). Além da composição física e/ou química do meio de cultivo, a idade da cultura (determinada pelo número de

subcultivos), o tipo de explante e o genótipo da espécie também influenciam a extensão dessa instabilidade genética (JAIN 2001, BENNICI *et al.* 2004, ALAN *et al.* 2007).

A VS pode envolver tanto características genéticas (herdáveis) quanto epigenéticas (não-herdáveis). As primeiras incluem alterações cromossômicas numéricas e estruturais, mutações gênicas, ativações de elementos transponíveis, permutas entre cromátides-irmãs, inserções e deleções no DNA, e alterações no DNA mitocondrial e cloroplastidial; e a última caracteriza-se por mudanças no padrão de metilação (BENNICI *et al.* 2004, SMÝKAL *et al.* 2007). Dentre todas as possíveis variações genéticas e/ou epigenéticas, as alterações de ploidia são as mais comuns em culturas de tecidos (PHILLIPS *et al.* 1994). Em relação às técnicas de cultura de tecidos, o processo de calogênese apresenta maior susceptibilidade à ocorrência de VS (KARP 1994, BERTIN & BOUHARMONT 1997, SKIRVIN *et al.* 2000, ALAN *et al.* 2007, SMÝKAL *et al.* 2007).

Em contrapartida à VS derivada das condições de cultivo *in vitro*, alguns autores chamam a atenção para a variação genética pré-existente nos tecidos vegetais parentais (HENRY *et al.* 1996, SKIRVIN *et al.* 2000). Para SKIRVIN *et al.* (2000), entretanto, a distinção entre regenerantes oriundos de uma variação pré-existente ou de VS via cultura de tecidos ainda permanece obscura.

A VS pode ser de grande interesse em programas de melhoramento e de engenharia genética, visto que a variabilidade é um componente essencial de qualquer programa de cultivar convencional. Considerando as desvantagens inerentes do melhoramento convencional (onerosidade, longo prazo, amplos terrenos), a adoção de técnicas de cultura de tecidos se constitui numa alternativa para tal fim, graças ao grande potencial em gerar variabilidade e regenerar plantas em larga escala e em curto espaço de tempo. Este caso é considerado um exemplo em que a ocorrência de VS é desejável, desde que o somaclone seja geneticamente estável, o que pode ser confirmado por testes em campo (AL-ZAHIM *et al.* 1999, DO *et al.* 1999, JAIN 2001, POLANCO & RUIZ 2002, RAKOCZY-TROJANOWSKA 2002, SMÝKAL *et al.* 2007). MANSHARDT (1992) relata a utilidade da ocorrência

de VS na cultura do mamoeiro, quando se almeja escanear e selecionar variantes com resistência a doenças fúngicas.

Por outro lado, quando a propagação clonal *in vitro* ou a transformação genética é o principal objetivo, a VS se torna um fenômeno indesejável. Pesquisadores ressaltam, portanto, a importância de se determinar os mecanismos, os fatores e a frequência da VS, e a estabilidade genética do material advindo da cultura *in vitro*, a fim de assegurar o sucesso dos programas de melhoramento que empregam este tipo de ferramenta. Diferentes métodos têm sido utilizados para detectar e/ou selecionar variantes somaclonais, a saber: citológicos, pelo tamanho dos estômatos e/ou número de cloroplastos nas células-guarda (JACOBS & YODER 1989, McCUISTION & ELMSTROM 1993, MISHRA 1997, JOACHIMIAK & GRABOWSKA-JOACHIMIAK 2000); marcadores moleculares (AL-ZAHIM *et al.* 1999, FOURRÉ 2000, GESTEIRA *et al.* 2002, POLANCO & RUIZ 2002, ENCHEVA *et al.* 2003, RENAU-MORATA *et al.* 2005, CHEN *et al.* 2006, HOMHUAN *et al.* 2008); citogenéticos, pela contagem e análise de alterações cromossômicas (HENRY *et al.* 1996, KOCHVENKO *et al.* 1996, FOURRÉ *et al.* 1997, BRUTOVSKÁ *et al.* 1998, AL-ZAHIM *et al.* 1999, DO *et al.* 1999, TREMBLAY *et al.* 1999, MENÉNDÉS-YUFFÁ *et al.* 2000); e citométricos (BRUTOVSKÁ *et al.* 1998, THIEM & SLIWINSKA 2003, LEAL *et al.* 2006, ALAN *et al.* 2007, LOUREIRO *et al.* 2005, 2007, PARC *et al.* 2007, CLARINDO *et al.* 2008).

Pelo fato do nível de ploidia estar relacionado com o número de cloroplastos e/ou o tamanho dos estômatos, a citologia se mostra uma ferramenta fácil e prática para identificar poliploides, porém se limita a esta finalidade. Sua baixa resolução não possibilita discriminar os possíveis casos de eupoliploidia e de aneuploidia. As técnicas citogenéticas, por sua vez, são mais acuradas neste sentido, mas exigem a elaboração de protocolos que são espécie-específicos, o que demanda tempo e trabalho, ainda mais para uma grande quantidade de amostras. Além disso, ROUX *et al.* (2003) relata que a análise cariológica é melhor realizada no estágio metafásico e, por isso, a escolha do material limita-se aos tecidos com alta atividade mitótica, como os meristemas radiculares. Em relação à biologia molecular, trata-se de uma área laboriosa e onerosa. Adicionalmente, esta

pode ser considerada uma técnica não conclusiva, na medida em que a ausência de polimorfismos para determinados marcadores moleculares não assegura estabilidade genética. Como alterações cromossômicas podem permanecer indetectáveis, torna-se útil o emprego de métodos de análise complementares (JIN *et al.* 2008).

A citometria de fluxo (CF), entretanto, tem se firmado como uma ferramenta confiável de análise e detecção rápida de somaclones euplóides e aneuplóides, pela verificação do nível de ploidia das plântulas geradas na cultura *in vitro* (BRUTOVSKÁ *et al.* 1998, THIEM & SLIWINSKA 2003, ALAN *et al.* 2007, LOUREIRO *et al.* 2005, 2007, PARC *et al.* 2007, CLARINDO *et al.* 2008, YANG *et al.* 2010), além de ser aplicável para vários tecidos vegetais (ROUX *et al.* 2003). Técnicas citométricas de fluxo se baseiam no uso de fluorocromos DNA-específicos e na análise de suas respectivas fluorescências relativas emitidas pelos núcleos corados (BELLETTI *et al.* 1998, LEE *et al.* 2002, LOUREIRO & SANTOS 2004, JIN *et al.* 2008). Em *C. papaya*, CLARINDO *et al.* (2008) executaram um protocolo de ES a partir de embriões zigóticos imaturos. Os regenerantes obtidos foram monitorados pela CF, a qual detectou plântulas diplóides, mixoplóides, triplóides, tetraplóides e aneuplóides, de forma confiável e em um curto espaço de tempo. Além dos métodos citométricos, é ideal que investigações citogenéticas sejam realizadas para confirmação do número cromossômico (BRUTOVSKÁ *et al.* 1998, JIN *et al.* 2008) e, principalmente, para averiguação da estabilidade cromossômica, dado pelo correto pareamento dos homólogos, o que faz a associação dessas técnicas ser promissora na pesquisa.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral adaptar protocolo para produção em larga escala de embriões somáticos de *C. papaya* e monitorar a ocorrência de VS e, conseqüentemente, detectar as plântulas de interesse para produção clonal, pela associação de ferramentas citogenética e de CF.

2.2 – Objetivos Específicos

- Adequar protocolo de sistema líquido de cultura de tecidos para a indução de ES em *C. papaya*, a partir de embriões zigóticos imaturos;
- Adaptar protocolo para maturação dos embriões somáticos em meio líquido;
- Estabelecer protocolo de regeneração e aclimatização das plântulas oriundas dos embriões somáticos;
- Determinar o nível de ploidia, pela CF, das plântulas obtidas a partir da ES;
- Verificar a estabilidade cromossômica, por técnicas citogenéticas, das plântulas selecionadas pela CF.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material Vegetal

Frutos de plantas hermafroditas de *Carica papaya* 'Golden' foram fornecidos pela Caliman Agrícola S.A. (Linhares, Espírito Santo, Brasil). Os frutos foram colhidos aos 90 – 114 dias pós-antese, de acordo com FITCH & MANSHARDT (1990). Após a coleta em campo, todo o restante do procedimento foi executado no Laboratório de Citogenética e Citometria, do Departamento de Biologia Geral, da Universidade Federal de Viçosa, MG.

3.2 – Desinfestação do Material Vegetal

Os frutos foram, primeiramente, lavados com bucha e sabão em água corrente e em seguida transferidos para câmara de fluxo laminar. Os mesmos foram desinfestados superficialmente em solução de etanol 70% (v/v) por 20 s e em solução de hipoclorito de sódio 20% (v/v) e Tween 20 0,03% (v/v) (Merck®), por 20 min (modificado de CASTILLO *et al.* 1998b). Após lavagem dos frutos em água deionizada estéril, estes foram secados ao ar, dentro da câmara de fluxo laminar, por 10 min e, então, foram dissecados e os embriões zigóticos, excisados (CLARINDO *et al.* 2008).

3.3 – Indução de Calos Embrionômicos Friáveis

Ainda sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, 10 – 15 embriões zigóticos foram transferidos para cada placa de Petri (60 x 15 mm, J. Prolab®, Brasil), contendo meio de indução de calos embrionômicos friáveis – M1 (Tabela 1). O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,02$ antes da autoclavagem. As placas de Petri foram vedadas com papel-filme PVC (Goodyear®, Brasil) e mantidas no escuro a 27°C.

Os explantes permaneceram neste meio até o aparecimento de calos embrionômicos friáveis.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultura utilizados para indução de embriogênese somática e para regeneração *in vitro*.

COMPONENTES	MEIOS DE CULTURA				
	M1	M2	M3	M4	M5
Sais MS (Sigma [®])	2,15 g/L	2,15 g/L	2,15 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L
Vitaminas MS*	10 mL/L	10 mL/L	10 mL/L	10 mL/L	10 mL/L
Sacarose (Sigma [®])	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L
Mio-inositol (Sigma [®])	0,1 g/L	0,1 g/L	0,1 g/L	0,1 g/L	0,1 g/L
L-glutamina (Sigma [®])	0,4 g/L	0,4 g/L	0,4 g/L	-	-
L-cisteína (Sigma [®])	0,04 g/L	0,04 g/L	0,04 g/L	-	-
Extrato de malte (Acumedia [®])	-	0,1 g/L	0,1 g/L	-	-
2,4-D (Sigma [®])	1 – 10 µM	1 – 10 µM	-	-	-
BAP (Sigma [®])	-	0,5 – 5 µM	-	-	-
ABA (Sigma [®])	-	-	0,1 – 1 µM	-	-
GA ₃ (Sigma [®])	-	-	-	0,1 – 1 µM	-
Phytigel (Sigma [®])	3,0 g/L	-	-	-	-
Ágar (Sigma [®])	-	-	-	6,5 g/L	6,5 g/L

M1: meio de indução de calos embriogênicos friáveis; M2: meio líquido de estabelecimento de suspensão de agregados celulares; M3: meio líquido de indução de embriões somáticos; M4: meio de germinação de embriões somáticos; M5: meio MS basal; MS: Murashige & Skoog; BAP: 6-benzilaminopurina; ABA: ácido abscísico; * Solução-estoque composta por glicina (0,20 g/L), ácido nicotínico (0,05 g/L), piridoxina (0,05 g/L) e tiamina (0,01 g/L).

3.4 – Estabelecimento da Suspensão de Agregado Celular

Após o aparecimento de calos embriogênicos friáveis, 0,5 g deste material foi selecionado e transferido para frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio líquido de estabelecimento de suspensão de agregados celulares – M2 (Tabela 1). Este meio também teve seu pH ajustado para $5,7 \pm 0,02$ antes da autoclavagem.

As suspensões obtidas foram alocadas em um *shaker* giratório a 50 rpm, e mantidas a 27°C, sob um sistema de 16/8 h de luz/escuro, com uma irradiância de $36 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Estas foram submetidas a subcultivos quinzenais. Usando uma pipeta fina, agregados com cerca de 1 mm de diâmetro foram coletados e subcultivados nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.5 – Indução de Embriões Somáticos

Após 4 semanas, agregados celulares foram lavados em água deionizada e autoclavada, e 0,5 g de material foi transferido para frascos Erlenmeyer (125 mL), contendo 25 mL de meio líquido de indução de embriões somáticos – M3 (Tabela 1). As culturas foram alocadas em um *shaker* giratório a 50 rpm, e mantidas a 27°C, sob um sistema de 16/8 h de luz/escuro, com uma irradiância de $36 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, até o aparecimento de embriões somáticos primários e secundários.

3.6 – Germinação de Embriões Somáticos

Os embriões somáticos no estágio cotiledonar foram lavados em água autoclavada e transferidos para placas de Petri (60 x 15 mm, J. Prolab®, Brasil), contendo meio de germinação de embriões somáticos – M4 (Tabela 1). O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,02$ antes da autoclavagem. As placas de Petri foram vedadas com papel-filme PVC (Goodyear®, Brasil). O material foi inicialmente mantido no escuro a 27°C e, após a germinação, as

placas de Petri foram transferidas para um ambiente com irradiância de $36 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Os embriões germinados foram inoculados em frascos contendo o mesmo meio de germinação, porém desprovido do hormônio ácido giberélico (GA_3) – M5 (Tabela 1).

3.7 – Aclimatização

As plântulas obtidas foram individualmente plantadas em potes de polietileno (10 x 11 cm), contendo 100 mL do substrato composto estéril – vermiculita:casca de côco (2:1). Estes potes foram colocados em bandejas plásticas (45 x 35 x 12 cm), recobertos com papel-filme PVC e mantidos a 27°C e 100% de umidade relativa. Após 2 semanas, o papel-filme foi removido gradualmente e as plântulas foram transferidas para casa de vegetação.

3.8 – Determinação do Nível de Ploidia de DNA pela Citometria de Fluxo

Fragmentos foliares foram coletados de uma amostragem da população das plântulas aclimatizadas de *C. papaya* e de plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro*. Estas últimas foram usadas como padrão diplóide externo.

As folhas coletadas foram mantidas em água destilada a 4°C e cortadas em fragmentos de 2 cm^2 . A suspensão nuclear foi extraída pelo procedimento de *chopping* (GALBRAITH *et al.* 1983), em 0,5 mL de solução tampão Partec[®], contendo o fluorocromo 4'6'-diamino-2-fenilindol (DAPI). Logo em seguida, foram adicionados 1,5 mL da mesma solução. A suspensão foi filtrada em filtro de nylon (Partec[®]) de $30 \mu\text{m}$ de diâmetro, após 2 min. Passados 15 min no escuro, as suspensões nucleares foram processadas em um citômetro de fluxo Partec-PAS[®] (Partec[®] GmbH, Munster, Germany), equipado com uma lâmpada UV e um filtro TK 420. O equipamento foi cuidadosamente calibrado e alinhado pelo uso de *microbeads*, soluções padrão, de acordo com as recomendações do

fabricante, e da suspensão nuclear obtida das plantas padrão de mamão. A análise dos dados foi realizada pelo programa FlowMax[®] (Partec[®]). Mais de 10.000 núcleos foram analisados e três repetições independentes foram realizadas para a determinação dos níveis de ploidia de DNA das plântulas de mamão.

3.9 – Preparação e Prospecção Citogenética

Além do nível de ploidia nuclear detectada pela CF, o número cromossômico das plântulas diplóides selecionadas foi verificado por prospecção citogenética.

Meristemas radiculares das plântulas selecionadas foram submetidos a tratamento com solução do agente inibidor de microtúbulos amiprofos-metil (APM) 3 µM, por um período de 3 – 4 h, a 30°C. Posteriormente, os meristemas foram lavados em água deionizada por 20 min e, então, fixados em solução gelada de metanol:ácido acético (3:1), com três trocas de 10 min cada. Em seguida, os materiais foram estocados a -20°C.

As lâminas foram preparadas pelo método de dissociação celular e secagem ao ar (CARVALHO *et al.* 2007, ABREU *et al.* 2008), e colocadas em placa aquecedora (50°C) por 20 min. As mesmas foram imediatamente coradas com solução de Giemsa 5% (Merck[®]), em tampão fosfato (pH 6,8), por 4 min, lavadas duas vezes em água destilada e secadas ao ar. Imagens de metáfases foram capturadas por uma vídeo-câmera CCD monocromática Photometrics CoolSNAP Pro[®] (Roper Scientific[®]) de 12 bits, acoplada a um microscópio OlympusTM BX-60. O campo de captura foi digitalizado usando o kit Cool-SNAP Pro[®], e a análise de imagem foi realizada usando o sistema de análise de imagem Image Pro-Plus[®] 6.1 (Media Cybernetics).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Embriogênese Somática e Regeneração *in vitro*

Culturas embriogênicas foram estabelecidas a partir do cultivo de embriões zigóticos imaturos de *C. papaya* L. em meio M1, dispostos em placas de Petri conforme Figura 1a. Após 10 dias de cultivo, aproximadamente, ocorreu a abertura dos cotilédones e início da formação calogênica na região do meristema apical do caule e base dos cotilédones (Figura 1b). Resultados similares foram obtidos por KOEHLER (2004) e CLARINDO *et al.* (2008). O uso desse explante e a suplementação do meio com 9,05 μ M de 2,4-D resultaram na proliferação de calos embriogênicos compactos e friáveis, estes na sua maioria (cerca de 86%), a partir do 20º dia de cultivo (Figura 1c).

Na maioria das espécies vegetais, incluindo o mamoeiro, o regulador de crescimento auxínico, principalmente 2,4-D, é considerado o propulsor da competência embriogênica (MONMARSON *et al.* 1995, JORDAN & VELOZO 1996, FEHÉR *et al.* 2003, KOEHLER 2004). Em resposta à presença exógena de 2,4-D, as células vegetais são estimuladas a acumular quantidades substanciais da auxina endógena ácido indol-3-acético (AIA) (MICHALCZUK *et al.* 1992). PASTERNAK *et al.* (2002) sugerem que o aumento dos níveis endógenos desse hormônio natural pode ser responsável pela ativação do ciclo de divisão, prevenção da alongação celular e aceleração do processo de dediferenciação. Entretanto, ao comparar estudos prévios de ES indireta em diferentes espécies, ALMEIDA *et al.* (2001) e HOMHUAN *et al.* (2008) concluíram que, provavelmente, diferentes concentrações e tipos de reguladores são requeridos por diferentes fontes de explantes.

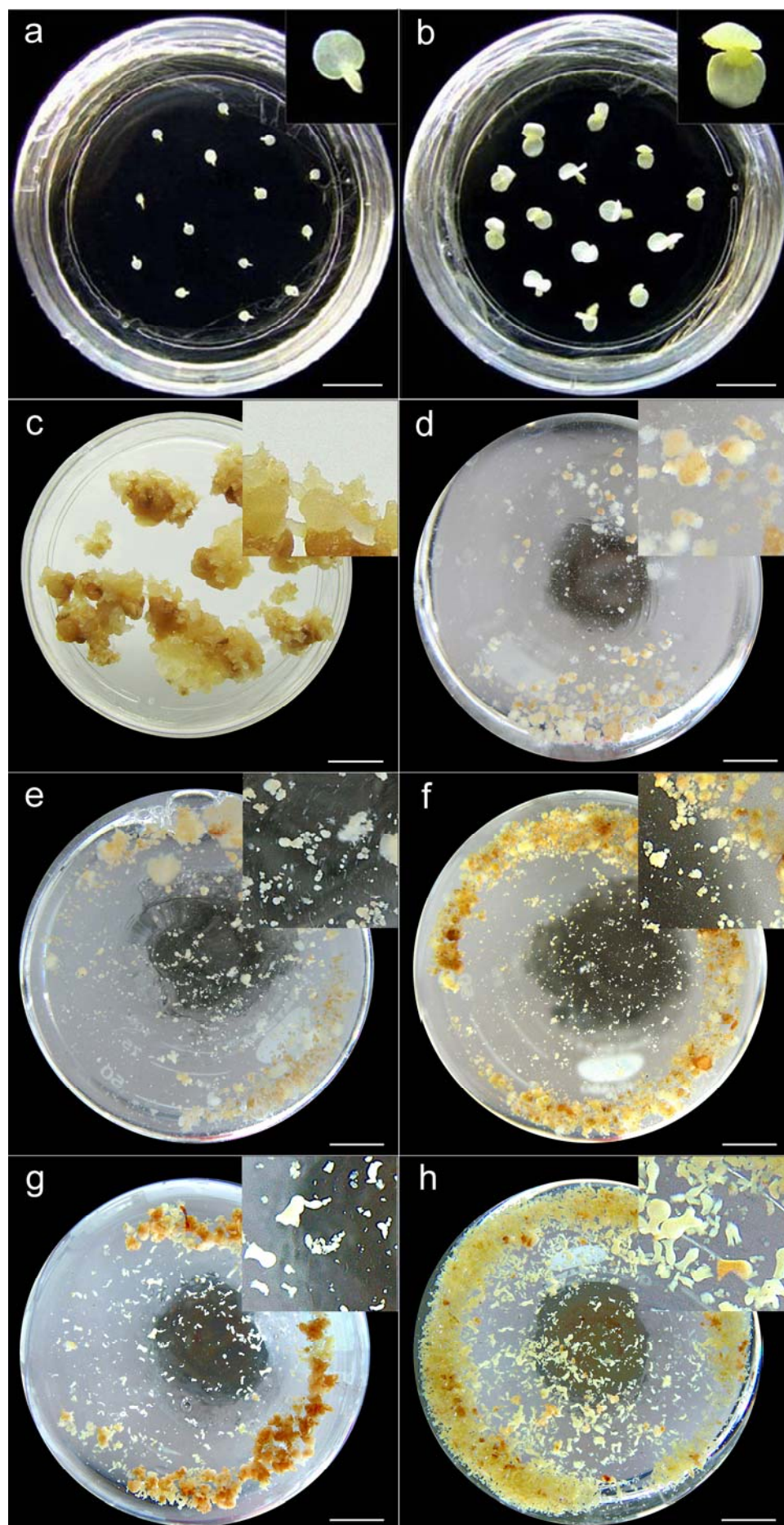
Nenhuma fonte de contaminação foi detectada durante a etapa de indução da calogênese, em meio semi-sólido. Uma das causas da ausência de contaminação se deve ao procedimento de desinfestação dos frutos e de manipulação das sementes e dos embriões zigóticos sob condições assépticas. Mas, principalmente, este fato pode ser atribuído ao uso de

embriões zigóticos imaturos para iniciação de culturas embriogênicas, em detrimento a tecidos adultos, os quais podem apresentar alto índice de contaminação por microrganismos. O processo de desinfestação superficial não alcança a contaminação endógena, o que dificulta a obtenção de culturas estéreis, como relatado por ALMEIDA *et al.* (2000). Outra vantagem do explante embrião zigótico imaturo refere-se ao alto potencial embriogênico e, conseqüentemente, à rápida resposta ao tratamento (MONMARSON *et al.* 1995). Neste trabalho, massas pró-embriogênicas foram observadas após 3 semanas de indução. Comparativamente, em secções de hipocótilo, por exemplo, FITCH (1993) obteve esta resposta entre 10 e 14 semanas, e CASTILLO *et al.* (1998a), em aproximadamente 6 semanas. Além disso, para explantes juvenis, como embriões zigóticos imaturos, a regeneração *in vitro* das plântulas produzidas tem sido obtida com maior sucesso (JORDAN & VELOZO 1996).

Para a transferência de calos embriogênicos friáveis para um sistema líquido, testes preliminares com diferentes combinações de reguladores foram realizados (Tabela 1). O melhor resultado foi obtido pela suplementação de 2,4-D 9,05 μM e BAP 2,25 μM ao meio de cultura (M2) (Figura 1d). Nessas condições, foi possível o aumento da proliferação celular: a cada subcultivo quinzenal, foi observado que 0,5 g de agregados celulares gerou um aumento de biomassa de duas a quatro vezes. De acordo com JORDAN & VELOZO (1996), uma combinação de auxina e citocinina presente em meio líquido não favoreceu a diferenciação das suspensões em embriões somáticos de *C. pubescens*, mas permitiu um aumento na proliferação celular e na formação de agregados.

A manutenção da condição de desdiferenciação das células cultivadas requer a ativação da divisão celular (FEHÉR *et al.* 2003, de los SANTOS-BRIONES & HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR 2006). Auxinas e citocininas são os principais reguladores hormonais envolvidos na reativação, regulação e manutenção da divisão celular (PASTERNAK *et al.* 2000, GAMBORG 2002, FEHÉR *et al.* 2003). Considerando que a cultura de tecidos permite gerar e controlar um sistema de proliferação celular, a adoção desta técnica se torna desejável em pesquisas citogenéticas para obter cromossomos mitóticos em grande quantidade.

Figura 1 – Estágios do desenvolvimento da cultura embriogênica de *C. papaya*. a) Estabelecimento da ES, a partir de embriões zigóticos imaturos cultivados em meio semi-sólido suplementado com 2,4-D (M1) – 1º dia de cultivo. b) Abertura dos cotilédones e resposta calogênica inicial dos explantes, após 10 dias de cultivo. c) Proliferação de calos embriogênicos, em 20 dias de cultivo. d) Suspensão de calos embriogênicos friáveis, em meio de proliferação suplementado com 2,4-D 9,05 μM e BAP 2,25 μM (M2). e-h) Processo sequencial de conversão e maturação de embriões somáticos, em meio contendo ABA 0,5 μM (M3), até a obtenção de uma suspensão de embriões em 4 fases de diferenciação (h). Em destaque, na extremidade superior direita, detalhes dos estágios da cultura embriogênica. Barras = 1 cm.



A conversão e a maturação dos embriões somáticos ocorreram após a transferência de agregados celulares para o meio líquido contendo 0,5 μM de ABA (M3) (Figura 1e-h). No decorrer de 3 – 4 meses, foram obtidas suspensões desses embriões de coloração esbranquiçada a amarelo-palha e em diversas fases de diferenciação (cordiforme, torpedo, pré-cotiledonar e cotiledonar) (Figura 1h). Além disso, ES direta a partir dos embriões somáticos já formados foi observada a uma taxa de 92%. KOEHLER (2004) também observou uma maturação assincrônica dos embriões somáticos de *C. papaya* em meio com 0,5 μM de ABA, porém utilizando sistema semi-sólido.

Em geral, o ABA tem sido o hormônio vegetal mais indicado para o processo de regulação da maturação *in vitro* (CHEN & CHEN 1992, CASTILLO *et al.* 1998a). A importância da adequação espécie-específica de tratamentos de maturação reside na influência direta sobre a qualidade dos embriões formados e, conseqüentemente, sobre a germinação. Em algumas espécies, este fitorregulador atua reduzindo o processo de embriogênese secundária (o que não ocorreu em nosso estudo, com mamoeiro), prevenindo a germinação precoce (von ARNOLD *et al.* 2002) e estimulando a deposição de produtos de reserva, especialmente lipídios e proteínas, mas não afeta o acúmulo de amido nem a diferenciação dos tecidos (von ADERKAS *et al.* 2002, SHOLI *et al.* 2009). Entretanto, a exposição prolongada ao ABA pode ser prejudicial para o crescimento da planta (von ARNOLD *et al.* 2002). Segundo CHEN *et al.* (1991), embriões somáticos de um híbrido de *Carica* proliferaram por meio da embriogênese direta, sem qualquer evidência de formação de calos ou germinação, quando inoculados em meio contendo ABA. Na ausência deste hormônio, os embriões germinaram precocemente e apresentaram tanto embriogênese secundária quanto calogênese na sua superfície.

Após a fase de maturação, embriões morfologicamente bem formados, no estágio cotiledonar, foram extraídos e inoculados em meio suplementado com 0,5 μM de GA_3 (M4), para indução da germinação (Figura 2a, b). Vale ressaltar que a seleção e a coleta dos embriões somáticos em meio líquido foi facilitada por estarem individualizados. Uma alta porcentagem de plântulas foi obtida (cerca de 80%); estas foram

propagadas em meio MS basal (M5) (Figura 2c) e, posteriormente, submetidas à fase de aclimatização (Figura 2d).

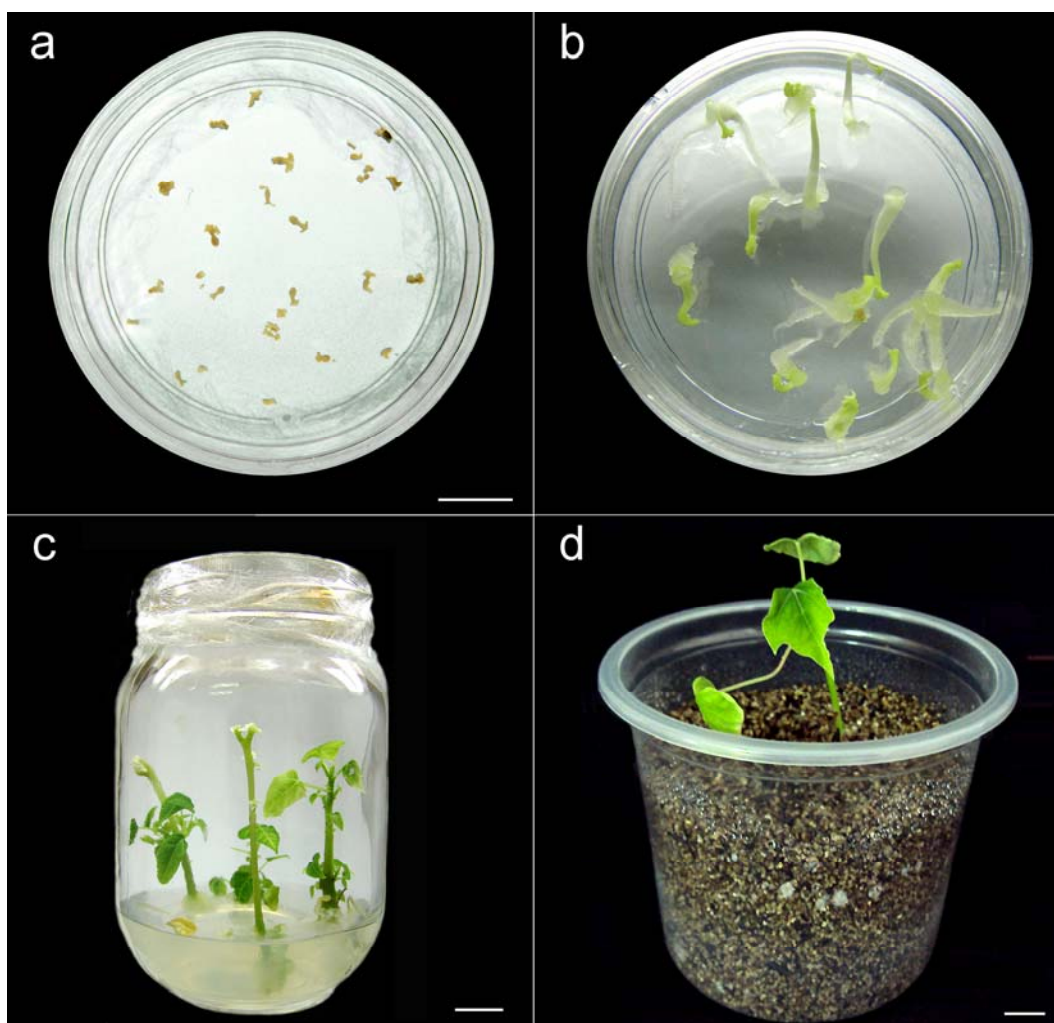


Figura 2 – Germinação, regeneração e aclimatização *in vitro* de embriões somáticos de *C. papaya*. a) Embriões somáticos em meio de germinação suplementado com GA₃ 0,5 μ M (M4), no 1º dia de cultivo. b) Embriões somáticos germinados. c) Plântulas regeneradas em meio MS basal, sem regulador de crescimento (M5). d) Plântulas regeneradas e submetidas à aclimatização em substrato de vermiculita:casca de côco (2:1). Barras = 1 cm.

A formação de embriões com desenvolvimento anormal também foi observada (21%). JORDAN & VELOZO (1996) relatam possíveis causas desse fato: desbalanço gradual de reguladores de crescimento que poderiam, eventualmente, ser produzidos pelos próprios embriões somáticos

em estágios mais desenvolvidos; ou a falta de um fator regulatório no desenvolvimento embriogênico.

Os resultados do presente trabalho corroboram com relatos na literatura, na medida em que a adoção de um sistema líquido foi eficiente na alta produção de embriões somáticos (Figura 1h), o que o torna bastante apropriado em escala industrial. Em mamoeiro, geralmente as culturas embriogênicas são iniciadas e mantidas em meio semi-sólido. Entretanto, o uso de culturas em suspensão favorece a propagação em larga escala (BERTHOULY & MICHAUX-FERRIERE 1996, JORDAN & VELOZO 1996, CASTILLO *et al.* 1998a, von ARNOLD *et al.* 2002, YANG *et al.* 2010). Outra vantagem sobre suspensões celulares de calos embriogênicos, mencionada por MONMARSON *et al.* (1995), é que protoplastos podem ser obtidos e, subsequentemente, transformados.

CASTILLO *et al.* (1998a) compararam a quantidade e a capacidade de germinação de embriões somáticos de mamoeiro produzidos em meio solidificado em ágar e em sistema líquido. Ao obter uma produtividade superior por explante no segundo caso (455 embriões) em relação ao primeiro (174 embriões), esses pesquisadores também concluíram que o meio líquido consiste em uma estratégia mais efetiva para propagação em massa. Adicionalmente, este sistema foi considerado adequado para a automação de uma produção rápida de embriões somáticos e para a propagação contínua em biorreatores. Um estudo semelhante foi executado por MALIK (2008), em *Narcissus*. Este pesquisador comparou a produção de embriões somáticos pelo cultivo de explantes de ovário em meio semi-sólido, líquido e em uma combinação de ambos. O melhor resultado foi obtido ao utilizar o sistema líquido em pelo menos uma etapa do processo.

Independentemente do explante utilizado, sistemas líquidos podem ser empregados com sucesso. Recentemente, a indução de ES em *Brassica oleracea* foi realizada em raiz, cotilédone e hipocótilo. A frequência de explantes com formação embriogênica e o número de embriões somáticos gerados por explante foram superiores em cultura líquida em relação ao meio semi-sólido (YANG *et al.* 2010).

4.2 – Análises Citométrica e Citogenética

Uma amostragem das plântulas regeneradas de embriões somáticos foi analisada pela CF, para verificar o nível de ploidia das mesmas. O escaneamento realizado apresentou 88% de plântulas diplóides ($2C = 2X$), com a mesma ploidia de DNA do padrão (Figura 3a), 6% de plântulas tetraplóides ($2C = 4X$) (Figura 3b), e 6% de aneuplóides (dados não apresentados). Considerando que o mesmo nível de ploidia do padrão e dos regenerantes diplóides corresponderia à presença do mesmo número cromossômico e quantidade de DNA, uma averiguação citogenética quanto a outras eventuais variações cromossômicas pode ser feita, caso seja de interesse. A análise citogenética nas plântulas selecionadas confirmou o número diplóide ($2X = 18$) e possibilitou a verificação do correto pareamento dos homólogos e, conseqüentemente, da ausência de alterações estruturais visualmente detectáveis (Figura 4). Os tetraplóides e aneuplóides não foram analisados citogeneticamente, visto que, na propagação clonal, tem-se o interesse principal nos indivíduos diplóides.

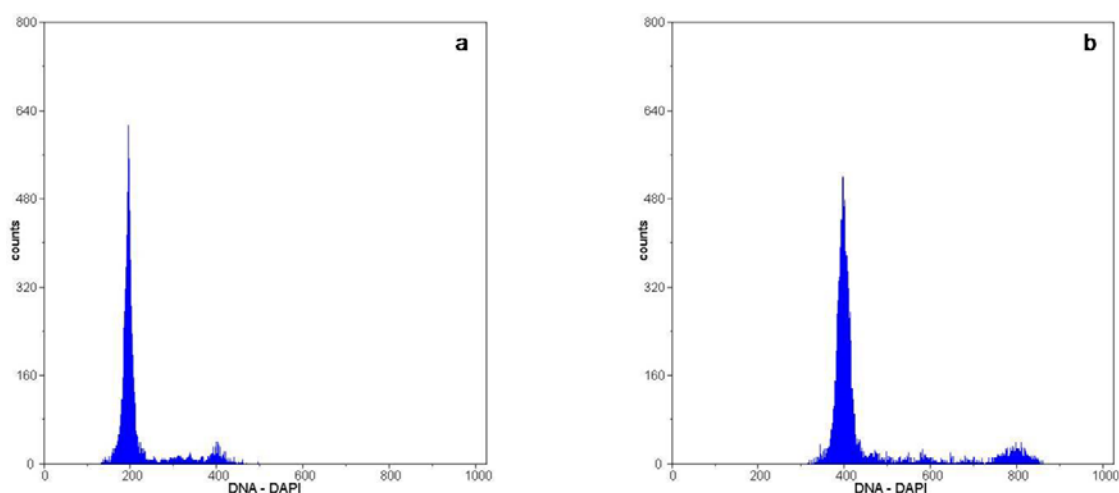


Figura 3 – Histogramas citométricos de fluxo de núcleos de *C. papaya* corados com DAPI. a) Representativo dos regenerantes diplóides (88%) e do padrão, apresentando pico G_0/G_1 no canal 200 e coeficiente de variação (CV) 3,31. b) Representativo das plântulas tetraplóides (6%), apresentando pico G_0/G_1 no canal 400 e CV 4,68.

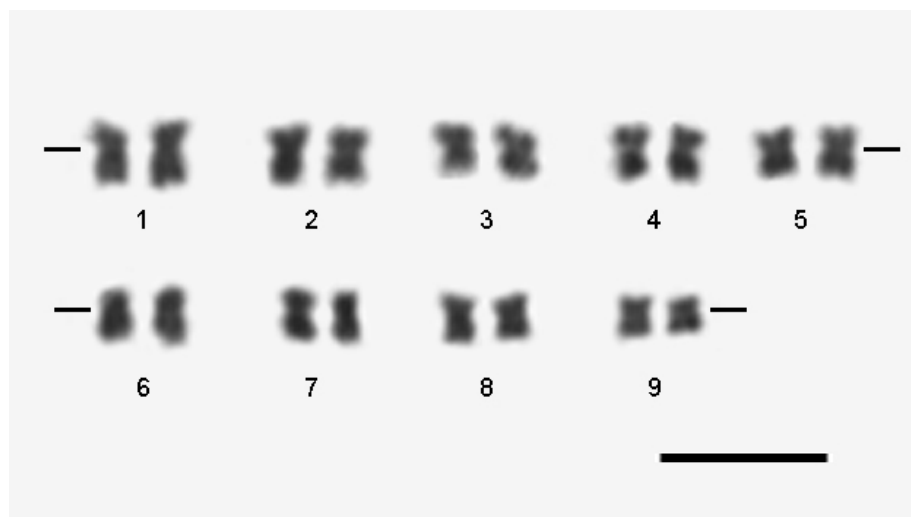


Figura 4 – Cariograma de uma plântula diplóide de *C. papaya*, oriunda de embrião somático, com $2X = 18$ cromossomos obtidos de meristemas radiculares pré-tratados com APM $3 \mu\text{M}$, por 4 h a 30°C , e corados com Giemsa 5%. Barra = $5 \mu\text{m}$.

Nas análises de CF, a obtenção de histogramas com CV's entre 3,31 e 4,68 demonstra que as suspensões nucleares apresentaram núcleos intactos, isolados e estequiometricamente corados. Segundo DOLEŽEL & BARTOŠ (2005), CV's abaixo de 5% são considerados aceitáveis em estudos de CF vegetal.

No presente trabalho, constatou-se a ocorrência de VS, pela CF, em plântulas regeneradas de *C. papaya* por meio da ES indireta. O mesmo foi relatado por CLARINDO *et al.* (2008), ao utilizar a mesma ferramenta de detecção. Foram encontrados 4,4% de triploídes, 2% de tetraploídes, 5,6% de mixoploídes e 2% de aneuploídes, além dos 86% de plântulas diplóides de *C. papaya*. Diferentemente do protocolo empregado neste estudo, esses autores utilizaram o sistema semi-sólido durante todo o procedimento de indução de ES.

A ES indireta é caracterizada pela presença de uma fase calogênica friável (GAHAN & GEORGE 2008). Geralmente, culturas de calos embriogênicos friáveis têm sido consideradas mais susceptíveis à VS (BERTIN & BOUHARMONT 1997, SKIRVIN *et al.* 2000, SMÝKAL *et al.* 2007) e menos propícias à uniformidade genética e citológica (YANG *et al.* 2010). Uma vantagem do sistema ausente de calogênese é representado

por YANG *et al.* (2010) que, ao estudarem os efeitos da ES direta em *B. oleracea*, não detectaram nenhuma poliploidia ou aneuploidia entre os regenerantes. Outro fator que favorece o aumento de VS diz respeito ao estabelecimento de culturas prolongadas (JAIN & de KLERK 1998, von ARNOLD *et al.* 2002, ETIENNE & BERTRAND 2003). Culturas em suspensão também criam um ambiente favorável para a recombinação somática (JAIN 2001, PARC *et al.* 2007). Apesar dessas diferenças entre meio líquido e semi-sólido, em *C. papaya* a ocorrência de VS parece independe do tipo de sistema empregado, tendo em vista os resultados obtidos neste presente estudo e por CLARINDO *et al.* (2008).

Dentre todas as possíveis variações genéticas e/ou epigenéticas, as alterações de ploidia são as mais comuns em culturas de tecidos (PHILLIPS *et al.* 1994), podendo gerar perda da capacidade de regeneração *in vitro* (ALAN *et al.* 2007). Por exemplo, pela ES em *Hypericum perforatum*, foram observados regenerantes euplóides (3X, 4X e 5X), aneuplóides (2X + 4) e mixoplóides (2X, 4X) (BRUTOVSKÁ *et al.* 1998). De acordo com THIEM & SLIWINSKA (2003), cultura calogênica de *Rubus chamaemorus* apresentou mixoploidia (2X, 4X, 8X).

Em virtude da possibilidade de ocorrência de VS em material cultivado *in vitro*, o nível de ploidia e a estabilidade genética dos regenerantes devem ser determinados, a fim de se evitar perdas comerciais quando o objetivo é a micropropagação clonal, ou para proporcionar maior eficiência em programas de melhoramento e em estudos de transformação. Diversas estratégias estão disponíveis para a detecção desses variantes, incluindo identificação fenotípica, análises citológicas e técnicas de análise de DNA (JIN *et al.* 2008).

A identificação fenotípica baseada na descrição de características morfológicas e fisiológicas requer observações extensivas das plantas até a maturidade. Entretanto, algumas alterações induzidas pelo cultivo *in vitro* ocorrem apenas a nível molecular, sem modificar seu fenótipo (JIN *et al.* 2008). As variações morfolologicamente visíveis acontecem a uma frequência menor às mudanças na estrutura genética (SMÝKAL *et al.* 2007). Tais fatos tornam este método impreciso e inapropriado para a seleção de VS.

O uso da CF tem sido uma excelente alternativa para avaliar alterações no conteúdo de DNA e no nível de ploidia (JIN *et al.* 2008). A citometria é uma técnica relativamente simples e de rápida detecção e, principalmente, que pode ser conduzida em estágios precoces do desenvolvimento. Uma desvantagem desta ferramenta está na impossibilidade de detectar pequenas mutações no DNA e até mesmo rearranjos cromossômicos. Metodologias complementares, portanto, se tornam necessárias para uma avaliação mais completa e conclusiva dos materiais de interesse (ALAN *et al.* 2007).

A associação de técnicas, como citogenética e molecular, foi adotada por PONTAROLI & CAMADRO (2005) para escanear VS em *Asparagus officinalis*. Resultados mostraram que essas metodologias são confiáveis e complementares para análises nesta espécie. Diferentemente, BRUTOVSKÁ *et al.* (1998) empregaram tanto a citogenética quanto a CF na avaliação da estabilidade genética de plântulas de *H. perforatum* regeneradas *in vitro*. Os resultados citométricos e cariológicos, pela contagem de cromossomos, foram comparáveis, dado a detecção inequívoca de plantas aneuplóides e mixoplóides por ambos os métodos. Ambas as ferramentas, citométrica e citogenética também são indicadas em estudos que envolvam poliploidização *in vitro*, com a função de discriminar os diferentes níveis de ploidia gerados por esta técnica (PINHEIRO *et al.* 2000, GU *et al.* 2005). Nesse sentido, PRAÇA *et al.* (2009) aplicaram a CF para detectar tetraplóides de *Solanum lycopersicum* efetivamente gerados pelo protocolo de poliploidização, e a citogenética com o objetivo de confirmar os dados citométricos. Especificamente a CF tem sido amplamente usada em associação à cultura de tecidos, no que diz respeito à indução de haplóides e duplo-haplóides (ROKKA *et al.* 1998, ASSANI *et al.* 2003, LOTFI *et al.* 2003, FROELICHER *et al.* 2007)

5 – CONCLUSÕES

Tendo em vista o potencial da aplicabilidade comercial da ferramenta de ES para produção em larga escala de plântulas de *C. papaya*, os protocolos de indução, maturação, regeneração e aclimatização *in vitro* estabelecidos neste trabalho foram considerados adequados. Especificamente, o sistema líquido e o uso de embriões zigóticos imaturos como fonte de explante foram eficazes na alta produção de embriões somáticos. Ressalta-se ainda a facilidade e a praticidade em selecionar embriões somáticos, que se encontram individualizados, quando em meio líquido.

Por meio da análise de CF, a ocorrência de variantes somaclonais entre as plântulas regeneradas foi verificada, incluindo tetraplóides e aneuplóides. Consequentemente, regenerantes diplóides, de interesse comercial para a propagação clonal em larga escala, foram detectados e selecionados. Estes resultados reforçam a idéia de susceptibilidade à VS associada ao cultivo *in vitro*. Os histogramas de fluxo gerados apresentaram CVs considerados apropriados para análises citométricas, demonstrando a confiabilidade desta técnica para o objetivo proposto. Pela citogenética, os procedimentos de bloqueio mitótico, digestão enzimática, dissociação celular e secagem ao ar em meristemas radiculares de *C. papaya* resultaram na obtenção de cromossomos metafásicos morfológicamente adequados para montagem do kariograma e, subsequente, análise das características cromossômicas estruturais. Por estes kariogramas, foi observado o correto pareamento dos homólogos, sem alterações cromossômicas estruturais, apresentados pelas plântulas diplóides.

A alta qualidade das análises citométricas e das preparações citogenéticas foram determinantes para uma avaliação confiável e conclusiva em relação à estabilidade genética, principalmente em nível de ploidia, dos materiais advindos da ES. Em conclusão, visto que a CF caracteriza-se por ser uma técnica reproduzível, eficiente e rápida, esta apresenta grande potencial e viabilidade para seu emprego em escala comercial.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU IS, CARVALHO CR, CLARINDO WR. Chromosomal DNA content of sweet pepper determined by association of cytogenetic and cytometric tools. **Plant Cell Reports**, 27: 1227-1233, 2008.
- ALAN AR, ZENG H, ASSANI A, SHI WL, McRAE HE, MURCH SJ, SAXENA PK. Assessment of genetic stability of the germplasm lines of medicinal plant *Scutellaria baicalensis* Georgi (Huang-qin) in long-term *in vitro* maintained cultures. **Plant Cell Reports**, 26: 1345-1355, 2007.
- ALMEIDA EP, OLIVEIRA RP, DANTAS JLL. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agricola**, 58: 51-54, 2001.
- ALMEIDA EP, OLIVEIRA RP, DANTAS JLL. Protocolo para a embriogênese somática do mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35: 2017-2024, 2000.
- AL-ZAHIM MA, FORD-LLOYD BV, NEWBURY HJ. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. **Plant Cell Reports**, 18: 473-477, 1999.
- ASCENCIO-CABRAL A, GUTIÉRREZ-PULIDO H, RODRÍGUEZ-GARAY B, GUTIÉRREZ-MORA A. Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. **Scientia Horticulturae**, 118: 155-160, 2008.
- ASSANI A, BAKRY F, KERBELLEC F, HAÏCOUR R, WENZEL G, FOROUGH-WEHR B. Production of haploids from anther cultura of banana [*Musa balbisiana* (BB)]. **Plant Cell Reports**, 21: 511-516, 2003.
- BADILLO V. **Caricaceae, Segundo Esquema**. Publicada por la Asociación de Profesores, Alcance 43, Universidad Central de Venezuel, Maracay, 111 p., 1993.

- BAJPAI A, SINGH AK. Meiotic behavior of *Carica papaya* L.: spontaneous chromosome instability and elimination in important cvs. in North Indian Conditions. **Cytologia**, 71: 131-136, 2006.
- BELLETTI P, MARZACHÌ C, LANTERI S. Flow cytometric measurement of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution**, 209: 85-91, 1998.
- BENNICI A, ANDIZEI M, VENDRAMIN GG. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. **Plant Science**, 166: 221-227, 2004.
- BERTHOULY M, MICHAUX-FERRIERE NM. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 44: 169-176, 1996.
- BERTIN P, BOUHARMONT J. Use of somaclonal variation and in vitro selection for chilling tolerance improvement in rice. **Euphytica**, 96: 135-142, 1997.
- BHATTACHARYA J, KHUSPE SS, RENUKDAS NN, RAWAL SK. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo explant of papaya (*Carica papaya* L. cv. washington and honey dew). **Indian Journal of Experimental Biology**, 40: 624-627, 2002.
- BHATTACHARYA J, KHUSPE SS. *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulturae**, 91: 39-49, 2001.
- BRUTOVSKÁ R, ČELLÁROVÁ E, DOLEŽEL J. Cytogenetic variability of *in vitro* regenerated *Hypericum perforatum* L. plants and their seed progenies. **Plant Science**, 133: 221-229, 1998.
- CABRERA-PONCE JL, VEGAS-CARCIA A, HERRERA-ESTRELLA L. Regeneration of transgenic papaya plants via somatic embryogenesis induced by *Agrobacterium rhizogenes*. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, 32: 86-90, 1996.

- CARMO LST, JÚNIOR MTS. **Transformação genética de mamoeiros – 15 anos de sucesso**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / Documentos 100, 23 p., 2003.
- CASTILLO B, SMITH MAL, YADAVA UL. Liquid system scale up of *Carica papaya* L. somatic embryogenesis. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, 73: 307-311, 1998a.
- CASTILLO B, SMITH MAL, YADAVA UL. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. **Plant Cell Reports**, 17: 172-176, 1998b.
- CHANDRA A, PENTAL D. Regeneration and genetic transformation of grain legumes: an overview. **Current Science**, 84: 381-387, 2003.
- CHAVES-BEDOYA G, NUÑEZ V. A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. **Euphytica**, 153: 215-220, 2007.
- CHEN J, HENNY RJ, DEVANAND PS, CHAO CT. AFLP analysis of nephthytis (*Syngonium podophyllum* Schott) selected from somaclonal variants. **Plant Cell Reports**, 24: 743-749, 2006.
- CHEN MH, CHEN CC, WANG DN, CHEN FC. Somatic embryogenesis from immature embryos of *Carica papaya* x *Carica cauliflora* cultured *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, 69: 1913-1918, 1991.
- CHEN MH, CHEN CC. Plant regeneration from *Carica* protoplasts. **Plant Cell Reports**, 11: 404-407, 1992.
- CHEN MH, WANG PJ, MAEDA E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. **Plant Cell Reports**, 6: 348-351, 1987.
- CHEN MH. **Regeneration of plants from protoplasts of *Carica* species (papaya)**. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry 29 / Plant Protoplasts and Genetic Engineering V, YPS Bajaj (ed.), Ed. Springer-Verlag, pp. 52-60, 1994.

- CLARINDO WR, CARVALHO CR, ARAÚJO FS, ABREU IS, OTONI WC. Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 92: 207-214, 2008.
- de BRUIJNE E, de LANGHE E, van RIJCK R. Actions of hormones and embryoid formation in callus cultures of *Carica papaya*. **International Symposium Fytofarmacia en Fytiatrie**, 26: 637-645, 1974.
- de los SANTOS-BRIONES C, HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR SMT. Coffee biotechnology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18: 217-227, 2006.
- DO G, SEO B, KO J, LEE S, PAK J, KIM I, SONG S. Analysis of somaclonal variation through tissue culture and chromosomal localization of rDNA sites by fluorescent *in situ* hybridization in wild *Allium tuberosum* and a regenerated variant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 57: 113-119, 1999.
- DOLEŽEL J, BARTOŠ J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, 95: 99-110, 2005.
- DREW RA, McCOMB JA, CONSIDINE JA. Rhizogenesis and root growth of *Carica papaya* L. *in vitro* in relation to auxin sensitive phases and use of riboflavin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 33: 1-7, 1993.
- DREW RA, MILLER RM. Nutritional and cultural factors affecting rooting of papaya (*Carica papaya* L.) *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, 64: 767-773, 1989.
- DREW RA. **Micropropagation of *Carica papaya* and related species**. In: Micropropagation of Woody Trees and Fruits, SM Jain & K Ishii (eds.), Ed. Kluwer Academic Publishers, pp. 543-564, 2003.
- DREW RA. The effects of media composition and cultural conditions on *in vitro* root initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of Horticultural Science**, 62: 551-556, 1987.
- ENCHEVA J, KÖHLER H, FRIEDT W, TSVETKOVA F, IVANOV P, ENCHEVA V, SHINDROVA P. Field evaluation of somaclonal variation in

- sunflower (*Helianthus annuus* L.) and its application for crop improvement. **Euphytica**, 130: 167-175, 2003.
- ETIENNE H, BERTRAND B. Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. **Tree Physiology**, 23: 419-426, 2003.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization / World Health Organization of the United Nations). Faostat agriculture data. Roma, 2008. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2008.
- FARIA ARN, NORONHA ACS, OLIVEIRA AAR, OLIVEIRA AMG, CARDOSO CEL, RITZINGER CHSP, OLIVEIRA EJ, COELHO EF, FILHO HPS, CRUZ JL, OLIVEIRA JRP, DANTAS JLL, SOUZA LD, OLIVEIRA MA, FILHO MAC, SANCHES NF, FILHO PEM, MEDINA VM, COROLEIRO ZJM. **A cultura do mamão**. Coleção Plantar, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 3ª edição, 65, 119 p., 2009.
- FEHÉR A, PASTERNAK TP, DUDITS D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 74: 201-228, 2003.
- FERNANDO JA, MELO M, SOARES MKM, APPEZZATO-DA-GLÓRIA B. Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 44: 247-255, 2001.
- FITCH MMM, MANSHARDT RM. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Cell Reports**, 9: 320-324, 1990.
- FITCH MMM. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyls callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 32: 205-212, 1993.
- FOURRÉ JL, BERGER P, NIQUET L, ANDRÉ P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. **Theoretical and Applied Genetics**, 94: 159-169, 1997.

- FOURRÉ JL. **Somaclonal variation and genetic molecular markers in woody plants**. In: Molecular biology of woody plants, SM Jain, SC Minocha (eds.), Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 511 p., 2000.
- FROELICHER Y, BASSENE J, JEDIDI-NEJI E, DAMBIER D, MORILLON R, BERNARDINI G, CONSTANTINO G, OLLITRAUT P. Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets. **Plant Cell Reports**, 26: 937-944, 2007.
- FRUTISÉRIES 7 – MAMÃO. Ministério da Integração Social, Secretaria de Infra-estrutura Hídrica, Departamento de Projetos Especiais. Brasília, Novembro, 2000.
- GAHAN PB, GEORGE EF. Adventitious regeneration. In: Plant propagation by tissue culture, EF George, MA Hall, GJ de Klerk (eds.), Ed. Springer, Dordrecht, pp. 355-402, 2008.
- GALBRAITH DW, HARKINS KR, MADDUX JM, AYRES NM, SHARMA DP, FIROOZABADY E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, 220: 1049-1051, 1983.
- GAMBORG OL. Plant tissue culture, Biotechnology, Milestones. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, 38: 84-92, 2002.
- GANGOPADHYAY G, ROY SK, GHOSE K, PODDAR R, BANDYOPADHYAY T, BASU D, MUKHERJEE KK. Sex detection of *Carica papaya* and *Cycas circinalis* in pre-flowering stage by ISSR and RAPD. **Current Science**, 92: 524-526, 2007.
- GESTEIRA AS, OTONI WC, BARROS EG, MOREIRA MA. RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. **Plant Breeding**, 121: 269-271, 2002.
- GU XF, YANG AF, MENG H, ZHANG JR. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill. cv. Zhanhua. **Plant Cell Reports**, 24: 671-676, 2005.

- HENRY Y, MARCOTTE J, de BUYSER J. The effect of aneuploidy on plants regenerated from karyotype abnormalities in wheat short- and long-term somatic embryogenesis. **Plant Science**, 114: 101-109, 1996.
- HOMHUAN S, KIJWIJANA B, WANGSOMNUKA P, BODHIPADMAB K, LEUNG DWM. Variation of plants derived from indirect somatic embryogenesis in cotyledon explants of papaya. **Science Asia**, 34: 347-352, 2008.
- JACOBS JP, YODER JI. Ploidy levels in transgenic tomato plants determined by chloroplast number. **Plant Cell Reports**, 7: 662-664, 1989.
- JAIN SM, de KLERK G. Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, 4: 63-75, 1998.
- JAIN SM. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, 118: 153-166, 2001.
- JIN S, MUSHKE R, ZHU H, TU L, LIN Z, ZHANG Y, ZHANG X. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. **Plant Cell Reports**, 27: 1303-1316, 2008.
- JOACHIMIAK A, GRABOWSKA-JOACHIMIAK A. Stomatal cell length and ploidy level in four taxa belonging to the *Phleum* sect. *Phleum*. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, 42: 103-107, 2000.
- JORDAN M, VELOZO J. Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 44: 189-194, 1996.
- KARP A. **Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures**. In: Plant cell tissue culture, IK Vasil, TA Thorpe (eds.), Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 139-151, 1994.
- KOCHEVENKO AS, RATUSHNYAK YI, GLEBA YY. Protoplast culture and somaclonal variability of species of series *Junglandifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 44: 103-110, 1996.

- KOEHLER AD. **Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC, AVG e STS e de pulsos de 2,4-D.** Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Botânica, 72 p., (Dissertação M. Sc.), 2004.
- KUMAR LSS, ABRAHAM A. Chromosome number in *Carica*. **Current Science**, 11: 58, 1942.
- LAI C, YEH S, YANG J. Enhancement of papaya axillary shoot proliferation *in vitro* by controlling the available ethylene. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, 41: 203-212, 2000.
- LARKIN PJ, SCOWCROFT SC. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, 60: 197-214, 1981.
- LEAL F, LOUREIRO J, RODRIGUEZ E, PAIS MS, SANTOS C, PINTO-CARNIDE O. Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture. **Plant Cell Reports**, 25: 978-985, 2006.
- LEE J, ARUMUGANATHAN K, KAEPLER SM, PARK S, KIM K, CHUNG Y, KIM D, FUKUI K. Variability of chromosomal DNA contents in maize (*Zea mays* L.) inbred and hybrid lines. **Planta**, 215: 666-671, 2002.
- LIMA AS, RAMOS ALD, MARCELLINI OS, BATISTA RA, FARAONI AS. Adição de agentes antiescurecimento, antimicrobiano e utilização de diferentes filmes plásticos, em mamão minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 27: 149-152, 2005.
- LITZ RE, CONOVER RA. High-frequency somatic embryogenesis from *Carica* suspension cultures. **Annals of Botany**, 51: 683-686, 1983.
- LITZ RE. Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 111: 969-972, 1986.
- LIU Z, MOORE PH, HAO M, ACKERMAN CM, RAGIBA M, YU Q, PEARL HM, KIM MS, CHARLTON JW, STILES JI, ZEE FT, PATERSON AH,

- MING R. A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. **Nature**, 427: 348-352, 2004.
- LOTFI M, ALAN AR, HENNING MJ, JAHN MM, EARLE ED. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. **Plant Cell Reports**, 21: 1121-1128, 2003.
- LOUREIRO J, CAPELO A, BRITO G, RODRIGUEZ E, SILVA S, PINTO G, SANTOS C. Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry. **Biologia Plantarum**, 51: 7-14, 2007.
- LOUREIRO J, PINTO G, LOPES T, DOLEŽEL J, SANTOS C. Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. **Planta**, 221: 815-822, 2005.
- LOUREIRO J, SANTOS C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, 77: 18-29, 2004.
- MALIK M. Comparison of different liquid/solid culture systems in the production of somatic embryos from *Narcissus* L. ovary explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 94: 337-345, 2008.
- MANSHARDT RM, DREW RA. Biotechnology of papaya. **Acta Horticulturae / International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species Part 2**, 461: 65-73, 1998.
- MANSHARDT RM. **Papaya**. In: Biotechnology of perennial fruit crops, FA Hammerschlag & RE Litz (eds.), Ed. CAB International, Wallingford, pp. 576, 1992.
- MARIN SLD, GOMES JA. Morfologia e biologia floral do mamoeiro. **Informe agropecuário**, 134: 10-13, 1986.
- McCUISTION F, ELMSTROM GW. Identifying polyploids of various cucurbits by stomatal guard cell chloroplast number. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, 106: 155-157, 1993.

- MEDHI AA, HOGAN L. Tissue culture of *Carica papaya*. **HortScience**, 11: 311, 1976.
- MENÉNDES-YUFFÁ A, SILVA RF, RIOS L, ENRECH NX. Mitotic aberrations in coffee (*Coffea arabica* cv. 'Catimor') leaf explants and their derived embryogenic calli. **Electronic Journal of Biotechnology**, 3: 161-166, 2000.
- MICHALCZUK L, COOKE TJ, COHEN JD. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. **Phytochemistry**, 31: 1097-1103, 1992.
- MING R, YU Q, MOORE PH. Sex determination in papaya. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 18: 401-408, 2007.
- MISHRA MK. Stomatal characteristics at different ploidy levels in *Coffea* L. **Annals of Botany**, 80: 689-692, 1997.
- MONMARSON S, MICHAUX-FERRIERE N, TEISSON C. Production of high-frequency embryogenic calli from integuments of immature seeds of *Carica papaya* L. **Journal of Horticultural Science**, 70: 57-64, 1995.
- MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.
- MURASHIGE T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, 25: 135-166, 1974.
- PARASNIS AS, RAMAKRISHNA W, CHOWDARI KV, GUPTA VS, RANJEKAR PK. Microsatellite (GATA)_n reveals sex-specific differences in Papaya. **Theoretical and Applied Genetics**, 99: 1047-1052, 1999.
- PARC G, REMBUR J, RECH P, CHRQUI D. *In vitro* culture of tobacco callus on medium containing peptone and phytate leads to growth improvement and higher genetic stability. **Plant Cell Reports**, 26: 145-152, 2007.
- PASTERNAK TP, MISKOLCZI P, AYAYDIN F, MÉSZÁROS T, DUDITS D, FEHÉR A. Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs

- and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. **Plant Growth Regulation**, 32: 129-141, 2000.
- PASTERNAK TP, PRINSEN E, AYAYDIN F, MISKOLCZI P, POTTERS G, ASARD H, van ONCKELEN H, DUDITS D, FEHÉR A. The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Physiology**, 129: 1807-1819, 2002.
- PEREIRA CL. **Mamão, a fruta dos nossos quintais: ótima fonte de vitaminas e de renda para o produtor**. Coleção Brasil Agrícola, 1ª ed., Editora Ícone, São Paulo, 78 p., 1992.
- PHILLIPS RL, KAEPLER SM, OLHOFT P. Genetic instability of plant tissue culture: breakdown of normal controls. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 91: 5222-5226, 1994.
- PINHEIRO AA, POZZOBON MT, do VALLE CB, PENTEADO MIO, CARNEIRO VTC. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicines. **Plant Cell Reports**, 19: 274-278, 2000.
- POLANCO C, RUIZ ML. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. **Plant Science**, 162: 817-824, 2002.
- PONTAROLI AC, CAMADRO EL. Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term callus cultures. **Genetics and Molecular Biology**, 28: 423-430, 2005.
- PRAÇA MM, CARVALHO CR, CLARINDO WR. A practical and reliable procedure for in vitro induction of tetraploid tomato. **Scientia Horticulturae**, 122: 501-505, 2009.
- RABELLO WS, SCHMILDT ER, AMARAL JAT, SCHMILDT O. Enraizamento *in vitro* de ramos de mamoeiro 'Tainung 01' cultivados sob luz e escuro/luz. **Papaya Brasil**, 301-304, 2007.

- RAJEEVAN MS, PANDEY RM. Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya* L.) for clonal propagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 6:181-188, 1986.
- RAKOCZY-TROJANOWSKA M. The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits. **Cellular and Molecular Biology Letters**, 7: 1111-1120, 2002.
- RENAU-MORATA B, NEBAUER SG, ARRILLAGA I, SEGURA J. Assessments of somaclonal variation in micropropagated shoots of *Cedrus*: consequences of axillary bud breaking. **Tree Genetics and Genomics**, 1: 3-10, 2005.
- RENUKDAS N, MOHAN ML, KHUSPE SS, RAWAL SK. Influence of boron on somatic embryogenesis in papaya. **Biologia Plantarum**, 47: 129-132, 2003.
- RIMBERIA FK, ADANIYA S, ETOH T, ISHIMINE Y. Sex and ploidy of anther culture derived papaya (*Carica papaya* L.) plants. **Euphytica**, 149: 53-59, 2006.
- RIMBERIA FK, SUNAGAWA, URASAKI N, ISHIMINE Y, ADANIYA S. Embryo induction via anther culture in papaya and sex analysis of the derived plantlets. **Scientia Horticulturae**, 103: 199-208, 2005.
- ROKKA V, ISHIMARU CA, LAPITAN NLV, PEHU E. Production of androgenic dihaploid lines of the disomic tetraploid potato species *Solanum acaule* ssp. *acaule*. **Plant Cell Reports**, 18: 89-93, 1998.
- ROUX N, TOLOZA A, RADECKI Z, ZAPATA-ARIAS FJ, DOLEŽEL J. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. **Plant Cell Reports**, 21: 483-490, 2003.
- SAKER MM, BEKHEET SA, TAHA HS, REDA AA. *In vitro* propagation of papaya (*Carica papaya* L.). **Arab Journal of Biotechnology**, 2: 235-244, 1999.

- SCHMILDT ER, AMARAL JAT, SCHMILDT O. Sucrose on *in vitro* rooting phase of papaya tree 'Tainung 01'. **Scientia Agraria**, 8: 25-31, 2007.
- SEAG (Secretaria da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca). Disponível em: <http://www.seag.es.gov.br>. Acesso em: 29 de dezembro de 2007 e 28 de outubro de 2009.
- SHOLI NJY, CHAURASIA A, AGRAWAL A, SARIN NB. ABA enhances plant regeneration of somatic embryos derived from cell suspension cultures of plantain cv. Spambia (*Musa* sp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 99: 133-140, 2009.
- SKIRVIN RM, COYNER M, NORTON MA, MOTOIKE S, GORVIN D. Somaclonal variation: do we know what causes it? **AgBiotechNet**, 2: 1-4, 2000.
- SMÝKAL P, VALLEDOR L, RODRÍGUEZ R, GRIGA M. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Cell Reports**, 26: 1985-1998, 2007.
- STOREY WB. Genetics of the papaya. **Journal of Heredity**, 44: 70-78, 1953.
- STOREY WB. The botany and sex relations of the papaya. **Hawaii Agricultural Experiment Station Bulletin**, 87: 5-22, 1941.
- THIEM B, SLIWINSKA E. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) *in vitro* cultures. **Plant Science**, 164: 129-134, 2003.
- TORRES AC, CALDAS LS, BUSO JA. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 509 p., 1998.
- TREMBLAY L, LEVASSEUR C, TREMBLAY FM. Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. **American Journal of Botany**, 86: 1373-1381, 1999.

- URASAKI N, TOKUMOTO M, TARORA K, BAN Y, KAYANO T, TANAKA H, OKU H, CHINEN I, TERAUCHI R. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 104: 281-285, 2002.
- van BOXTEL J, BERTHOULY M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 44: 7-17, 1996.
- VIANNA GR. **Micropropagação do mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizando ápices caulinares de plantas adultas**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia, 66 p., (Dissertação M. Sc.), 1996.
- von ADERKAS P, ROHR R, SUNDBERG B, GUTMANN M, DUMONT-BÉBOUX N, LELU M. Absciscic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 69: 111-120, 2002.
- von ARNOLD S, SABALA I, BOZHKO V P, DYACHOK J, FILONOVA L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 69: 233-249, 2002.
- YANG J, YE C. Plant regeneration from petioles of *in vitro* regenerated papaya (*Carica papaya* L.) shoots. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, 33: 375-381, 1992.
- YANG J, YU T, CHENG Y, YEH S. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of petioles of *in vitro* propagated multishoots. **Plant Cell Reports**, 15: 459-464, 1996.
- YANG JL, SEONG ES, KIM MJ, GHIMIRE BK, KANG WH, YU CY, LI CH. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 100: 49-58, 2010.

- YIE S, LIAW SI. Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. *In Vitro*, 13: 564-568, 1977.
- YU Q, HOU S, FELTUS FA, JONES MR, MURRAY JE, VEATCH O, LEMKE C, SAW JH, MOORE RC, THIMMAPURAM J, LIU L, MOORE PH, ALAM M, JIANG J, PATERSON AH, MING R. Low X/Y divergence in four pairs of papaya sex-linked genes. **The Plant Journal**, 53: 124-132, 2008.
- YU T, YEH S, CHENG Y, YANG J. Efficient rooting for establishment of papaya plantlets by micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 61: 29-35, 2000.
- YU T, YEH S, YANG J. Comparison of the effects of kanamycin and geneticin on regeneration of papaya from root tissue. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 74: 169-178, 2003.