

Avaliação da descontaminação, germinação e respostas morfogênicas do mamão cultivado *in vitro* (*Carica papaya* L.)¹

Evaluation of decontamination, germination and morphogenetic responses of papaya cultivated *in vitro* (*Carica papaya* L.)

Neiliane Santiago Sombra Borges², Abdellatif K. Benbadis³, Claudia Araújo Marco⁴
e José Nelson Santiago Sombra⁵

Resumo - A cultura de tecidos tem auxiliado bastante no melhoramento genético e na propagação de materiais resistentes a pragas e doenças. Com o objetivo de estudar a descontaminação, germinação e as respostas morfogênicas induzidas em explantes de mamoeiro (*Carica papaya* L.) por diferentes reguladores vegetais, dois experimentos foram conduzidos em laboratório, utilizando como fonte de explante, plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro*. No primeiro experimento avaliaram-se tratamentos para reduzir a contaminação por fungos e bactérias nas sementes. No segundo experimento, avaliou-se a germinação de sementes e embriões em meios de cultura suplementados com diferentes reguladores vegetais (NAA, BAP e TDZ) na concentração de 1 µM. Posteriormente, observaram-se as respostas morfogênicas *in vitro* de diferentes fontes de explante (sementes intactas e embriões imaturos) pelos reguladores vegetais. Os resultados obtidos permitiram verificar que a escarificação mecânica das sementes, seguido de imersão por dez minutos em ácido sulfúrico (H₂SO₄), depois mais dez minutos em álcool (70%) acrescido de 23 gotas de Tween 80, seguido da imersão por 20 minutos em hipoclorito de cálcio (CaOCl) a 20%, lavadas cinco vezes em água estéril e armazenadas durante 19 dias em freezer, proporcionou a menor percentagem de contaminação das sementes. Os melhores resultados para germinação e respostas morfogênicas dos explantes foram alcançadas com os embriões cultivados em meio de cultura suplementado com thidiazuron (TDZ), obtendo como respostas, calos friáveis em grandes quantidades e vários brotos regenerados de tamanhos pequenos e incontáveis.

Termos para indexação: *Carica papaya* L., reguladores vegetais, cultura de tecidos.

Abstract - The tissue culture has assisted enough in genetic improvement and propagation of materials that offered resistance to pest and disease. This work aimed to study the decontamination, germination and types of morphogenetic responses induced in different explants of papaya (*Carica papaya* L.) by different plant regulators. Two experiments were led in laboratory, using as source of explant: seedlings from *in vitro* germination. The first experiment evaluated different treatments to reduce the contamination by fungus and bacteria. The second one evaluated the germination of seeds and embryos in culture environment supplemented with different plant regulators (NAA, BAP and TDZ) at 1 µM. Later it was observed the behavior and the morphogenetic responses of different explants (intact seeds and immature embryos) by plant regulators. The results indicated that the scarification of seeds, then ten minutes in immersion in H₂SO₄, ten minutes in alcohol 70% with 23 beads of Tween 80, 20 minutes in CaOCl 20% and five times in sterile water during 19 days in freezer, presented the lowest percentage of seeds contamination. The best results for germination were obtained with embryos in culture environment supplemented with TDZ. It was observed friable calluses in large quantity and regenerated microshoots countless.

Index terms: *Carica papaya* L., plant regulators, tissue culture.

¹ Recebido para publicação em 09/03/2004; aprovado em 06/06/2006

Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor apresentada ao Dep. de Fitotecnia do CCA/UFC, CE

² Aluna de doutorado da UFC em Fitotecnia, bolsista da FUNCAP, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Caixa Postal 12.168, CEP: 60.455-970, Fortaleza, CE, e-mail: nssborges@bol.com.br

³ Biologia, D. Sc., Prof. visitante da UFC, Dep. de Fitotecnia, e-mail: imunguba@ufc.com.br

⁴ Eng. Agrônoma, D. Sc., Prof. substituta do Dep. de Fitotecnia, CCA/UFC, e-mail: clmarco@terra.com.br

⁵ Aluno de graduação em Agronomia da UFC, nelsonsombra@yahoo.com.br

Introdução

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) pode ser propagado por meio de sementes, estacas e enxertia. A utilização de sementes é o método mais utilizado, embora apresentem plantios desuniformes, devido a presença de dormência nas sementes e aparecimento de plantas susceptíveis à doenças. Essas características, citadas anteriormente, limitam bastante o desenvolvimento do mamoeiro (Borges, 2002).

Dentre os fatores responsáveis pela dormência podemos citar a presença de embrião imaturo, presença de inibidores em diferentes regiões da semente, tegumento impermeável à água e a gases e tegumento, conferindo resistência física ao desenvolvimento do embrião (Bewley & Black, 1994; Hilhorst, 1995); a causa mais comum é a impermeabilidade do tegumento à água (Antônio et al., 1985). Alguns métodos são utilizados para estimular a germinação das sementes, dentre eles, a escarificação ácida, escarificação mecânica, resfriamento rápido, uso de alguns químicos como GA_3 e KNO_3 (Castro et al., 1999), dentre outros.

Quanto aos métodos comerciais de multiplicação vegetativa do mamoeiro, existe uma carência muito grande para atender a demanda dos produtores. Além das técnicas convencionais do melhoramento genético do mamoeiro, a engenharia genética tem dado ênfase à procura de materiais resistentes a vírus, principalmente o PRSV (vírus da mancha-anelar), que causa sérios prejuízos ao produtor (Borges, 2002).

Nesse contexto, a cultura de tecidos tem sido uma técnica auxiliar valiosa para a clonagem de genótipos superiores e para acelerar os programas de melhoramento genético; Sugere-se, inclusive, que sejam utilizadas outras metodologias adaptadas aos cultivares exploradas no Nordeste brasileiro, que têm comportamento diferenciado de cultivares de outras regiões, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Dentro da cultura de tecidos, vários protocolos foram desenvolvidos para a produção de embriões somáticos em alta frequência, a partir de diferentes tipos de explantes de mamoeiro: tegumentos de sementes imaturas (Monmarson et al., 1995), raízes (Cabrera-Ponce et al., 1996), hipocótilos (Fitch, 1993), embriões zigóticos imaturos (Cai et al., 1999; Bhattacharya et al., 2002) e óvulos (Tokumoto et al., 2000).

Os tecidos em cultura *in vitro* necessitam da presença de reguladores vegetais. A natureza dos hormônios e as combinações dependem do padrão de desenvolvimento de explante (Torres et al., 1998). Segundo Bhattacharya e Khuspe (2001), a condição de germinação *in vitro* de sementes de várias cultivares de mamão, proporcionou resultados satisfatórios quando se utilizou o thidiazuron (TDZ) no meio de cultivo.

O potencial organogenético ou embriogenético é grandemente relacionado ao tipo de explante, a seu estágio de desenvolvimento e às suas reações no meio de cultura. Por isso, a escolha do explante apropriado é de grande importância, além do regulador vegetal utilizado no meio (Borges, 2002).

Portanto, os objetivos do trabalho foram estudar a descontaminação, a germinação e os tipos de respostas morfogenéticas induzidas em explantes de mamoeiro por diferentes reguladores vegetais.

Material e Métodos

A pesquisa foi efetuada de abril a agosto de 2002, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza-CE, Brasil.

O material utilizado como fonte de explante para o estudo de respostas morfogenéticas de mamoeiro foi obtido a partir de plântulas oriundas de sementes germinadas assepticamente *in vitro*. As sementes de mamão utilizadas neste experimento foram da variedade Havaí, comercializadas na região. Para os testes de germinação utilizaram-se sementes e embriões imaturos.

Experimento I: Efeito de tratamentos de descontaminação nas sementes de mamoeiro (*Carica papaya* L.)

Antes da aplicação dos tratamentos, as sementes foram lavadas em água corrente por dez minutos e retiradas as suas mucilagens. Após a remoção completa da mucilagem, as sementes foram novamente lavadas com detergente comercial por cinco minutos e, em seguida, foram imersas em hipoclorito de sódio a 2% (v/v) por um minuto e enxaguadas em água corrente. As sementes foram submetidas a cinco tratamentos de descontaminação realizadas dentro da câmara de fluxo laminar. Abaixo estão relacionados os tratamentos de descontaminação (D):

T₁ - cortes laterais na casca da semente + 16 horas de embebição em água + 5 minutos em álcool (70%) + 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% + 3 vezes lavadas em água estéril;

T₂ - sem cortes na casca da semente + 16 horas de embebição em água + 8 minutos em álcool (70%) + 20 gotas de Tween 80 + 25 minutos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% + 3 vezes lavadas em água estéril;

T₃ - escarificação mecânica + 10 minutos de imersão em ácido sulfúrico (1%) + 16 horas de embebição em água + 10 minutos em álcool (70%) + 23 gotas de Tween 80 + 20 minutos em solução de hipoclorito de cálcio (CaOCl) a 20% + 5 vezes lavadas em água estéril;

T₄ - escarificação mecânica + 10 minutos de imersão em ácido sulfúrico (1%) + 16 horas de embebição em água + 10 minutos em álcool (70%) + 23 gotas de Tween 80 + 20 minutos em solução de hipoclorito de cálcio (CaOCl) a 20% + 5 vezes lavadas em água estéril + armazenamento por 6 dias em freezer;

T₅ - escarificação mecânica + 10 minutos de imersão em ácido sulfúrico (1%) + 16 horas de embebição em água + 10 minutos em álcool (70%) + 23 gotas de Tween 80 + 20 minutos em solução de hipoclorito de cálcio (CaOCl) a 20% + 5 vezes lavadas em água estéril + armazenamento por 19 dias em freezer.

Após a descontaminação, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), solidificado com 0,4% (p/v) de ágar e suplementado com 10 µM de thidiazuron (TDZ). O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e, em seguida, submetido à esterilização em autoclave com pressão de 1,5 atm e temperatura de 120° C por 15 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por um período de sete dias, visando diminuir a oxidação fenólica. Aos sete dias de cultivo, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade de 2.500 lux. As culturas foram avaliadas semanalmente, durante os primeiros 15 dias de cultivo quanto à percentagem de contaminação (%C).

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e três repetições. Cada unidade experimental foi constituída de uma placa de Petri, contendo cinco sementes. Os dados referentes à contaminação total foram submetidos à análise de variância (teste F) e a comparação de médias pelo teste Tukey a 1% de probabilidade. Os dados obtidos em percentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de $x/100$, onde x é o percentual obtido.

Experimento II: Avaliação da germinação e respostas morfológicas *in vitro* de mamoeiro (*Carica papaya* L.)

Para descontaminação das sementes utilizou-se o tratamento cinco (escarificação mecânica + 10 minutos de imersão em ácido sulfúrico (1%) + 16 horas de embebição em água + 10 minutos em álcool (70%) + 23 gotas de Tween 80 + 20 minutos em solução de CaOCl (20%) + 5 vezes lavadas em água estéril + armazenamento por 19 dias em freezer) do experimento anterior. Após a descontaminação, prepararam-se os explantes em câmara de fluxo laminar, com a ajuda de bisturi, fazendo cortes verticais na sarcotesta para a retirada do embrião imaturo. Após a excisão asséptica do embrião, o mesmo foi colocado para germinar em placas

de Petri contendo 10 mL de meio de cultura. Como explantes, utilizou-se sementes intactas e embriões imaturos.

O meio de cultura utilizado nas placas de Petri para a germinação foi o MS, solidificado com 0,4% (p/v) de ágar. Foram acrescentados ao meio de cultura os tratamentos com os reguladores vegetais NAA (ácido naftalenoacético), BAP (benzilaminopurina) e TDZ (thidiazuron) na concentração de 1 µM.

O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e, em seguida, submetido à esterilização em autoclave com pressão de 1,5 atm e temperatura de 120° C por 15 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade de 2.500 lux. Após a germinação dos explantes, os mesmos foram transferidos para tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS, solidificado com 0,4% (p/v) de ágar e suplementado com 8,87 µM de BAP para o desenvolvimento das plântulas.

As avaliações foram feitas semanalmente até os 90 dias de cultivo e as variáveis observadas foram: percentagem de germinação, rendimento de explantes com calos friáveis e rendimento de explantes com brotos incontáveis.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 (2 explantes e 3 reguladores vegetais e sem regulador vegetal) e três repetições. Cada unidade experimental foi constituída de uma placa de Petri contendo cinco explantes.

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (teste F) e a comparação de médias pelo teste Tukey a 1% de probabilidade. Os dados obtidos em percentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de $x/100$, onde x é o percentual obtido.

Resultados e Discussão

Experimento I: Efeito de tratamentos de descontaminação nas sementes de mamoeiro (*Carica papaya* L.)

Verifica-se na Tabela 1 que houve diferença entre os cinco tratamentos de descontaminação pelo teste Tukey a 1%. O tratamento 5 proporcionou a menor taxa de contaminação (20,7%). Portanto, este tratamento foi selecionado para a descontaminação do experimento seguinte.

As altas taxas de contaminação observadas nos tratamentos 1 e 2 resultaram em parte da dificuldade de desinfestar as sementes devido à presença da sarcotesta. Já nos tratamentos 3, 4 e 5, a escarificação mecânica, juntamente com a imersão em ácido sulfúrico das sementes,

Tabela 1 - Percentagem de contaminação (C) de *Carica papaya* L., aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 10 µM de thidiazuron. Fortaleza-CE, Brasil, 2002.

Tratamentos	C (%)
T ₁ (cortes laterais na casca da semente+16h embebição em água +5 minutos álcool 70% + 20 minutos NaOCl 2 % +3x lavadas água estéril)	100,0 a
T ₂ (sem cortes na casca da semente+16h embebição em água +8 minutos álcool 70% + 20gts Tween 80+25 minutos NaOCl 2 % +3x água estéril)	73,3 b
T ₃ (escarificação mecânica +10 minutos imersão ác. sulfúrico (1%)+16h embebição em água + 10 água+10 min água + 10 minutos álcool 70%+23gts Tween 80+20 minutos CaOCl 20%+5x água estéril)	50,0 c
T ₄ (escarificação mecânica +10 minutos imersão ác. sulfúrico (1%)+16h embebição + 10 min. minutos álcool 70%+23gts Tween 80+20 minutos CaOCl 20%+5x água estéril)	50,0 c
T ₄ (escarificação mecânica +10 minutos imersão ác. sulfúrico (1%)+16h embebição em água + 10 minutos álcool 70%+23gts Tween 80+20 minutos CaOCl 20%+5x água estéril+armazenamento estéril + armazenamento por 6 dias em freezer).	46,6 c
T ₅ (escarificação mecânica +10 minutos imersão ác. sulfúrico (1%)+16h embebição em min. em água + 10 minutos álcool 70%+23gts Tween 80+20 minutos CaOCl 20%+5x água estéril + armazenamento por 19 dias em freezer).	20,7 d
D.M.S (1%)	5,7
CV (%)	3,0

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 1% pelo teste Tukey.

retirou a sarcotesta, facilitando a desinfestação das mesmas. Vale ressaltar que a substituição do hipoclorito de sódio por hipoclorito de cálcio, favoreceu os explantes na descontaminação e obteve menor oxidação dos mesmos. Grattapaglia e Machado (1998), afirmam que o hipoclorito de cálcio tem a vantagem de ser menos tóxico aos tecidos do que o hipoclorito de sódio.

Experimento II: Avaliação da germinação e respostas morfogênicas *in vitro* do mamoeiro (*Carica papaya* L.).

Na Tabela 2, pode-se observar que na interação entre os fatores explante e regulador vegetal, a percentagem de germinação das sementes em NAA não diferiu estatisticamente da testemunha e dos demais reguladores vegetais, cujas percentagens de germinação foram nulas. Para os embriões, todos os reguladores vegetais diferiram da testemunha, sendo que a maior percentagem de germinação obtida foi de 73,8% para o embrião combinado com TDZ, embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os reguladores vegetais. Este resultado foi similar ao percentual de germinação (77%) obtido por Bhattacharya e Kluspe (2001), em embriões intactos de mamão cultivados em meio MS com TDZ.

Observa-se também na Tabela 2, que para a variável calos friáveis, as sementes só apresentaram respostas morfogênicas na presença de TDZ (3,5) e os embriões apresentaram nesta mesma citocinina a maior média de explantes com calos friáveis (13,0), diferindo dos demais

reguladores vegetais, pois o TDZ é uma potente citocinina que tem efeito na divisão celular em cultivo *in vitro*. Portanto, os explantes que obtiveram melhores respostas quanto a calos friáveis foram os embriões na presença de TDZ.

Conforme Guerra et al. (1999), o estágio fisiológico do explante é um fator importante e está relacionado com o número de receptores das células responsivas para os reguladores vegetais presentes no meio de cultura. Conforme relatos de Hu e Ferreira (1998), embriões excisados no estágio maduro ou próximo a este, são quase autotróficos e, em geral, dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação de fonte de energia e os reguladores vegetais tornam-se dispensáveis. Entretanto, no presente estudo, ficou claro que é indispensável a utilização de reguladores vegetais no meio de cultura, principalmente porque os embriões utilizados são imaturos.

De modo geral, a iniciação de calos é estimulada apenas pela presença de auxina no meio de cultura. Entretanto, conforme relatado por Yeoman (1970), o crescimento de calos em diferentes espécies pode ser independente de auxina e citocinina, dependente de auxina, dependente de citocinina ou dependente de ambas.

Dentre os fatores limitantes às respostas morfogênicas destacam-se o tipo e o estágio fisiológico do explante. Conforme Tisserat (1984), as palmeiras parecem seguir o mesmo comportamento normalmente verificado para monocotiledôneas, onde a iniciação e o crescimento de calos ocorrem a partir de tecidos e órgãos derivados de

Tabela 2 - Percentagem de germinação, explantes com calos friáveis e explantes com brotos incontáveis de *Carica papaya* L., observados aos 90 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes reguladores vegetais (NAA, BAP e TDZ) e diferentes explantes (semente e embrião). Fortaleza-CE, Brasil, 2002.

Tratamentos	Germinação		Calos friáveis		Brotos incontáveis	
	sementes	embriões	sementes	embriões	sementes	embriões
testemunha	0,0 a A	0,0 bA	0,0 b A	1,5 c A	0,0 a A	0,0 c A
NAA	5,1 a B	32,3 a A	0,0 b A	0,0 c A	0,0 a A	0,0 c A
BAP	0,0 a B	60,6 a A	0,0 b B	6,5 b A	0,0 a B	5,0 b A
TDZ	0,0 a B	73,8 a A	3,5 a B	13,0 a A	1,5 a B	13,5 a A
DMS 1%	32,0	32,0	3,7	3,7	4,5	4,5
DMS 5%	31,9	31,9	3,5	3,5	4,3	4,3
CV (%)	53,9	53,9	35,6	35,6	55,2	55,2

Médias seguidas por letras distintas minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas diferem entre si ao nível de 1% (linhas) e a 5% (colunas) pelo teste Tukey.

regiões com alta atividade meristemática. Reynolds e Murashige (1979) afirmam que a maioria dos trabalhos com respostas positivas em palmeiras foram obtidos a partir de tecidos embrionários.

Segundo Lu (1993), em algumas espécies, o TDZ estimula a divisão celular e, conseqüentemente, o crescimento de calos dependentes de citocininas. Mok et al. (1987), relatam que o efeito do TDZ *in vitro* pode ser devido a sua atuação direta no sítio de ação das citocininas ou a sua influência na biossíntese e metabolismo das citocininas endógenas. Entretanto, algumas evidências sugerem que o TDZ pode ter atividade auxínica ou estar envolvido no metabolismo das auxinas (Lu, 1993).

Ainda na Tabela 2, encontram-se as médias de rendimento de explantes com brotos incontáveis na interação explante e reguladores vegetais. Nas sementes, os brotos só destacaram-se na presença do TDZ (1,50-) e nos embriões, a maior média (13,50) foi também na presença de TDZ, superando a média da semente (1,50). Portanto, verifica-se que as melhores respostas morfológicas para brotos incontáveis foram com os embriões na presença do TDZ. Carvalho et al. (2000), obtiveram o maior número médio de brotos em *Phaseolus vulgaris* L. cv. Carioca em meio de cultura suplementado com TDZ.

Huetteman e Preece (1993), relataram que a formação de gemas unidas tem sido reportada em outras espécies de plantas associadas com o uso do TDZ. Conforme Ibrahim e Debergh (2001), experimentos preliminares indicaram claramente que o TDZ teve efeito mais significativo na indução de formação de gemas adventícias de rosas do que o BAP e a zeatina.

A atividade da citocinina, TDZ, tem sido demonstrada como comparáveis ou superiores as citocininas com base purínica (Thomas e Katterman, 1986). Desde então, o TDZ

tem sido usado com sucesso em muitos protocolos de cultura de tecidos de diferentes leguminosas conhecidas por serem um tanto recalcitrantes no processo de regeneração *in vitro*, em ervilhas e lentilhas (Malik e Saxena, 1992); em amendoim (Gill e Saxena, 1992) e em feijão comum (Mohamed et al., 1992). Entretanto, o mecanismo pelo qual o TDZ induz respostas morfológicas equivalentes às citocininas purínicas ainda não é completamente entendido (Carvalho et al., 2000).

Conclusões

1. A menor percentagem de contaminação é alcançada utilizando-se o tratamento cinco (escarificação mecânica + 10 minutos de imersão em ácido sulfúrico (1%) + 16 horas de embebição em água + 10 minutos em álcool (70%) + 23 gotas de Tween 80 + 20 minutos em solução de CaOCl (20%) + 5 vezes lavadas em água estéril + armazenamento por 19 dias em freezer);
2. As melhores percentagens de germinação obtêm-se no explante embrião na presença de 1 µM de TDZ; e
3. As melhores respostas morfológicas de rendimento de explantes com calos friáveis e rendimento de explantes com brotos incontáveis ocorrem no explante embrião na presença de 1 µM de TDZ.

Referências Bibliográficas

- ANTÔNIO, F. G.; PENTEADO, M. I.; SEIFFERT, N. F. *Recomendações para quebra de dormência em sementes de Galactia spp.* Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, n. 29, p. 1-6. 1985.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. *Seeds: Physiology of development and germination.* 2º ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

- BHATTACHARYA, J.; KHUSPE, S. S. *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulturae**, v.91, n.1/2, p.39-49, 2001.
- BHATTACHARYA, J.; KHUSPE, S. S.; RENUK DAS, N. N.; RAWAL, S. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo explant of papaya (*Carica papaya* L. cv. washington and honey dew). **Indian Journal of Experimental Biology**, v.40, n.5, p.624-627, 2002.
- BORGES, N. S. S. **Respostas morfo genéticas em tomateiro e mamoeiro cultivados *in vitro***. 2002. 68 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- CABRERA-PONCE, J. L.; VEGAS-GARCIA, A.; HERRERE-ESTRELLA, L. Regeneration of transgenic papaya plants via somatic embryogenesis induced by *Agrobacterium rhizogenes*. **In vitro Cellular and Development Biology – Plant**, v.32, n.2, p.86-90, 1996.
- CAI, W.; GONSALVES, C.; TENNANT, P.; FERMIN, G.; SOUZA JR., M. T.; SARINDU, N.; JAN, F. J.; ZHU, H. Y.; GONSALVES, D. A Protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.35, n.1, p.61-69, 1999.
- CARVALHO, M. H. C. de.; VAN LE, B.; ZUILY-FODIL, Y.; THI, P. T. A.; VAN, T. T. K. 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, 2000.
- CASTRO, E.M.; ALVARENGA, A. A.; ALMEIDA, L.P.; GAVILANES, M.L.; PEREIRA, P.A. Influência do ácido giberélico e do nitrato de potássio na germinação de *Guarea guidonea* (L.) Sleumer. **Revista Árvore**, Viçosa, v.23, n.2, p.255-258, 1999.
- FITCH, M. M. M. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyls callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.205-212, 1993.
- GILL, R.; SAXENA, P. K. Direct somatic embryogenesis and regeneration of plants from seedlings explants of peanut (*Arachis hypogaea*): promotive role of thidiazuron. **Can. Journal Botanic**, v.70, p.1186-1192, 1992.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPQ, 1998, v.1, p.183-260.
- GUERRA, M. P. ; TEIXEIRA, J. B. . Embriogênese Somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, 1999, v.2, p.533-568.
- HILHORST, H. W. M. A critical update on seed dormancy. 1. Primary dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, n.1, p. 61-73, Mar. 1995.
- HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPQ, 1998, v.1, p.371-393.
- HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, p.105-119, 1993.
- IBRAHIM, R.; DEBERGH, P. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). **Scientia Horticulturae**, v.88, p.41-57, 2001.
- LU, C. Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In vitro Cell Development Biology**, v.29, p.92-96, 1993.
- MALIK, K. A.; SAXENA, P. K. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: high frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6-benzylaminopurine and thidiazuron. **Planta**, v.186, p.384-389, 1992.
- MOHAMED, F. M.; READ, P. E.; COYNE, D. P. Dark preconditioning, CCPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba bean. **Journal American Soc. Horticulture Science**, v.117, n.4, p.668-672, 1992.
- MOK, M. C.; MOK, D. W. S.; TURNER, J. E. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, v.22, p.1194-1197, 1987.
- MONMARSON, S.; MICCHAUX-FERRIERE, N.; TEISSON, C. Production of high-frequency embryogenic calli from integuments of immature seeds of *Carica papaya* L. **Journal of Horticultural Science**, France, v.70, n.1, p.57-64, 1995.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- REYNOLDS, J. F.; MURASHIGE, T. Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. **In vitro**, v.15, p.383-387, 1979.
- THOMAS, J. C.; KATTERMAN, F. R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiology**, v.81, p.681-683, 1986.
- TISSERAT, B. Date palm. In: SHARP, W. R. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: crops species**. New York: Macmillan, 1984. v.2, p.505-545.
- TOKUMOTO, M.; KAYANO, T.; OKU, H.; IWASAKI, H.; CHINEN, I. Adventitious embryogenesis and plantlet regeneration from ovules of unpollinated ovaries of papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Japan, v.69, n.2, p.195-201, 2000.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. 1998. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. EMBRAPA. 509p.
- YEOMAN, M. M. Early development in callus cultures. **Introduction Revist Cytologic**, v.29, p.383-409, 1970.