

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA E PERFIL DE
CARBOIDRATOS E POLIAMINAS ENDOGENAS DURANTE A
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Carica papaya* L. 'Golden'

NADIA BOTINI

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2020

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA E PERFIL DE
CARBOIDRATOS E POLIAMINAS ENDOGENAS DURANTE A
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Carica papaya* L. 'Golden'

NADIA BOTINI

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Silveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

B749

Botini, Nadia.

Análise proteômica comparativa e perfil de carboidratos e poliaminas endógenas durante a embriogênese somática em *Carica papaya* L. Cv. Golden / Nadia Botini. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

107 f. : il.

Bibliografia: 73 - 94.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.
Orientador: Vanildo Silveira.

1. Embriogênese somática. 2. *Carica papaya* L.. 3. Proteômica. 4. Poliaminas. 5. Carboidratos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

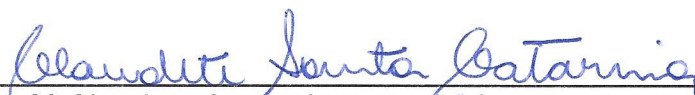
ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA E PERFIL DE
CARBOIDRATOS E POLIAMINAS DURANTE A EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA EM *Carica papaya* L. 'Golden'

NADIA BOTINI

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020.

Comissão Examinadora:



Prof.^a Claudete Santa-Catarina (D.Sc., Biotecnologia) - UENF



Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF



Prof.^a Leila do Nascimento Vieira (D.Sc., Ciências) - UFPR



Prof. Vanildo Silveira (D.Sc., Biotecnologia) - UENF
(Orientador)

DEDICATÓRIA

À minha avó Maria pelo amor e carinho (*in memoriam*).

Aos meus pais, Anair e Edson e meus irmãos que nos momentos de minha ausência dedicados aos estudos, sempre me fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

A minha tia Arlete e minha prima Mariane por todo carinho.

Dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradecer é um privilégio. Afinal se agradecemos é porque vivemos bons momentos e aquilo por que passamos valeu a pena e nos fez crescer. Dessa forma, deixo aqui meus sinceros agradecimentos:

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro/UENF, pela oportunidade de realização deste trabalho e por oferecer um ensino público, gratuito e de qualidade.

À FAPERJ pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vanildo Silveira, pela confiança em mim depositada ao longo desses anos, pela orientação, dedicação e ensinamentos que me enriqueceram como profissional e como pessoa. Meu respeito e gratidão!

À Prof^a Dra. Claudete Santa Catarina, pela colaboração, pela paciência, pelos ensinamentos, pela amizade. Meu respeito e gratidão.

A todos os amigos, docentes e técnicos do LBT, LBCT e Bioint, pelo companheirismo e pela parceria no dia a dia de trabalho nos laboratórios.

Aos amigos da pós-graduação, pela convivência, pela amizade, confraternizações, por compartilhar que o conhecimento vai muito além dos livros e que não existe conceito que supere a ética.

Aos amigos que fiz em Campos, pelos momentos divertidos e bem vividos, pelo conforto nos momentos difíceis, sem vocês a caminhada seria árdua.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	x
1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Aspectos gerais da cultura de <i>C. papaya</i>	4
3.2 Importância Econômica de <i>C. papaya</i>	5
3.3 Melhoramento genético da cultura de <i>C. papaya</i>	7
3.4 Cultura de células e tecidos vegetais aplicada a cultura de <i>C. papaya</i>	8
3.5 Embriogênese somática.....	9
3.6 Metabolismo de carboidratos durante a embriogênese somática	16
3.7 Poliaminas (PAs).....	16
3.8 Análise proteômica durante a Embriogênese Somática.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Material vegetal.....	22
4.2 Assepsia.....	22
4.3 Indução e multiplicação das Culturas.....	22
4.4 Maturação das culturas embriogênicas.....	23
4.5 Análise do desenvolvimento dos embriões somáticos	24

4.6 Germinação dos embriões somáticos	24
4.7 Análise histomorfológica e histoquímica durante o período de maturação.....	24
4.8 Determinação de Carboidratos e amido.....	25
4.9 Determinação de PAs livres	26
4.10 Extração e quantificação de proteínas totais.....	27
4.11 Digestão Proteica.....	28
4.12 Análise de espectrometria de massas	29
4.13 Análise dos dados	30
4.14 Análise estatística	31
5. RESULTADOS	33
5.1 Análise do desenvolvimento dos embriões somáticos	33
5.2 Análises histomorfológica e histoquímica durante o período de maturação.....	35
5.3 Concentração de carboidratos e amido durante o período de maturação	38
5.4 PAs livres em calos embriogênicos e embriões somáticos	38
5.5 Alterações no perfil proteômico em diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de <i>C. papaya</i>	43
6. DISCUSSÃO	57
6.1 Análise do desenvolvimento dos embriões somáticos	57
6.2 Carboidratos, análise histomorfológica e histoquímica	57
6.3 PAs em calos e nos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos	60
6.4 Análise proteômica comparativa durante o desenvolvimento dos embriões somáticos	62
6.4.1 Proteínas estágio-específicas durante o desenvolvimento de embriões somáticos.....	62
6.4.2 Proteínas diferencialmente acumuladas durante os estádios de desenvolvimento de embriões somáticos	67
7. CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

RESUMO

BOTINI, Nadia; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2020; Análise proteômica comparativa e perfil de carboidratos e poliaminas endógenas durante a embriogênese somática em *Carica papaya* L. 'Golden'; Orientador: Prof. Dr. Vanildo Silveira; Conselheiros: Prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho e Prof.^a Dr^a Virginia Silva Carvalho.

A embriogênese somática tem sido amplamente estudada como sistema modelo para a compreensão de eventos moleculares e bioquímica e biologia que ocorrem durante o desenvolvimento do embrião vegetal. Apresentando alto potencial de aplicação na propagação clonal de genótipos elite de mamoeiro (*Carica papaya* L.). Neste contexto, análises histomorfológicas e histoquímicas, perfil de carboidratos e poliaminas endógenos bem como análises proteômicas vem sendo estudados como fatores que podem atuar na modulação das respostas morfogênicas *in vitro* durante a embriogênese somática. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo analisar o desenvolvimento de calos embriogênicos durante a maturação através da histomorfologia, histoquímica, perfil de carboidratos e poliaminas bem como acompanhar os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos em *C. papaya* 'Golden' através do perfil de poliaminas e perfil proteômico. Na análise histomorfológica ocorreu reação ortocromática no citoplasma e reação metacromática na célula parede, indicando a presença de polissacarídeos ácidos. Os calos embriogênicos possuem regiões meristemáticas, células com núcleos proeminentes, citoplasma densamente corado, vários planos de divisão, células pequenas e isodiamétricas de

citoplasmas densos e núcleos evidentes. Através da análise histoquímica foi identificado a presença de compostos de reserva nos calos embriogênicos durante o período de maturação 0 e 7º dia onde corpos proteicos foram detectados por reação positiva ao corante azul brilhante de Coomassie e a presença de amido foi detectado por reação positiva ao reagente ácido periódico de Schiff nos calos embriogênicos durante o período de maturação 0, 7º, 21º e 28º dia. Na análise de carboidratos, foi demonstrado que a sacarose e a frutose foram encontradas em teores mais elevadas no 14º dia de maturação e o maior teor de amido foi encontrado no 28º dia. O conteúdo de PAs livres de calos embriogênicos foi significativamente maior nos dias 0 e no 14º dia de maturação. Também foi observado que a razão Put/(Spd+Spm) foi significativamente maior nos dias 0 e no 28º de maturação. Nos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos, o conteúdo de PAs livres e a razão Put/(Spd+Spm) aumentaram no estágio torpedo e diminuíram no estágio cotiledonar. Análise proteômica comparativa foi conduzida visando à compreensão dos mecanismos associados aos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos, assim como alterações bioquímicas, moleculares e a dinâmica das proteínas envolvidas na ativação das rotas fotomorfogênicas. A análise proteômica comparativa entre os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos permitiu a identificação de 800 proteínas diferencialmente acumuladas sendo que 392 foram classificadas como diferencialmente acumuladas em pelo menos um dos estádios de desenvolvimento do embrião somático, dessas 392 proteínas diferencialmente acumuladas 21 proteínas exclusivas foram estádios-específicas e 37 proteínas apresentaram um perfil de acúmulo crescente ou decrescente ao longo dos estádios de desenvolvimento do embrião somático. Dentre as 21 proteínas estádios-específicas, 16 pertenciam ao estágio globular, três ao estágio cordiforme, uma ao estágio torpedo e uma ao estágio cotiledonar, essas proteínas estavam relacionadas ao metabolismo protéico (proteínas ribossômicas), metabolismo de carboidratos (UDP-glicose 6-desidrogenase tipo, xilose isomerase), transdução de sinais (Rabs), responsivas a estresses (glutathione S-transferase F13, catalase isoenzima 1), metabolismo hormonal (ADP-ribosilação Fator 1). Foram identificadas 37 proteínas que apresentaram uma tendência de acúmulo congruente, aumentando ou diminuindo seu acúmulo durante o desenvolvimento dos embriões somáticos, essas proteínas estavam relacionadas

ao metabolismo de proteínas (fator de alongamento 1-alfa), responsivas a estresses (proteína abundante na embriogênese tardia, proteínas de choque térmico, 2-Cys peroxirredoxina BAS1) proteínas de reserva (vicilinas), processo de desenvolvimento (Homólogo do ciclo de divisão celular 48). Esse é o primeiro trabalho que relaciona histomorfologia, histoquímica, conteúdo de carboidratos, poliaminas bem como a modulação de proteínas diferencialmente acumuladas com os estádios de desenvolvimento de embriões somáticos durante o período de maturação, tendo grande importância para compreensão dos eventos relacionados à morfogênese *in vitro*.

Palavras-chave: Embriogênese somática, *C. papaya*, Proteômica, Poliaminas, Carboidratos.

ABSTRACT

BOTINI, Nadia; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2020; Comparative proteomic analysis and profile of carbohydrates and endogenous polyamines during somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. 'Golden'; Adviser: Prof. Dr. Vanildo Silveira; Counselors: Prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho and Prof.^a. Dr^a Virginia Silva Carvalho.

Somatic embryogenesis is an important biotechnological tool in the large-scale propagation of elite genotypes. The study of molecules important for the differentiation of somatic embryos of *Carica papaya* L. can contribute to the development of more efficient protocols. To understand the molecular mechanisms during the maturation of embryogenic calli and differentiation of somatic embryos of *C. papaya*, histomorphological and histochemical analyzes were performed and the content of carbohydrates and endogenous polyamines (PAs) were determined in embryogenic calli during maturation. Proteomic and content of endogenous polyamines analyzes were also performed in different globular, cordiform, torpedo and cotyledonary stages. Embryogenic calluses have meristematic regions, their cells have prominent nuclei, densely stained cytoplasm, several division planes, small and isodiametric cells, delimited by cell wall, with dense cytoplasm and evident nucleus. Histochemical analysis indicated the presence of reserve compounds in the calli, by observing protein bodies and polysaccharides, which form small starch granules in the cells. In the carbohydrate analysis, the contents of sucrose, fructose and glucose were identified and quantified, these carbohydrates showed a statistical difference

between the maturation times. The analysis of endogenous polyamines in embryogenic calluses during the maturation period demonstrated that the total free PA content was higher on days 0 and 14 of maturation in relation to the other analyzed times. It was also observed that the Put/(Spd + Spm) ratio on days 0 and 28 of maturation had the highest values, not differing statistically from each other in relation to the other days of maturation. In the development stages, the content of total free PAs and the Put/(Spd + Spm) ratio increased in the torpedo stage and decreased in the cotyledonary stage. The comparative proteomic analysis identified a total of 800 proteins, 392 were classified as differentially accumulated in at least one of the developmental stages of the somatic embryo. The globular stage had 16 exclusive proteins, most of which belonged to the 60S ribosomal protein family. A total of 37 proteins showed a profile of increasing or decreasing accumulation over the developmental stages of the somatic embryo. These results demonstrate the importance of protein synthesis in the differentiation of early stages of somatic embryos of *C. papaya*. In addition, we identified proteins of the RAB family that also play an important role in the early development of somatic embryos, possibly regulating the internal membrane system. In the final stages of development, there was an increase in the accumulation of proteins involved with protein repair and folding, such as proteins late embryogenesis abundant (LEA) and heat shock proteins (HSPs). Our results show an intense control mechanism in protein metabolism responsible for the differentiation of somatic embryos of *C. papaya*.

Key words: Somatic embryogenesis, *C. papaya*, Proteomics, Polyamines, Carbohydrates.

1.INTRODUÇÃO

A espécie *Carica papaya* L., pertencente à família Caricaceae, é uma fruteira de grande importância econômica cultivada, principalmente, nos países tropicais e com grande aceitação no mercado mundial. *C. papaya* apresenta uma produção de 11.581.779(t) ocupando cerca de 406.190(ha) no mundo. O Brasil é o segundo maior produtor de mamão sendo responsável por 17,1% dessa produção, tornando essa cultura de grande importância econômica para o Brasil (IBGE, 2018).

Um dos fatores que afetam a produção de *C. papaya* é a produção de mudas com boa qualidade, isso está diretamente relacionado com o potencial de produção e à boa qualidade dos frutos, uma vez que sua propagação predominante ocorre via seminífera (Alcázar et al., 2010). Assim sendo, o estabelecimento de protocolos eficientes para a micropropagação e aplicação de tecnologias de transformação genética poderá se tornar um diferencial na cultura de *C. papaya*, com essas tecnologias será possível à produção de grande quantidade de mudas com alto padrão genético e fitossanitário.

Neste contexto, surge a embriogênese somática que é um processo morfogenético análogo à embriogênese zigótica, baseando-se na totipotência celular, na qual uma única ou um pequeno grupo de células somáticas são precursores da formação de um embrião somático (Tautorus et al., 1991). A embriogênese somática tem como vantagens a produção de embriões somáticos uniformes e com pureza genética; a obtenção de altas taxas de multiplicação; a

possibilidade de automatização do sistema de trabalho por meio do uso de biorreatores; além da utilização como ferramenta integrada aos programas de melhoramento genético quando associada à criopreservação e à engenharia genética (Guerra et al., 1999; Steiner et al., 2008). Protocolos eficientes de propagação *in vitro*, via organogênese e embriogênese somática, já foram estabelecidos em *C. papaya* (Litz and Conover, 1981; Reuveni et al., 1990; Bhattacharya et al., 2002; Yu et al., 2003; Ascencio-Cabral et al., 2008; Tsai et al., 2009; Anandan et al., 2012).

Desde então vem se buscando o estabelecimento de protocolos responsivos, bem como estudos para o entendimento dos eventos moleculares e bioquímicos que ocorrem durante a embriogênese somática em *C. papaya*. Heringer et al. (2013), estabeleceram um protocolo para embriogênese somática em *C. papaya* híbrido UENF/CALIMAN 01. Já Vale et al. (2014) realizaram análise proteômica comparativa durante a maturação sob diferentes concentrações de polietilenoglicol em *C. papaya*. Vale et al. (2018) investigaram os efeitos do polietilenoglicol (PEG) durante a embriogênese somática de *C. papaya* híbrido UENF/CALIMAN 01 onde foi analisado o desenvolvimento dos embriões somáticos e as mudanças no perfil de carboidratos durante a maturação. Recentemente Almeida et al. (2019) verificaram a influência da qualidade da luz, durante a maturação e perfil proteômico de calos embriogênicos de *C. papaya* L. 'Golden'.

Durante o desenvolvimento dos calos embriogênicos e o desenvolvimento dos embriões somáticos ocorrem vários processos bioquímicos e moleculares que são importantes para o entendimento dessa via morfogênética e esses processos não estão totalmente elucidados, assim o estudo dos processos bioquímicos e moleculares associados à competência, determinação de calos embriogênicos e o desenvolvimento de embriões somáticos em *C. papaya* L. apresentam alto potencial de identificação de biomarcadores para monitorar o desenvolvimento de embriões somáticos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo analisar o desenvolvimento de calos embriogênicos durante a maturação através da histomorfologia, histoquímica, perfil de carboidratos e PAs, bem como acompanhar os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos em *C. papaya* 'Golden' através do perfil de PAs e perfil proteômico.

2.2. Objetivos Específicos

- a. Identificar proteínas diferencialmente acumuladas nos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos;
- b. Avaliar o perfil de PAs durante os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos;
- c. Avaliar o perfil de PAs em calos embriogênicos durante a maturação;
- d. Determinar o perfil de carboidratos em calos embriogênicos durante a maturação;
- e. Realizar a histomorfologia e histoquímica em calos embriogênicos durante a maturação visando observar a reação positiva para proteínas (Coloração Coomassie Blue) e amido (coloração PAS).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos gerais da cultura de *C. papaya*

C. papaya L. pertence à classe Eudicotyledoneae, subclasse Archichlamidae, ordem Violales, subordem Caricinae, família Caricaceae, gênero *Carica*. (Badillo, 2000; Gschwend et al., 2013). Segundo Badillo and Leal (2020) a família Caricaceae compreende seis gêneros com números de espécies diferentes: *Vasconcellea* (20 espécies), *Jacaratia* (sete espécies), *Jarilla* (três espécies), *Cylicomorpha* (duas espécies) *Horovitzia* e *Carica* com uma espécie cada. *C. papaya* é o único membro do gênero após sua reabilitação do grupo *Vasconcella*, considerado parte do gênero *Carica*, até o ano 2000 (Badillo, 2000), pertencente à família Caricaceae e ao gênero *Carica* é a espécie economicamente mais importante na família (Carvalho et al., 2012). Porém as demais espécies pertencentes aos demais gêneros são importantes por serem considerados repositórios de genes que poderão ser introduzidos na forma cultivada (Pereira et al., 2018).

A família Caricaceae teve origem na África, onde ocorrem duas espécies existentes, a dispersão para a América Central da África ocorreu cerca de 35 milhões de anos atrás possivelmente por vegetação flutuante transportada pelas correntes oceânicas (Carvalho et al., 2012). Evidências sugerem fortemente de que a Mesoamérica seja o centro mais provável de origem e domesticação de *C. papaya*. Em apoio a isso, muitas populações selvagens de *C. papaya* ocorrem em

toda a Mesoamérica e, portanto, representam o pool genético da variabilidade genética em comparação com o mamão domesticado para posterior evolução e manejo futuro das culturas (Chávez-Pesqueira and Núñez-Farfán, 2017).

C. papaya é diploide com $2n=2x=18$ cromossomos (Corrêa et al., 2010). A montagem do seu genoma ainda é um scaffold, relativamente pequeno com 372 Mb porém está organizado em cromossomos (Ming et al., 2008). A espécie é considerada sexualmente polígama por apresentar três diferentes tipos de plantas, tais como femininas, masculinas e hermafroditas (Storey, 1953). Porém, o mercado consumidor tem interesse apenas no cultivo de indivíduos hermafroditas, por apresentarem frutos no formato piriforme e altas taxas de polpa/volume (Schmildt et al., 2015). Os indivíduos hermafroditas de *C. papaya* reproduzem-se preferencialmente por autogamia facultativa com cleistogamia (Damasceno Junior et al., 2009).

Segundo Costa and Pacova (2003), os frutos podem ser classificados em dois grupos diferentes, Solo ou Formosa, conforme o tamanho e a origem. O mercado brasileiro comercializa, em grande escala, as variedades que pertencem ao grupo Solo, conhecidos como mamão 'Havai' ou 'Papaya'. Desse grupo, sobressaem-se as cultivares 'Sunrise Solo' e 'Golden', genótipos do grupo Solo apresentam frutos que atendem a uma preferência para exportação, pelas características de polpa atraente (avermelhada) e tamanho pequeno, com peso entre 300 e 650 g.

Após o sequenciamento do genoma, *C. papaya* se tornou um interessante sistema para estudos de genômica funcional e proteômica podendo fornecer informações capazes de desenvolver marcadores específicos e alterações e mudanças no perfil protéico durante a embriogênese somática.

3.2 Importância Econômica de *C. papaya*

O mercado da fruticultura tem grande importância na economia brasileira, no ano de 2017 o valor de produção foi estimado em R\$ 37 bilhões, um acréscimo de 29% em relação ao ano de 2015 (IBGE, 2018). Gerando cerca de 927 milhões em 2017 ocupando a sexta posição no ranking brasileiro de fruteiras com a maior produção, produzindo cerca de 4% de toda produção de frutas do país (IBGE, 2018).

A produção mundial de mamão atingiu 11.581.779 de toneladas tendo como principais produtores a Índia que é o maior produtor de mamão com aproximadamente 5,5 milhões de toneladas representando 42,36% da produção mundial, seguido do Brasil que é o segundo maior produtor de mamão com 14,16% da produção entre os anos de 2010 e 2014, também destacam-se a Indonésia com 6,07%, o México com 5,99%, a República Democrática do Congo com 1,88%, a Tailândia com 1,60% e a Colômbia com 1,31% da produção mundial de mamão. No ano de 2018 ocupou o segundo lugar na produção mundial e movimentou sua economia com um valor total de US\$ 38,8 milhões (IBGE, 2018).

No ano de 2017, o Brasil produziu 1,05 milhão de toneladas, sendo o Estado da Bahia o maior produtor, com 369 mil toneladas, seguido do Espírito Santo com 311 mil toneladas, o Ceará com 115 mil toneladas e também podemos destacar o Rio Grande do Norte, com 86 mil toneladas produzidas, juntos são responsáveis por quase 65% da produção nacional (IBGE, 2018).

Entre as frutas da pauta de exportação brasileira de 2013, o mamão está entre as oito primeiras, com uma participação de 293,4 mil toneladas, correspondendo a US\$ 226,7 milhões, ocupando a segunda posição com 9,7% da exportação mundial, gerando US\$ 48,8 milhões com a exportação, seguido de Belize, com 8,7% da exportação mundial. O México é o quarto país maior produtor de mamão e aparece em primeiro lugar como exportador, sendo responsável por aproximadamente 40% das exportações (FAO, 2018).

C. papaya é uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sua principal forma de consumo é *in natura* bem como, existe no mercado uma gama de produtos e subprodutos que são gerados pelas indústrias de alimentos, farmacêuticas e de ração para animais (Ruggiero et al., 2011). Além de ser um fruto rico em nutrientes, grande porcentagem de vitamina A, B1, C, potássio, folato, niacina, tiamina, riboflavina, ferro e cálcio e fibra (Huerta-Ocampo et al., 2012).

Além disso, frutas, caules, folhas e raízes do mamão são usadas para extração de diversos produtos como a carpaína e produção de papaína (Ming et al., 2008). A carpaína é um dos principais componentes alcalóides das folhas de mão sendo estudado por seus efeitos cardiovasculares atuando como ativador cardíaco (Oliveira et al., 1994). A produção comercial de papaína é direcionada

para a digestão de proteínas, principalmente como amaciante de carne vermelha, para a fabricação de cerveja e para o tratamento da pele de verrugas e cicatrizes (Ming et al., 2012).

3.3 Melhoramento genético da cultura de *C. papaya*

Os programas de melhoramento genético de plantas são conduzidos com vários objetivos, sendo o principal deles a obtenção de genótipos superiores elevando o valor econômico da cultura (Borém, 1997). O melhoramento genético de *C. papaya* visa contribuir substancialmente para maior produtividade, e o objetivo pode ser alcançado pela utilização e aplicação de métodos de melhoramento e seleção de variedades com rendimentos superiores, bem como pela obtenção de linhagens ou híbridos com resistência a doenças e pragas, o que certamente contribuirá de maneira decisiva no melhoramento da cultura (Gabrovska et al., 1967).

No Brasil, destacam-se três grandes instituições que atuam fortemente na área de melhoramento genético de *C. papaya*, a) a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Mandioca e Fruticultura) localizada em Cruz das Almas na Bahia, b) o Instituto Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural, no Estado do Espírito Santo, c) e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) no Estado do Rio de Janeiro.

Dentro do programa de melhoramento de *C. papaya* na UENF podemos destacar as diversas áreas que ele abrange como: melhoramento clássico, citogenética, genética molecular, fisiologia pós-colheita, resistência a doenças, proteômica e bioinformática e mais recentemente a fenômica. Em 22 anos de programa de melhoramento foi possível o desenvolvimento de vários trabalhos e o registro de 21 híbridos de *C. papaya* (Pereira et al., 2018). Dentre os 21 híbridos registrados se encontra o primeiro híbrido de *C. papaya* denominado UENF/CALIMAN – 01, popularmente conhecido como Calimosa. Ao longo desses anos o Programa de Melhoramento Genético de *C. papaya* na UENF vem se destacando no cenário nacional através dos resultados obtidos.

3.4 Cultura de células e tecidos vegetais aplicada a cultura de *C. papaya*

Comercialmente o plantio de *C. papaya* ocorre por via seminífera, porém esse fator eleva o custo da produção Pérez et al. (2016). Devido ao fato de não existir maneiras eficientes de se fazer a sexagem em mudas, os produtores plantam em média três sementes por cova e são obrigados a esperar de quatro a seis meses, para identificar as plantas hermafroditas (Urasaki et al., 2002). Isso implica no aumento do preço final do produto em decorrência dos gastos com os tratamentos culturais da cultura. Além disso, o alto preço das sementes de genótipos elite levam os agricultores a produzirem suas sementes de forma particular, esse fato contribui para a disseminação de genótipos com baixo padrão de qualidade (Schmidt et al., 2016).

Através da disseminação de genótipos com baixo padrão de qualidade as progênes poderão apresentar uma descaracterização do genótipo, exibindo consideráveis variações no tamanho, forma e gosto dos frutos, e maior susceptibilidade a doenças (Reuveni et al., 1990). Neste sentido, destaca-se o uso de metodologias alternativas às convencionais, como a micropropagação de genótipos elite, as quais possuem características de interesse agrônomo, gerando cultivares mais uniformes e livres de doenças (Fitch et al., 2005). Neste contexto, a cultura de tecidos emerge como uma técnica biotecnológica com potencial de aplicação na cultura de *C. papaya*.

A cultura de células e tecidos vegetais é a ciência na qual destina-se a isolar órgão, tecidos ou células da planta - mãe e cultivá-los em meio artificial sob condições controladas e livre de patógenos (George et al., 2008). Para Thorpe (2007) a cultura de tecidos é o cultivo asséptico de células, tecidos ou órgãos isolados de um organismo e mantidos em um ambiente *in vitro* sob condições físicas e químicas estabelecidas. Essa técnica baseia-se no princípio da totipotência celular, onde uma célula vegetal apresenta todas as informações genéticas necessárias para se desdiferenciar tornar-se competente e se rediferenciar possibilitando a origem de um organismo por completo (George et al., 2008).

Assim, o uso da cultura de células *in vitro* através da micropropagação se torna uma alternativa essencial para a micropropagação de genótipos elite, ou

seja, para produzir um grande número de plantas (material com alta qualidade) ou para apoiar programas de melhoramento visando à introdução de novas cultivares ou híbridos em escala comercial (Farzana et al., 2008). Neste sentido, a embriogênese somática surgiu com grande potencial de aplicação e tem sido o principal método utilizado para a propagação e o melhoramento genético no mamão (Dhekney et al., 2016).

3.5 Embriogênese somática

Dentre as técnicas de micropropagação, a embriogênese somática se destaca como relevante via de regeneração de plantas. Estudos visando aprimoramento de técnicas de propagação são importantes para a manutenção dos recursos naturais. Assim, a embriogênese somática tem sido utilizada visando diferentes objetivos, que podem ir de um modelo de referência para estudos básicos de fisiologia, bioquímica e biologia celular e molecular, até a propagação clonal, incluindo a conservação em várias espécies (Guerra et al., 2000).

A embriogênese somática é um processo análogo à embriogênese zigótica, em que uma única ou mais células somáticas, em condições ideais de cultivo, culminam no desenvolvimento de estruturas bipolares sem ligações vasculares com o tecido de origem (Tautorus et al., 1991; Guerra et al., 1999). Segundo Rocha and Dornelas (2013), por mais que possuem semelhanças com os mesmos estádios de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) a embriogênese somática apresenta uma diferença da zigótica na qual o embrião zigótico inicia seu desenvolvimento com a formação do zigoto após a fertilização. Já as células somáticas adquirem competência embriogênica através da exposição a estímulos físicos (estresses) e químicos (hormônios) (Elhiti et al., 2013).

Neste processo, a célula somática após receber um estímulo (sinal), geralmente proporcionado por reguladores de crescimento vegetal ou algum tipo de estresse, passa por um processo de reprogramação gênica, adquirindo o status de célula totipotente, que culmina na formação do embrião somático (Fehér et al., 2003). Assim, esse processo contempla o significado de totipotencialidade das células vegetais que foi inicialmente apontado por Haberlandt, em 1902, que sugeriu a possibilidade do cultivo artificial de embriões a partir de células vegetais,

levando-o a introduzir o conceito prático de totipotência como sendo a capacidade de células vivas, que possuem um conjunto de cromossomos normais, regenerarem uma planta completa (Thorpe, 1990).

O primeiro relato de embriogênese somática foi observado em 1958 por Steward et al. (1958) onde conseguiram regenerar plantas inteiras de cenoura via embriões somáticos. A embriogênese somática pode ocorrer de dois tipos básicos: o primeiro denominado de embriogênese direta, em que embriões somáticos se originam dos tecidos-matrizes, sem a formação de calos e a segunda a embriogênese indireta, em que os embriões se desenvolvem a partir de um calo, apresentando diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação, os quais podem adquirir novas competências e originar embriões somáticos (Sharp et al., 1980; Yeung, 1995). A embriogênese somática consiste principalmente em dois ciclos: A) indução em meios de cultura contendo regulador de crescimento como as auxinas e citocininas e a fase de multiplicação em meio contendo auxinas em baixas concentrações, B) a fase de maturação ocorre à transição entre as fases, para isso é necessário sinais físicos e químicos, como a remoção de auxina do meio de cultura, presença de promotores da maturação como ácido abscísico (ABA) e/ou agentes osmóticos como polietilenoglicol (PEG) e a presença de luz, após a obtenção dos embriões somáticos estes são germinados e convertem-se em plântulas que são estabelecidos *ex vitro* (Figura 1) (Guerra et al., 1999).

A fase de indução pode ser obtida por um tecido somático em condições específicas de cultura por meio de estímulos físicos (estresses) ou químicos (reguladores de crescimento) (Verdeil et al., 2007). Durante a embriogênese somática no período de indução podem ocorrer alterações morfológicas e bioquímicas que influenciam no padrão de expressão gênica (Aslam et al., 2011). Um dos estímulos mais citados na literatura para a indução da embriogênese somática é o uso do regulador de crescimento vegetal ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), uma auxina sintética (Fehér et al., 2003).

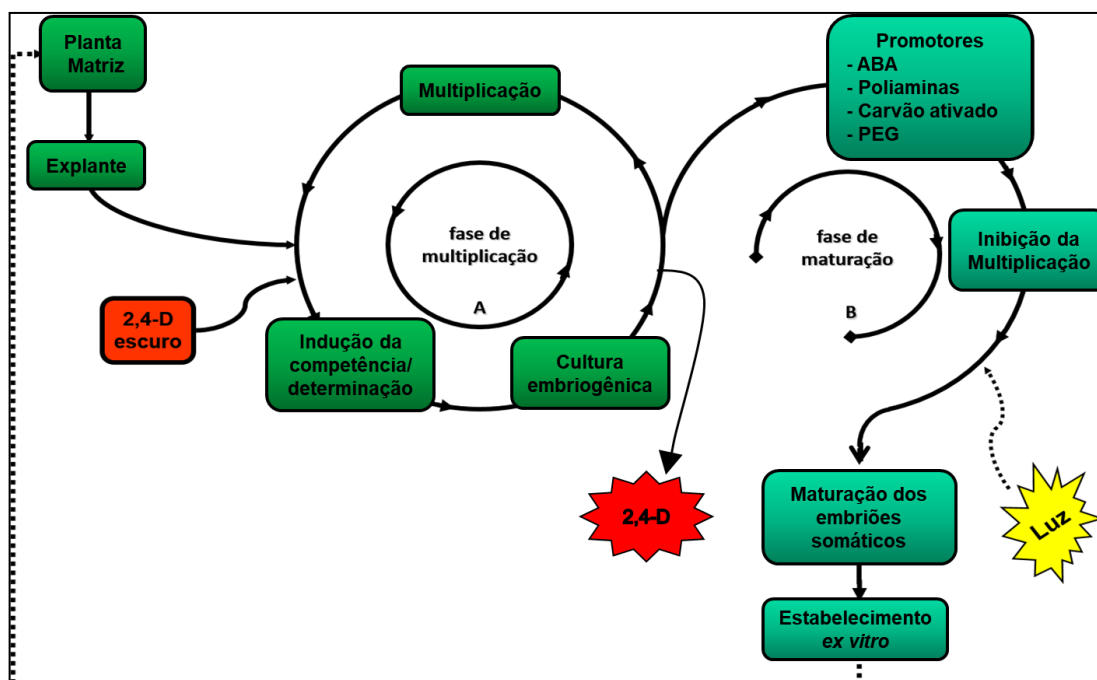


Figura 1: Esquema da modulação da embriogênese somática com ciclo de (A) indução e multiplicação e (B) ciclo de maturação adaptado de Steiner et al. (2008).

Os estímulos submetidos ao explante no processo de indução são necessários para que ocorra uma reprogramação gênica que alteram as cascatas de sinais genéticos, permitindo assim que ocorra a manifestação da totipotência (Verdeil et al., 2007). Segundo Fehér (2015) quando utilizado na embriogênese somática o 2,4-D é responsável pelo estabelecimento da polaridade no embrião, controle do desenvolvimento e aumento no nível endógeno de ácido indolacético (AIA).

A embriogênese somática desempenha um papel importante na regeneração *in vitro*, tornando-se uma via eficiente na regeneração de plantas e propagação em larga escala (Von Arnold et al., 1988). Esse processo inclui uma série de eventos característicos, como a desdiferenciação de células, a ativação da divisão celular e a reprogramação de seus padrões de fisiologia, metabolismo e expressão gênica (Yang and Zhang, 2010). É ainda uma via de regeneração relevante para as plantas e apresenta vantagens, como a produção ilimitada de clones com características de elite, a obtenção de linhagens celulares para a engenharia genética, a regeneração de uma estrutura bipolar a partir de uma única célula, aplicações à pesquisa básica, funcional e molecular, a produção de

sementes sintéticas e a conservação de recursos genéticos pela criopreservação (Aslam et al., 2011).

Devido a essas características a embriogênese somática se torna uma ferramenta essencial para multiplicar rapidamente genótipos superiores com alto rendimento e/ou resistentes às doenças. O primeiro relato de embriogênese somática em *C. papaya* foi descrito por Bruijne et al. (1974) utilizando pecíolos como explante, e as primeiras plântulas somáticas foram regeneradas a partir de entrenós que foram utilizados como explantes (Yie and Liaw, 1977). A partir desses estudos, diversos trabalhos foram realizados com o interesse em estabelecer um protocolo eficiente para a embriogênese somática em *C. papaya* visando à obtenção de embriões somáticos e sua utilização a nível comercial onde vários tipos de explantes foram utilizados, tais como: folhas, caule, pecíolo, raízes e principalmente embriões zigóticos que tem sido o explante mais utilizado (Tabela 1).

Tabela 1. Principais trabalhos realizados *C. papaya* utilizando a embriogênese somática como sistema de regeneração.

Espécie	Fonte do explante	Sistema de Regeneração	Reguladores de crescimento de plantas	Referências
<i>C. papaya</i> L.	Pecíolos	Embriogênese somática		(Bruijne et al., 1974)
<i>C. papaya</i> L. 'Solo Nº. 1'	Entrenó	Embriogênese somática	1 mg L ⁻¹ de ANA e 0.1 mg L ⁻¹ de CIN	(Yie and Liaw, 1977)
<i>C. papaya</i> L.	Tecido Ovariano	Embriogênese somática	1 mg L ⁻¹ de BAP	(Litz and Conover, 1981)
<i>C. papaya</i> L. 'Solo' e 'Sunrise'	Raízes	Embriogênese somática	1 mg L ⁻¹ de ANA, 0,5 e 1,0 mg L ⁻¹ de CIN	(Chen et al., 1987)
<i>C. papaya</i> L.	Hipocótilo	Embriogênese somática	112.5 L _{XE} de 2,4-D	(Fitch, 1993)
<i>C. papaya</i> L.	Embrião Zigótico	Embriogênese somática	0.1 e 25 mg L ⁻¹ de 2,4-D	(Fitch and Manshardt, 1990)
<i>C. papaya</i> L. 'solo'	Embrião Zigótico	Embriogênese somática	10 µM de 2,4-D	(Castillo et al., 1998)
<i>C. papaya</i> L. 'Sunrise Solo'	Embrião Zigótico	Embriogênese somática	2 mg L ⁻¹ de 2,4-D	(Fernando et al., 2001)
<i>C. papaya</i> L. 'Honey Dew'	Embrião Zigótico	Embriogênese somática	1 mg L ⁻¹ de picloram e 2 mg L ⁻¹ de 2,4-D	(Renukdas et al., 2003)
<i>C. papaya</i> L. 'Golden'	Embrião Zigótico	Embriogênese somática	9,05 µM de 2,4-D	(Clarindo et al., 2008)
<i>C. papaya</i> L.	Embrião Zigótico	Embriogênese somática	2,27 µM de thidiazuron combinado com 4,52 µM de 2, 4-D	(Malabadi et al., 2011)
<i>C. papaya</i> L. 'Maradol'	Embrião Zigótico	Embriogênese somática	0,02 mg L ⁻¹ de 2,4-D, 0,2 mg L ⁻¹ de CIN e 0,02 mg L ⁻¹ de ABA	(Ascencio-Cabral et al., 2008)

Tabela 1 – Cont.

Espécie	Fonte do explante	Sistema de Regeneração	Reguladores de crescimento de plantas	Referências
<i>C. papaya</i> L.	Suspensão celular	Embriogênese somática	2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D	(Anandan et al., 2012)
<i>C. papaya</i> L. 'Eksotika'	Embrião Zigótico	Embriogênese somática	10 mg L ⁻¹ de 2,4-D	(Bukhori et al., 2013)
<i>C. papaya</i> L. híbrido UENF/CALIMAN 01	Embrião Zigótico	Embriogênese somática	0, 20, 40 e 80 µM de 2,4-D	(Heringer et al., 2013)
<i>C. papaya</i> L. híbrido UENF/CALIMAN 01	Embrião Zigótico	Embriogênese somática	20 µM de 2,4-D	(Vale et al., 2014).
<i>C. papaya</i> L. 'sekaki'	Embrião Zigótico	Embriogênese somática	1,5 mg L ⁻¹ de 2,4-D e 0,5 mg L ⁻¹ de ANA, 2,25 mg L ⁻¹ de BAP e 1 mg L ⁻¹ de CIN	(Jamaluddin et al., 2017)
<i>C. papaya</i> L. híbrido UENF/CALIMAN 01	Embrião Zigótico	Embriogênese somática	20 µM de 2,4-D	(Vale et al., 2018)
<i>C. papaya</i> L. 'THB'	Brotos apicais e folhas cotiledonares	Embriogênese somática	6, 9, 12, 15 e 18 µM de 2,4-D e 19, 22, 25, 28 e 31 µM. de 4-CPA	(Cipriano et al., 2018)
<i>C. papaya</i> L. 'solo'	Hipocótilo, sementes e embrião zigótico	Embriogênese somática	9,0, 22,6, 67,8, 113,1 e 158,3 µM de 2,4-D	(Solórzano-Cascante et al., 2018)
<i>C. papaya</i> L. 'Golden'	Embrião Zigótico	Embriogênese somática	20 µM de 2,4-D	(Almeida et al., 2019)
<i>C. papaya</i> L. híbrido UENF/Caliman 01	Folhas	Embriogênese somática	6, 9, 12, 15 e 18 µM de 2,4-D e 19, 22, 25, 28 e 31 µM. de 4-CPA	(Gouvea et al., 2019)

Dentre os trabalhos citados na Tabela 1, quatro foram realizados pelo nosso grupo de pesquisa nesses últimos anos, onde no ano de 2013 foi estabelecido um protocolo para embriogênese somática em *C. papaya* no híbrido UENF/CALIMAN 01 onde a combinação de 3% sacarose e 20 µM de 2,4-D resultou nas maiores taxas de indução de calos embriogênicos e durante a maturação o meio que continha PEG (6%) teve a maior média no número de embriões somáticos, bem como, a conversão de embriões somáticos que resultaram em plântulas no final do processo (Heringer et al., 2013).

No ano de 2014 foi desenvolvido o trabalho com o objetivo de investigar os efeitos do PEG sobre o desenvolvimento de embriões somáticos e o perfil de proteínas diferencialmente abundantes durante a maturação de embriões somáticos em *C. papaya* híbrido UENF/CALIMAN01 onde o tratamento de maturação suplementado com PEG (6%) resultou no maior número de embriões somáticos. Neste trabalho foi realizada uma análise proteômica comparativa baseada em gel (eletroforese bidimensional seguida por espectrometria de massas em tandem) entre calos mantidos em meio de cultura de maturação com ou sem a suplementação de PEG (6%). Foram analisados 135 polipeptídeos

diferencialmente acumulados e destas 76 proteínas foram identificadas com sucesso, das quais 38 eram comuns em ambos os tratamentos, enquanto 14 proteínas foram exclusivas no tratamento controle e 24 proteínas foram exclusivas no tratamento suplementado com PEG (6%).

As proteínas identificadas foram classificadas em sete categorias onde a mais representativa foi observada no tratamento controle e foi associada com a resposta ao stress (25,8%), sob o tratamento com PEG (6%), as categorias representadas foram metabolismo de carboidratos e energia (18,4%) e resposta ao estresse (18,4%), chegando à conclusão que a expressão diferencial de três proteínas (enolase, esterases e álcool desidrogenase 3) induzidas por tratamento PEG (6%) pode desempenhar um papel importante na maturação (Vale et al., 2014).

No ano de 2018 foi realizado o estudo visando investigar os efeitos do PEG durante a embriogênese somática de *C. papaya* híbrido UENF/CALIMAN01 onde foi analisado o desenvolvimento dos embriões somáticos e as mudanças no perfil de carboidratos em calos embriogênicos submetidos aos tratamentos de maturação com PEG (6%) ou sem PEG (controle). O tratamento com PEG (6%) aumentou o número de embriões somáticos maduros seguidos por produção de plântulas. A diferenciação de embriões somáticos para o estágio cotiledonar foi significativamente maior no tratamento com PEG (6%). Nas análises histomorfológicas foi possível observar que as culturas embriogênicas mantidas em meio suplementado com PEG (6%) possuem centros meristemáticos, compostos por células isodiamétricas pequenas, com citoplasma denso e núcleos evidentes. Concomitantemente com o aumento na diferenciação de embriões somáticos em culturas mantidas com PEG, ocorreu um aumento no conteúdo endógeno de sacarose e amido, possivelmente relacionado a uma demanda crescente de energia, que pode ser um ponto chave na conversão de embriões somáticos em *C. papaya* (Vale et al., 2018).

No ano de 2019 foi realizado o trabalho com o objetivo de estudar a influência da qualidade da luz, usando diferentes tipos de lâmpadas diodo emissor de luz (LED) comparando com lâmpadas fluorescentes na maturação dos embriões somáticos e no perfil proteômico das culturas embriogênicas de *C. papaya* L. 'Golden'. O tratamento com a lâmpada LED (W_mB) contendo branco e azul médio produziu uma média de 82,4 embriões somáticos cotiledonares,

enquanto o tratamento com a lâmpada fluorescente produziu uma média de 47,6 embriões somáticos cotiledonares por calo (Almeida et al., 2019).

A análise proteômica comparativa gel-free revelou 35 proteínas diferencialmente acumuladas. As proteínas up-reguladas nos calos embriogênicos maturados sob a lâmpada LED W_mB em comparação com a lâmpada fluorescente incluem as proteínas ácido indol-3-acético-amido sintetase (GH3) e actina-despolimerização factor de 2 (ADF2) que estão envolvidos na regulação dos níveis de auxina por conjugação e transporte de auxina. Além disso, proteínas relacionadas com a produção de energia, remodelação parede celular, tráfico intracelular, pequenas GTPases e H⁺-PPase mostraram abundância significativamente maior nos calos embriogênicos incubados sob a lâmpada LED comparativamente aos mantidos na lâmpada fluorescente. Os resultados mostraram que a lâmpada LED W_mB melhorou a maturação dos embriões somáticos em associação com a acumulação diferencial de proteínas em calos embriogênicos de *C. papaya* 'Golden' (Almeida et al., 2019).

Através da proteômica conseguiu-se a identificação e quantificação de proteínas durante a embriogênese somática em *C. papaya* L., portanto, a proteômica é apresentada como uma alternativa para elucidar processos bioquímicos e moleculares importantes para a compreensão dessa rota morfogênética, com foco na identificação e quantificação de proteínas diferencialmente acumuladas. As proteínas diferencialmente acumuladas durante os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos podem fornecer uma visão sobre o desenvolvimento dos embriões e assim desenvolver marcadores moleculares de estádios específicos o que facilitará as aplicações práticas da embriogênese somática.

Dessa forma, a histomorfologia, histoquímica, perfil de carboidratos e PAs e proteômica podem proporcionar avanços no conhecimento científico, nos processos bioquímicos e moleculares que estão associados à maturação de calos embriogênicos e durante os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos em *C. papaya* L. permitindo uma melhor compreensão da embriogênese somática culminando no desenvolvimento de estratégias para propagação *in vitro*.

3.6 Metabolismo de carboidratos durante a embriogênese somática

Além das proteínas, os carboidratos são importantes moléculas fornecedoras de energia para o desenvolvimento das plantas. Durante a embriogênese somática, a adição de carboidratos ao meio de cultura, como fonte de carbono, é fundamental para a resposta morfogênética. Estes carboidratos são mobilizados para a formação dos calos e brotações, servindo como fonte de energia para os processos metabólicos (George et al., 2008).

A disponibilidade de açúcares é um importante direcionador do crescimento e desenvolvimento embrionário e na germinação de sementes. Eles atuam tanto como substrato intermediário para o metabolismo, quanto como moléculas sinalizadoras (Smeekens et al., 2010). Segundo Pescador et al. (2008) durante o desenvolvimento embrionário ocorrem vários processos, como mitose, estabelecimento de polaridade, diferenciação celular, síntese de metabólitos complexos e estoque de substâncias de reserva. Eles podem atuar como moléculas de sinalização e/ou reguladores da expressão gênica (Eveland and Jackson, 2012). Na embriogênese somática, variações nos níveis de carboidratos solúveis e amido podem fornecer informações importantes sobre os mecanismos pelos quais os embriões são convertidos em plântulas (Pescador et al., 2008).

Vale et al. (2018) avaliaram o conteúdo endógeno de sacarose, glicose, frutose e amido durante a embriogênese somática de *C. papaya* híbrido UENF/CALIMAN 01 e comprovaram a importância dos carboidratos nas respostas morfogênicas durante a maturação sob estresse osmótico. Neste sentido, estudos visando entender o metabolismo de carboidratos endógenos durante o período de maturação de calos pode ser uma importante ferramenta para entender a rota destes compostos durante a embriogênese somática. Além do conhecimento básico sobre o metabolismo, estes estudos podem auxiliar ainda na melhoria dos protocolos para o desenvolvimento dos embriões somáticos de *C. papaya*.

3.7 Poliaminas (PAs)

As PAs são pequenas aminas alifáticas comuns em todas as células vegetais, de baixo peso molecular que contém cargas positivas nos átomos de

nitrogênio. Essa propriedade facilita sua interação eletrostática com as macromoléculas do DNA, RNA, fosfolipídios, componentes da parede celular e proteínas, podendo atuar na regulação da expressão gênica, na modulação de sinal, na proliferação celular e na estabilização da membrana (Baron and Stasolla, 2008; Alcázar et al., 2010). Segundo Baron and Stasolla (2008) as PAs são de ampla ocorrência, estando presentes em fungos, animais e plantas superiores, assim implicam em uma função comum a estas moléculas na mediação de processos celulares, fisiológicos e desenvolvimento.

As principais PAs encontradas em plantas são: Putrescina (Put), Espermidina (Spd) e Espermina (Spm). Vários estudos vêm mostrando a sua participação em vários processos essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta, relacionadas em distintos processos fisiológicos como organogênese, embriogênese zigótica, embriogênese somática, regulação da rizogênese, senescência foliar, respostas a estresses bióticos e abióticos, desenvolvimento e maturação de frutos (Bouchereau et al., 1999; Silveira et al., 2004; Silveira et al., 2006; Santa-Catarina et al., 2007; Kusano et al., 2008; Alcázar et al., 2010; Silveira et al., 2013).

A biossíntese de PAs é mediada pelas enzimas ornitina descarboxilase (ODC), arginina descarboxilase (ADC), S-adenosil-metionina descarboxilase (SAMDC), Spd sintase (SPDS) e Spm sintase (SPMS) (Bagni and Tassoni, 2001). A síntese da Put acontece a partir dos aminoácidos arginina e ornitina através da ação das enzimas ADC e ODC, respectivamente (Figura 3). A Put é transformada em Spd e está em Spm através de adições sucessivas de grupos aminopropil provenientes do aminoácido metionina, a partir da S-adenosil-metionina (SAM), pela ação da SAMDC (Figura 3). Portanto, a adição de um grupo aminopropil à Put originará a Spd pela ação da SPDS, e outro grupo adicionado à Spd originará a Spm pela ação da SPMS. O catabolismo de Put, Spd e Spm é feito pela ação das enzimas diamina oxidase (DAO) e PA oxidase (PAO), (Figura 3) (Kaur-Sawhney et al., 2003; Papadakis and Roubelakis-Angelakis, 2005; Kusano et al., 2008).

Diversos estudos têm mostrado que a concentração de PAs totais e a razão entre PAs [Put/(Spd+Spm)] podem variar dependendo da espécie, órgão, tecido vegetal e estágio de desenvolvimento, devido a essa importância no desenvolvimento vegetal, as PAs podem ser usadas como biomarcadores durante

a embriogênese zigótica e somática (Silveira et al., 2006; Santa-Catarina et al., 2007).

Silveira et al. (2013) em seu trabalho realizado com cana de açúcar observou que os níveis endógenos de PAs estariam mais relacionados à capacidade embriogênica dos calos do que diretamente ao tipo de tratamento na maturação de embriões somáticos, demonstrando a importância dessas moléculas para a aquisição da competência embriogênica e desenvolvimento do embrião somático.

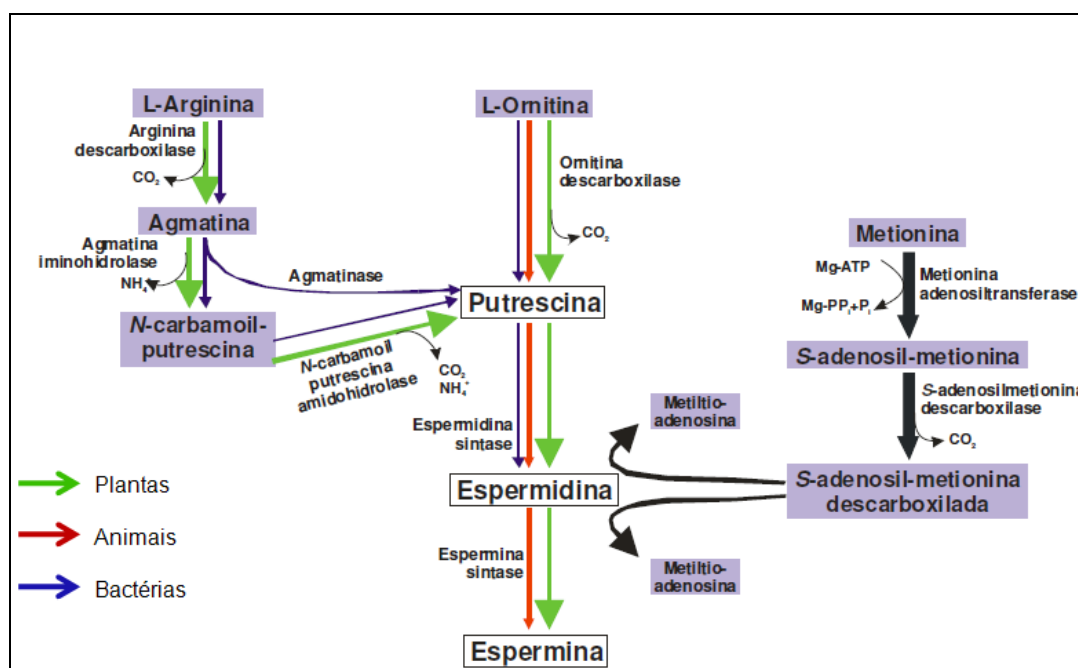


Figura 3: Biossíntese de PAs em plantas representadas pelas setas verdes, em animais representados pelas setas vermelhas e em bactérias representados pelas setas azuis. Adaptado de Kusano et al. (2008).

A análise do conteúdo endógeno de PAs também pode ser uma importante ferramenta utilizada para determinar a capacidade embriogênica em calos e durante os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos durante o cultivo *in vitro*. Esses papéis têm sido associados com vários processos, incluindo o controle da divisão celular e diferenciação celular, embriogênese, germinação de sementes, a formação das raízes, o desenvolvimento e maturação, e as respostas

a estresses bióticos e abióticos (Santa-Catarina et al., 2007; Dias et al., 2009; Vuosku et al., 2012; Grzesiak et al., 2013).

Vuosku et al. (2012) analisando o metabolismo endógeno de PAs em culturas embriogênicas de *Pinus sylvestris* também encontraram a relação dessas moléculas com a capacidade de proliferar as culturas e a habilidade das células lidarem com estresses causados no período de cultivo. Reis et al. (2016) sugeriu que as PAs agem como moléculas moduladoras da embriogênese somática em cana-de-açúcar uma vez que foi utilizada Put exógena em culturas embriogênicas e estas aumentaram o número de embriões somáticos produzidos.

Alguns estudos mostraram que o uso exógeno de PAs durante a embriogênese somática de mamão promoveu um maior número de embriões somáticos (Renukdas et al., 2006; Mishra et al., 2010; Kumari et al., 2018). Logo o metabolismo de PAs pode ser um fator importante durante a embriogênese, onde pode colaborar na indução da capacidade morfogênética em calos embriogênicos bem como no desenvolvimento dos embriões somáticos.

3.8 Análise proteômica durante a Embriogênese Somática

Durante os últimos anos, tem se associado o melhoramento de plantas a biotecnologia agrícola, que tem proporcionado grandes avanços principalmente em relação à produtividade. Com o surgimento de técnicas biotecnológicas visando o melhoramento molecular tal como a biotecnologia vegetal, tornou-se possível associar tais técnicas com o melhoramento clássico e assim auxiliar os programas de melhoramento (Al-Khayri et al., 2016). Somente nos últimos anos, a proteômica tem despontado como uma ferramenta no melhoramento apresentando grande potencial para gerar novos avanços em culturas de importância agrônômica (Cramer et al., 2013).

Proteômica refere-se ao estudo sistemático dos proteomas, que por sua vez, refere-se ao conjunto de proteínas expressas em um determinado organismo, célula ou tecido específico, em um dado momento e/ou submetido a alguma determinada condição (Wasinger et al., 1995; Wilkins et al., 1996). A proteômica visa estudar qualitativamente e quantitativamente os proteomas, bem como os tipos de modificação, interações e funções de uma determinada proteína

e/ou um conjunto de proteínas que atuam no metabolismo celular (di Palma et al., 2012).

Consequentemente, a identificação de proteínas acumuladas durante o desenvolvimento vegetal permite a caracterização de diferentes eventos fisiológicos que ocorrem nas células, tecidos e órgãos das plantas (Kormuťák et al., 2006). Em geral, a proteômica pode ser aplicada em vários estudos, tais como estudos do acúmulo diferencial de proteínas; de modificações pós-traducionais; de interação proteína-proteína; estrutural; e da função das proteínas (Dias et al., 2010).

Vários mecanismos estão envolvidos na regulação da síntese proteica durante a qual ocorrem modificações pós-transcricionais e pós-traducionais que podem regular a expressão espacial e temporal e a conformação de proteínas. Essas alterações modulam classes distintas de proteínas que bioquimicamente e estruturalmente, podem desempenhar diferentes papéis nas vias metabólicas e na composição proteômica de um organismo (Balbuena et al., 2011).

Desde os anos 2000, diversas técnicas em proteômica de plantas foram surgindo, dentre as diversas técnicas podemos citar as três abordagens mais utilizadas: a eletroforese bidimensional (2-DE), que primeiramente separa as proteínas na eletroforese bidimensional seguida de digestão enzimática e identificação de proteínas por espectrometria de massa, *Bottom-up* ou *shotgun*, começa com a digestão prévia das proteínas (geralmente com o uso de tripsina), e em seguida ocorre a separação dos peptídeos por cromatografia líquida e identificação por espectrometria de massas e por fim a *top-down* que se inicia com a separação de proteínas por métodos cromatográficos, seguida pela identificação por espectrometria de massas (Schlüter et al., 2009).

Portanto, há vários critérios para classificar a abundância das proteínas em estudos de proteômica. A proteômica comparativa é a estratégia que permite a elaboração de perfis proteicos ao longo de diferentes estádios de desenvolvimento, garantindo a identificação de proteínas estágio-específico, cuja expressão possa ser usada como marcadores do desenvolvimento (Dias et al., 2010).

Heringer et al. (2018) utilizando a plataforma Thomson Reuters Web of Science realizaram uma pesquisa utilizando os termos “embriogênese somática” e “proteômica” que revelou mais de 100 estudos publicados desde os anos 2000,

que usaram abordagens de proteômica MS com base no 2DE e aplicaram essas abordagens para estudar a embriogênese somática. Segundo estes autores, o uso de abordagens proteômicas *gel-free* em estudos relacionados à cultura de tecidos vegetais é relativamente novo. Até o momento, apenas onze estudos aplicaram esta abordagem à embriogênese somática em diferentes espécies, como *Larix principis-rupprechtii* (Zhao et al., 2015; Zhao et al., 2015), *Araucaria angustifolia* (Fraga et al., 2016), *Coffea arabica* (Campos et al., 2016), *Picea asperata* (Jing et al., 2017), *Picea balfouriana* (Li et al., 2015), *Saccharum* spp. (Heringer et al., 2015; Reis et al., 2016; Heringer et al., 2017) e *Zea mays* (Ge et al., 2017).

Segundo Heringer et al. (2018) é possível observar grupos de proteínas que são exclusivas durante o processo de embriogênese somática, como separar as proteínas que foram acumuladas em calos embriogênicos e/ou calos não-embriogênicos ou durante o desenvolvimento do embrião somático. Destacam-se as proteínas que estão relacionadas com resposta a estresse, detoxicação com as proteínas reativas de oxigênio, proteínas que fazem parte da síntese hormonal e transdução de sinais, metabolismo de carboidratos, metabolismo energético, proteínas do transporte celular, metabolismo de lipídeos e proteínas envolvidas na formação de parede celular.

Nosso grupo de pesquisa há anos vem desenvolvendo estudos proteômicos associados à embriogênese somática visando compreender os aspectos de desenvolvimento durante a embriogênese somática tanto em cana-de-açúcar (Silveira et al., 2013; Heringer et al., 2015; Reis et al., 2016; Heringer et al., 2017; Passamani et al., 2018; Passamani et al., 2019), como em mamão (Vale et al., 2014; Vale et al., 2018; Almeida et al., 2019).

Al-Khayri et al. (2016) afirmam que a análise proteômica pode contribuir na compreensão dos mecanismos moleculares que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas bem como as interações com o ambiente, sendo rapidamente adotada na última década pelos programas de melhoramento genético. Assim, a análise proteômica e a identificação e quantificação de carboidratos e conteúdo endógeno de PAs durante o período de maturação e desenvolvimento dos embriões somáticos de *C. papaya* podem ser importantes para aumentar a compreensão dos eventos relacionados à embriogênese somática.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Os frutos maduros de *C. papaya* 'Golden' utilizados para obtenção de embriões zigóticos foram gentilmente doados pela empresa Caliman Agrícola S/A, localizada na cidade de Linhares, Espírito Santo (ES), Brasil (19° 23'S e 40° 4'W).

4.2 Assepsia

Após a coleta, os frutos passaram por uma assepsia de acordo com (Vale et al., 2018). Após assepsia, os frutos foram levados para indução das culturas a partir dos embriões zigóticos, em câmara de fluxo laminar.

4.3 Indução e multiplicação das Culturas

A introdução das culturas *in vitro* foi realizada de acordo com (Vale et al., 2018), em câmara de fluxo laminar vertical a assepsia foi feita, onde os frutos foram lavados por 2 minutos em etanol 70% (Merck, Darmstadt, Germany) e 30 minutos em alvejante comercial 50% (2–2.5% hipoclorito de sódio), seguido de lavagens com água destilada autoclavada. Os embriões zigóticos foram isolados através das sementes dos frutos, as quais foram utilizadas como explantes. Estes explantes foram inoculados em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 20 mL de

meio de cultura MS (Murashige and Skoog, 1962) (Phytotechnology Lab, Shawnee Mission, USA). O meio de cultura MS foi suplementado com sacarose (30 g L^{-1}) (Vetec, São Paulo, Brazil), 2,4-D ($20 \text{ }\mu\text{M}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e phytigel® ($2,0 \text{ g L}^{-1}$) (Sigma-Aldrich). O pH foi ajustado para 5,8, o phytigel foi adicionado e por fim, autoclavado a 121°C por 15 min. Em seguida, o meio de cultura foi distribuído em placas de Petri contendo (20 mL por placa). Após a inoculação dos embriões zigóticos, as placas de Petri foram armazenadas em estufas de crescimento com temperatura controlada ($25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$), no escuro, por 45 dias. Para a fase de multiplicação, as culturas embriogênicas induzidas foram então isoladas e sub-cultivadas no meio de cultura com a mesma composição mencionada acima. As culturas embriogênicas induzidas foram submetidas a três ciclos de repicagem com intervalo de 21 dias, para a multiplicação das culturas embriogênicas.

4.4 Maturação das culturas embriogênicas

Após a fase de multiplicação, as culturas foram transferidas para o meio de maturação de acordo com Vale et al. (2018). O meio de maturação foi composto por meio de cultura MS suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e 100 mg L^{-1} de mio-inositol (Merck Milipore, Darmstadt, Germany) e 6% de PEG (3350, Sigma-Aldrich) e 2 g L^{-1} de Phytigel (Sigma-Aldrich). O pH foi ajustado para 5,8. O phytigel foi adicionado e o meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 min. Em seguida, o meio de cultura foi distribuído em placas de Petri contendo (20 mL por placa). Foram separadas três colônias, cada uma com 300 mg de matéria fresca (MF) totalizando 900 mg por placa, com 50 repetições, sendo considerado uma placa com três colônias uma repetição.

Após a inoculação das colônias, as placas de Petri foram mantidas em estufas de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, durante sete dias. Em seguida, foram transferidas para sala de cultivo com a temperatura à 25°C , expostos a lâmpada LED WmB de lâmpada (Philips GreenPower TLED 20W WmB; Koninklijke Philips Electronics NV, Netherlands) at $55 \text{ }\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 21 dias, conforme (Almeida et al., 2019). Durante o período de maturação, foram determinados a MF, a morfologia e o número de embriões somáticos. Para análise de PAs, carboidratos e proteômica, foram coletadas amostras de calos

aos 7, 14, 21 e 28 dias de maturação e os embriões somáticos em diferentes estádios (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar). Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até a realização das análises de PAs e proteômicas.

4.5 Análise do desenvolvimento dos embriões somáticos

O número de embriões somáticos em cada estágio de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) foi determinado aos 7, 14, 21 e 28 dias de maturação. O crescimento das culturas embriogênicas foi mensurado em termos de MF a partir do valor inicial (900 mg peso inicial de três colônias, sendo 300 mg por colônia). A determinação dos embriões somáticos nos diferentes estádios de desenvolvimento foi realizada utilizando um estereomicroscópio e uma câmera digital AxioCam ERc5s 0,5 X (Carl Zeiss) foram utilizadas 10 repetições sendo considerado uma placa com três colônias uma repetição.

4.6 Germinação dos embriões somáticos

Para germinação dos embriões somáticos foi preparado um meio de cultura MS, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 2 g L^{-1} de Phytigel® (Sigma). Foram utilizados frascos de 240 mL de capacidade, contendo 30 mL de meio de cultura. Os embriões maturados foram inoculados em meio cultura para germinação e foram mantidos em sala de cultivo com a temperatura à 25°C , em um regime de 16h de luz expostos a lâmpada LED WmB de lâmpada (Philips GreenPower TLED 20W W_mB; Koninklijke Philips Electronics NV, Netherlands) at $55\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ por 21 dias, conforme (Almeida et al., 2019).

4.7 Análise histomorfológica e histoquímica durante o período de maturação

A análise histomorfológica foi realizada de acordo com a metodologia descrito por Silveira et al. (2013), em calos embriogênicos durante o período de maturação através de microscopia óptica. Os calos embriogênicos foram coletados em intervalos de 7 dias ao longo do período de maturação e fixados em solução contendo 2,5 % de glutaraldeído e 4 % de formaldeído em cacodilato de

sódio 0,1 M (pH 7,2). Posteriormente, foram lavados com solução de 0,1 M de cacodilato de sódio (pH 7,2) durante 45 min à temperatura ambiente. Para o preparo das amostras para microscopia óptica, as amostras foram desidratadas em uma série de etanólica crescente (30, 50, 70, 90 e 100 %), por duas vezes de 1 hora em cada concentração.

Após a desidratação, as amostras foram infiltradas com historesina e etanol 100% (1:1, v/ v) durante 12 horas e subsequentemente, com 100 % historesina durante 24 horas e em seguida foram emblocadas em historesina Leica®. As amostras foram emblocadas em historesina, e cortes de 3 a 5 µm de espessura foram realizadas em micrótomo Leica® e os cortes foram corados conforme os métodos histoquímicos que foram aplicados: coloração com solução aquosa de azul de toluidina (1,0%) (Sigma-Aldrich) para identificação dos tecidos e alterações morfológicas e estruturais, Azul brilhante de Coomassie R-250 (CBB; GE Healthcare, Freiburg, Germany) para proteínas; reagente ácido periódico de Schiff (PAS) para polissacarídeos (Gahan, 1984). As lâminas foram observadas em microscópio óptico Axio Imager M2 (Zeiss®), com o programa Axio Vision 4.8 (Zeiss®), e fotografado com o auxílio de uma câmera Axio Cam MR3 (Zeiss®) acoplada ao equipamento.

4.8 Determinação de Carboidratos e amido

A metodologia utilizada para a determinação de carboidratos foi baseada na proposta por Filson and Dawson-Andoh (2009), com modificações. As amostras de calos embriogênicos de (300 mg de MF) foram maceradas com a adição de 1 mL de solução de extração composta por etanol 80 % (v/v), polivinil polirrolidona (PVPP) 3% (m/v) e ácido ascórbico 1 % (m/v), a 4 °C. Após a maceração, as amostras foram brevemente agitadas em vórtex, incubadas em banho-maria a 70 °C por 90 min e centrifugadas a 13.000 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi armazenado e o pellet ressuspendido em 1 mL de solução de extração e submetido à extração descrita. Os sobrenadantes resultantes foram adicionados aos provenientes da primeira centrifugação, filtrados em membrana de 0,2 µm antes da armazenagem a -20 °C.

Os carboidratos foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC - Shimadzu) usando um detector de

espalhamento de luz (ELSD-LT II - Shimadzu), com configuração do detector para temperatura de 40 °C, pressão de N₂ em 350 mPa, com ganho 9 e filtro 4. A coluna utilizada para a análise foi uma Prevail Carbohydrate ES 5 µm (250 x 4,6 mm), com uma pré-coluna do tipo Prevail Carbohydrate ES 5 µm (7,5 x 4,6 mm). A temperatura foi mantida a 25 °C. Como solventes foram utilizados: água milliq (solvente A) e acetonitrila 100 % (solvente B), sendo ambas as soluções submetidas à filtração prévia (0,2 µm).

A corrida foi realizada em gradiente isocrático ajustado para 80 % de solvente B durante 30 min com fluxo de 1 mL min⁻¹. As áreas e os tempos de retenção dos carboidratos analisados foram avaliados por comparação com carboidratos padrão em concentrações conhecidas: frutose, glicose e sacarose. Para estimar o teor de amido, o pellet resultante da extração dos carboidratos foram ressuspensos em 1 mL de 30% ácido perclórico (PCA), agitado por 1 h e centrifugado a 16.000 xg por 15 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados, e o sedimento resultante foi ressuspenso em 0,1 mL de PCA e centrifugado sob as mesmas condições. Os sobrenadantes foram misturados para estimar o teor de amido.

A dosagem de amido foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Yemm and Willis (1954), com modificações. Portanto, 5 µL da amostra foram adicionados 0,1 mL de solução de antrona-ácido sulfúrico (0,05% de antrona em ácido sulfúrico a 72%). Essas soluções foram agitadas e depois aquecidas a 100°C em banho seco por 10 min. As amostras foram resfriadas em água por 3 min em temperatura ambiente e a leitura foi realizada em uma leitora de placas de 96 poços (Power Wave XS2, BioTek, EUA) a 620 nm. Para quantificação do amido, as absorbâncias foram registradas e usadas para calcular a concentração de dextrose (µg mL⁻¹), usando a equação de regressão linear [dextrose] = f (absorbância), e os valores foram multiplicados por 0,9 para obter a concentração de amido (µg mL⁻¹) depois incubado no escuro por 30 min. As concentrações de amido foram calculadas usando glicose como curva.

4.9 Determinação de PAs livres

Amostras de calos embriogênicos e de embriões somáticos em cada estágio de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) foram

coletadas para determinação dos conteúdos endógenos de PAs. A análise do conteúdo de PAs foi realizada de acordo com a metodologia descrita por (Santa-Catarina et al., 2006). Três repetições biológicas (200 mg de MF cada) foram maceradas com 1,2 mL de PCA a 5 % (v/v), e mantidas no gelo por 1 h, em seguida foram centrifugadas a 20.000 x g por 20 min a 4°C. O pellet foi ressuspenso em 100 µL de PCA a 5 % centrifugado nas condições já citadas e os dois sobrenadantes das amostras respectivas contendo as PAs foram misturados. Em seguida, as PAs livres foram dansiladas. Para tanto, 40 µL da amostra de PAs foram misturados com 100 µL de cloreto de dansil (5 mg mL⁻¹ em acetona - 1,8 mM), 50 µL de solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e 20 µL de 1,7- diaminoheptano (DAH) 0,05 mM em acetona gelada 100% que foi utilizado como padrão interno. Após a mistura, as amostras foram incubadas no escuro por 50 min a 70°C. O excesso de cloreto de dansil foi removido pela adição de 25 µL de solução de prolina (100 mg mL⁻¹) com posterior incubação por 30 min no escuro em temperatura ambiente.

As PAs dansiladas foram particionadas com 200 µL de tolueno, e 175 µL da fase apolar (orgânica) que contém as PAs, foram coletadas, secas sob jato de nitrogênio, e ressuspenso em 175 µL de acetonitrila absoluta. A identificação e quantificação das PAs foi realizada por HPLC com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS) de 5 µm. Como solvente foram utilizados: acetonitrila 10 % em água, pH 3,5 ajustado com HCl 1N (solvente A) e acetonitrila absoluta (solvente B). A mudança na proporção da solução B em relação à solução A definiu o gradiente de corrida. O gradiente de acetonitrila absoluta (solução B) foi programado para 65 % durante os primeiros 10 min, de 65 a 100 % entre 10 e 13 min e 100 % até 21 min com fluxo de 1 mL min⁻¹ a 40°C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação a 340 nm e emissão em 510 nm. Foram injetados 20 µL da solução dansilada. As áreas dos picos e os tempos de retenção de cada PAs foram avaliados por comparação com PAs padrão em concentrações conhecidas: Put, Spd e Spm (Sigma-Aldrich).

4.10 Extração e quantificação de proteínas totais

Amostras de embriões somáticos em cada estágio de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) foram coletadas para análise

proteômica. O tampão de extração consistiu de 7 M de ureia, 2 M de tiourea, 2% de triton X-100, 1% de ditioneitol (DTT, GE Healthcare), 1 mM de fluoreto de fenilmetanossulfonilo (PMSF, Sigma-Aldrich) e o coquetel completo de inibidores de protease (Roche Diagnostics Mannheim, Alemanha) nas concentrações conforme instruções do fabricante. Três amostras biológicas (300 mg MF cada amostra) foram pulverizadas usando um almofariz e pilão em nitrogênio líquido. Em seguida, em microtubos foi adicionado 1 mL de tampão de extração ao pó da amostra. As amostras foram vortexeadas durante 30 min a 84 °C e centrifugadas a 16.000 xg durante 20 min a 44 °C. Os sobrenadantes foram coletados e a concentração de proteína foi determinada com a utilização do 2-D Quant kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

4.11 Digestão Proteica

Antes da etapa de digestão com tripsina, as amostras das proteínas foram precipitadas usando a metodologia de metanol/clorofórmio para remover qualquer interferente das amostras (Nanjo et al., 2012). Após a precipitação das proteínas, as amostras foram ressuspensas em solução de ureia 7 M/tiourea 2 M. A digestão das proteínas foi realizada usando a metodologia de preparação de amostras auxiliada por filtro (FASP) como descrito por Wiśniewski et al. (2009), com modificações.

Antes de iniciar o procedimento de digestão, um teste de integridade foi feito para verificar se havia unidades de filtro danificadas de acordo com Hernandez-Valladares et al. (2016), portanto, apenas as unidades adequadas foram utilizadas. Depois disso, alíquotas de proteína foram adicionadas às unidades de filtro Microcon-30 kDa (Millipore) (Lipecka et al., 2016), lavadas com 200 µL de bicarbonato de amônio 50 mM (solução A), e centrifugadas a 10.000 xg por 15 min em 25 °C (todos os passos de centrifugação foram realizados nesta condição).

Esta etapa foi repetida mais uma vez para remoção completa da ureia antes da redução das proteínas. Em seguida, foram adicionados 100 µL de DTT 50 mM (GE Healthcare) refrigerada feita em solução A, foram suavemente agitados em vórtex, e incubados por 20 min a 60 °C (1 min agitando a 650 rpm e 4 min em repouso). Em seguida, adicionou-se 200 µL 8 M de ureia e bicarbonato

de amônio 50 mM (solução B) e centrifugou-se durante 15 min. Para a alquilação das proteínas, foram adicionados 100 µL de iodoacetamida 50 mM (GE Healthcare) refrigerado, preparados em solução B, foram agitadas suavemente em vórtex e incubadas por 20 min a 25 °C no escuro (1 min agitando a 650 rpm e 19 min em repouso). Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução B e centrifugados por 15 min.

Este passo foi repetido mais uma vez. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução A e centrifugados por 15 min. Este passo foi repetido duas vezes. Na última lavagem, permaneceu aproximadamente 50 µL de amostra. Para a digestão das proteínas, foram adicionados 25 µL de RapiGest a 0,2% (v/v) (Waters, Milford, CT, EUA) e 25 µL de solução de tripsina (1:100 enzimas: proteína, V5111, Promega, Madison, WI, EUA) foram agitadas suavemente em vortex e incubou-se durante 16 h a 37 °C (1 minuto agitando a 650 rpm e 4 minutos de repouso).

Para a eluição dos peptídeos, as unidades de filtragem foram transferidas para novos microtubos e centrifugadas durante 10 min. Em seguida, foram adicionados 50 µL de solução A e centrifugados por 15 min. Este passo foi repetido mais uma vez. Para precipitação do RapiGest e inibição da tripsina, foram adicionados 5 µL de ácido trifluoroacético a 15% (TFA, Sigma-Aldrich) foram agitadas suavemente em vórtex e incubados durante 30 min a 37 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 15 min, os sobrenadantes foram recolhidos e secos sob vácuo. Os peptídeos foram ressuspensos em 100 µL de solução contendo 50 mM de bicarbonato de amônio a 95%, acetonitrila a 5% e ácido fórmico a 0,1%. Os peptídeos resultantes foram quantificados utilizando um NanoDrop 2000c espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific) utilizando a metodologia de proteína e peptídeo com leitura a 205 nm.

4.12 Análise de espectrometria de massas

A espectrometria de massas foi realizada utilizando um UPLC de nanoAcquity acoplado a um instrumento Q-TOF SYNAPT G2-Si (Waters, Manchester, UK). As corridas consistiram em três repetições biológicas de 1 µg de proteínas digeridas. Durante a separação, as amostras foram carregadas no nanoAcquity UPLC M-Class Symmetry na coluna C18 5 µm (180 µm × 20 mm) a 5

$\mu\text{L min}^{-1}$ durante 3 min e depois na coluna de fase reversa analítica nanoAcquity M-Class HSS T3 $1,8 \mu\text{m}$ ($75 \mu\text{m} \times 150 \text{mm}$) a 400nL min^{-1} , com uma temperatura da coluna de $45 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para a eluição dos peptídeos, foi utilizado um gradiente binário, com fase móvel A consistindo de água (Tedia, Fairfield, Ohio, EUA) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich) e fase móvel B composta de acetonitrila (Sigma-Aldrich) e 0,1% de ácido fórmico. A eluição do gradiente iniciado a 5% de B, aumentando de 5% de B para 40% de B até 91,12 min e de 40% B para 99% de B até 95,12 min, sendo mantida em 99% até 99,12 min, diminuindo então para 5% de B até 101,12 min e mantido 5% de B até o final da corrida aos 117,00 min.

A espectrometria de massa foi realizada em modo positivo e de resolução (modo V), 35.000 FWHM, com mobilidade iônica; (HDMS^E) e em modo DIA; a separação da mobilidade iônica utilizou uma rampa de velocidade da onda IMS começando com 800 m s^{-1} e terminando com 500 m s^{-1} ; a energia de colisão de transferência aumentou de 25 V para 55 V no modo de alta energia; tensões cone e capilares de 30 V e 3000 V, respectivamente; nano fluxo de gás de 0,5 bar e gás de purga de 150 l h^{-1} ; e uma temperatura de fonte de $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

Nos parâmetros TOF, o tempo de varredura foi definido em 0,6 s no modo contínuo com um intervalo de massa de 50 a 2000 Da. Foi utilizado como calibrador externo o [Glu1]-fibrinopeptídeo B humano (Sigma-Aldrich) a $100 \text{ fmol } \mu\text{L}^{-1}$ e a aquisição de massa de bloqueio foi realizada a cada 30 s. A aquisição do espectro de massa foi realizada pelo software MassLynx v4.0.

4.13 Análise dos dados

O processamento dos espectros e banco de referência foram realizados utilizando o software ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v.3.02 (Waters) e o workflow foi com o software ISOQuant (Distler et al., 2014; Distler et al., 2016). Na análise do PLGS foram utilizados os seguintes parâmetros: Apex3D de 150 contagens como limite de baixa energia, 50 contagens como limite de energia elevada e 750 contagens como limite de intensidade; uma clivagem perdida; no mínimo três fragmentos de íon por peptídeos; no mínimo sete fragmentos de íon por proteína; no mínimo dois peptídeos por proteína; modificações fixas como carbamidometil (C) e modificações variáveis como oxidação (M) e fosforil (STY); a

taxa de falsas descobertas (FDR) para identificação de peptídeos e proteínas foi ajustada para um máximo de 1%, com um comprimento mínimo de seis aminoácidos.

Os dados proteômicos foram processados no banco de dados *C. papaya*, PhytozomeV11.0 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). A quantificação foi realizada usando o software ISOQuant v.1.7 usando configurações e algoritmos descritos anteriormente (Distler et al., 2014; Distler et al., 2016). Foi utilizada uma normalização multidimensional, que corrige as intensidades de pico com base nos domínios de intensidade e tempo de retenção, resumidamente, a análise incluiu alinhamento no tempo de retenção, e o exato tempo de retenção de massa (EMRT). A quantificação sem marcação foi estimada usando a abordagem de quantificação TOP3 (Silva et al., 2006). Seguido pelo processo de normalização multidimensional implementado no ISOQuant (Distler et al., 2014). A configuração detalhada do processamento do ISOQuant é fornecida em informações de suporte (Anexo 1). Depois da análise dos dados no ISOQuant, para assegurar a qualidade dos resultados, definimos os parâmetros de refinamento: apenas proteínas presentes nas três repetições biológicas foram consideradas para análise.

Finalmente, as proteínas foram submetidas à caracterização funcional pelo software OmicsBox software (www.biobam.com/omicsbox/). Essas sequências com o processo biológico não identificadas pelo OmicsBox foram analisados manualmente utilizando ferramentas de BLAST on-line: UniprotKB (<http://www.uniprot.org/blast/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>).

4.14 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados utilizando delineamento inteiramente casualizado. A contagem de embriões e matéria fresca foram realizadas com 10 repetições biológicas, para PAs e análise proteômica foram realizadas com três repetições biológicas e para carboidratos foram realizadas com cinco repetições biológicas. Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) ($P < 0,05$) seguida pelo teste de Student – Newman – Keuls (SNK), utilizando o software (R Team Core, 2014). A análise proteômica teve seus

valores de p corrigidos por Benjamini Hochberg a 5% de FDR. A análise de componentes principais (PCA) das proteínas diferencialmente acumuladas foi realizada usando o pacote ggbiplot no software (R Team Core, 2014).

5. RESULTADOS

5.1 Análise do desenvolvimento dos embriões somáticos

Após o período de maturação das culturas embriogênicas de *C. papaya* 'Golden' foi possível observar diferenças significativas no número de embriões somáticos em relação aos estádios de desenvolvimento e incremento da MF (Tabela 2). Os embriões somáticos foram contados de acordo com o estágio de desenvolvimento: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Figura 4 A-D).

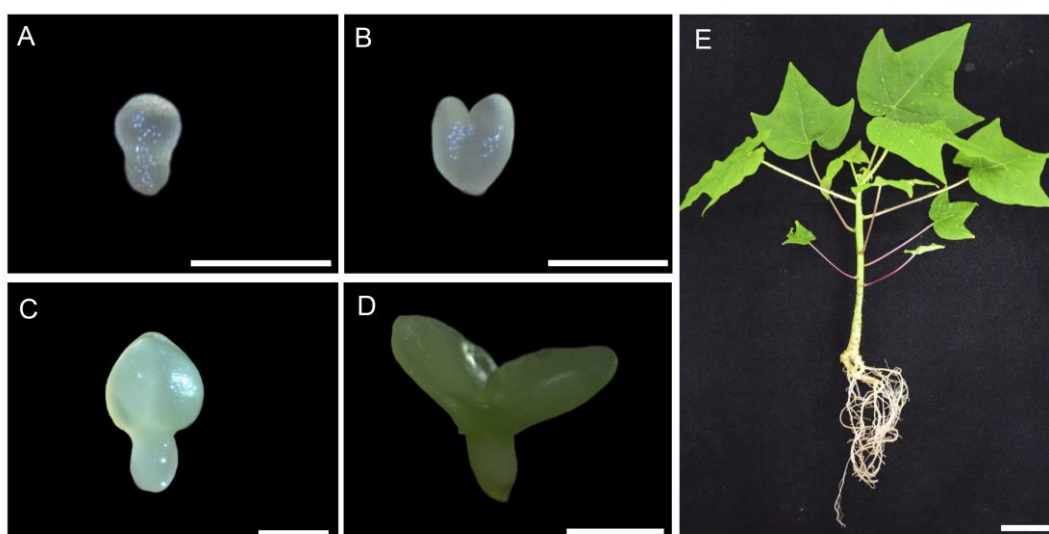


Figura 4. Visão geral dos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *C. papaya* L. 'Golden'. Embrião somático isolado no estágio globular (A), cordiforme (B), torpedo (C) e cotiledonar (D) e regeneração da plântula somática de mamão (E). Barras de escala em: A e B = 0,5 mm; C e D = 0,2 mm; E= 1,0 cm.

Embora fosse possível observar embriões somáticos no estágio globular, nos primeiros sete dias de maturação ocorreu um aumento significativo no número dos embriões no respectivo estágio aos 14 dias, bem como no número de embrião cordiforme (Tabela 2). Aos 21 dias de maturação observou-se uma diminuição no número de embriões somáticos globulares e ocorreu aumento no número de embriões somáticos cotiledonares (Tabela 2).

Tabela 2. Número de embriões somáticos em cada estágio de desenvolvimento e matéria fresca (MF) (900 mg de MF por placa de Petri), em *C. papaya* 'Golden' durante o período de maturação.

Número de embriões somáticos nos estádios de desenvolvimento	Maturação (dias)				CV (%)
	7	14	21	28	
Globular	29,30Ac*	104,30Aa	55,70Ab	15,00Bd	19,48
Cordiforme	0Bc	9,60Ba	6,50Bb	4,90Bb	47,28
Torpedo	0Bb	28,10Ba	26,10Ba	23,80Ba	25,52
Cotiledonar	0Bd	8,70Bc	50,90Ab	79,50Aa	19,48
Matéria Fresca (mg)	960b	1130b	1200b	1550a	18,91

*Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste SNK ($P < 0,05$). As letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os dias de cultura para cada estágio de desenvolvimento dos embriões somáticos. As letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre os diferentes estádios de desenvolvimento em cada tempo de maturação. $n = 10$. CV= Coeficiente de variação.

Após 28 dias de maturação, as culturas embriogênicas atingiram a maior quantidade de embriões somáticos cotiledonares (Tabela 2), estes embriões foram capazes de germinar *in vitro* e obteve-se a regeneração de plântulas somáticas de mamão (Figura 4 E). Os resultados mostraram que o maior número total de embriões somáticos (150,70 embriões por placa de Petri) foi registrado aos 14 dias quando comparado com outros períodos da maturação. Os embriões globulares foram o estágio mais representativo no período (Tabela 2). O número total de embriões somáticos (123,20 embriões por placa de Petri) aos 28 dias foi significativamente menor quando comparado com 14 e 21 dias (Tabela 2). Por outro lado, observou-se um aumento contínuo de MF durante o período de maturação, atingindo a média de (1550 g) por placa de Petri (Tabela 2) aos 28 dias de maturação.

5.2 Análises histomorfológica e histoquímica durante o período de maturação

Com o objetivo de caracterizar a evolução morfogênética e histodiferenciação dos embriões somáticos, foi realizado o estudo histomorfológico bem como histoquímico durante o período de maturação (Figura 5).

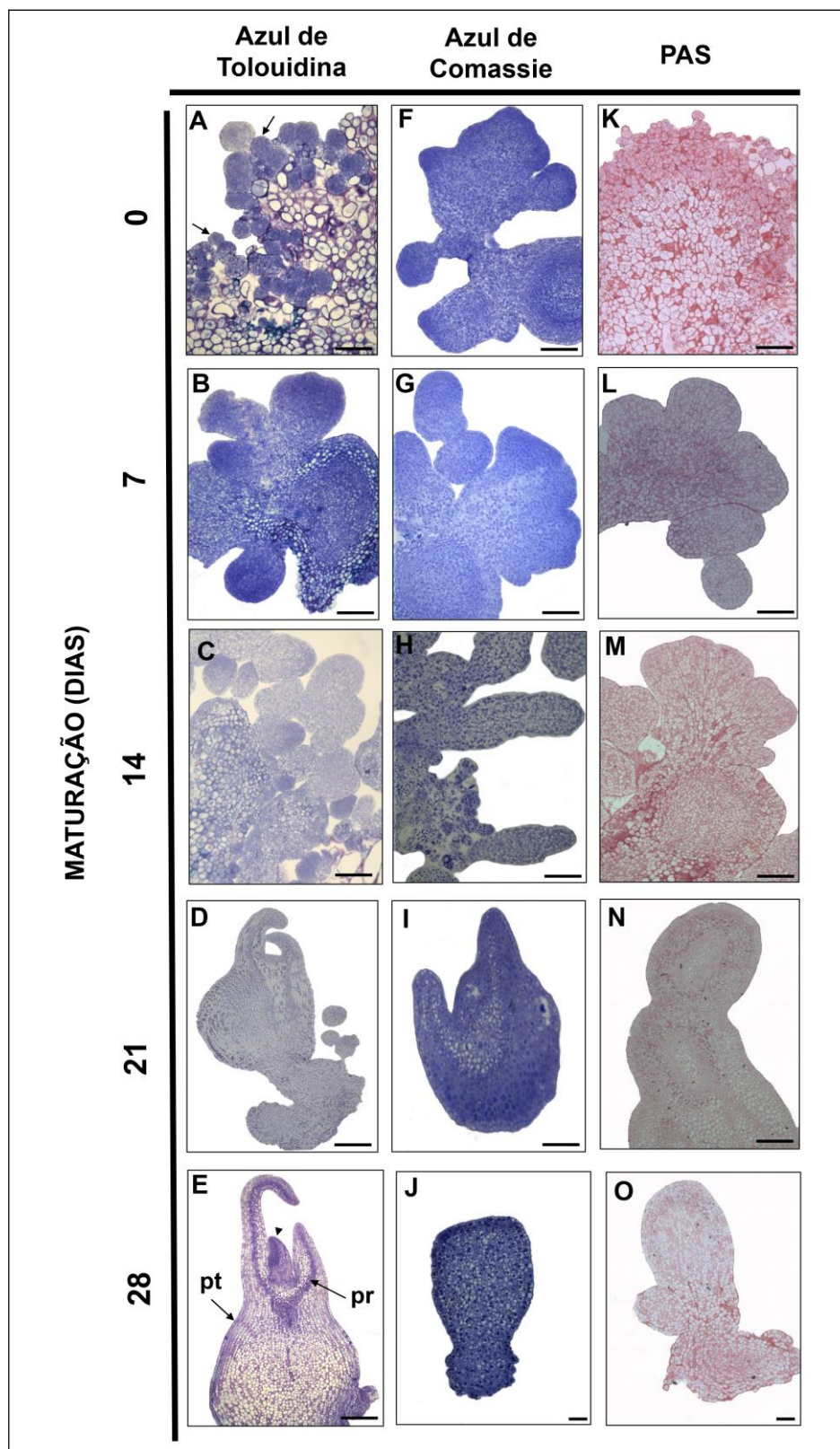


Figura 5. Aspectos histomorfológicos e histoquímicos de calos embriogênicos e embriões somáticos de *C. papaya* durante a maturação. Secções histológicas corada com azul de toluidina (A-E), azul brilhante de Coomassie (CBB) (F-J) e ácido periódico-Schiff (PAS) (K-O). Seta na figura (A) indicam formação dos embriões globulares, Cabeça de seta na figura (E) indica o desenvolvimento do meristema apical do caule, pt = protoderme, pr= procâmbio.

Os cortes que foram tratados com azul de toluidina mostraram reação ortocromática no citoplasma e reação metacromática na parede da célula, indicando a presença de polissacarídeos ácidos. As células embriogênicas foram caracterizadas por possuírem regiões meristemáticas, células com núcleos proeminentes, citoplasma densamente corado, vários planos de divisão e com suas células delimitadas por parede celular, antecedendo à formação do embrião globular que apresenta células pequenas e isodiamétricas, o citoplasma é denso e o núcleo evidente (Figura 5 A -E), e apresentaram diferenciação das células em embriões somáticos.

O embrião globular foi caracterizado por intensa divisão e a formação das células justapostas ao redor do embrião formando o procâmbio, e grande aglomerado de células meristemáticas na porção axial (Figura 5 A-B). No 28º dia foi possível observar o desenvolvimento do embrião cotiledonar, que apresentou vários tecidos meristemáticos como: protoderme, procâmbio, meristema fundamental e meristema apical do caule (Figura 5 E).

A análise histoquímica indicou a presença de compostos de reserva nos calos, os corpos proteicos foram detectados por reação positiva a CBB (Figuras 5 F-J). Foram observados corpos de proteínas no dia 0 e no 7º dia de maturação (Figura 5 F-G). O embrião torpedo no 28º dia de maturação apresentou menor reação ao corante CBB (Figura 5 J).

Polissacarídeos foram detectados por reação positiva ao corante PAS (Figuras 5K-O), essa reação positiva ocorre quando a presença de amido nas células no dia 0 e no 7º de maturação (Figura 5K-L), já no 14º dia de maturação quase não ocorreu reação positiva ao corante PAS, pois não foi possível observar a presença de amido (Figura 5 M) no 21º e 28º dia de maturação ocorreu novamente reação positivas onde notou-se a presença de amido (Figura 5 N-O), durante a quantificação de amido o 28º dia de maturação apresentou maior concentração, diferindo estatisticamente entre os demais dias de maturação (Figura 6 C).

5.3 Concentração de carboidratos e amido durante o período de maturação

Neste trabalho foram identificados e quantificados os teores dos carboidratos sacarose, frutose e glicose durante o período de maturação com intervalos de 7 dias até o período final de 28 dias de maturação, sendo possível acompanhar a morfogênese dos calos durante o período de maturação. Os níveis de sacarose apresentaram diferenças significativas onde tiveram um aumento até o 14^o dia quando alcançaram as maiores concentrações (12,08 mg. g⁻¹) com posterior redução ao 21^o dia de maturação (4,79 mg. g⁻¹), com um novo acréscimo no 28^o dia (9,28 mg. g⁻¹), (Figura 6 A).

Já para frutose a maior concentração ocorreu no 14^o dia de maturação (13,96 mg. g⁻¹), diferindo dos demais dias de maturação (Figura 6 B). Nas concentrações de glicose não houve diferenças significativas entre os dias de maturação. O maior teor de amido foi encontrado no 28^o dia de maturação onde apresentou a concentração de (22,51 mg. g⁻¹), diferindo estatisticamente entre os demais dias de maturação (Figura 6 C).

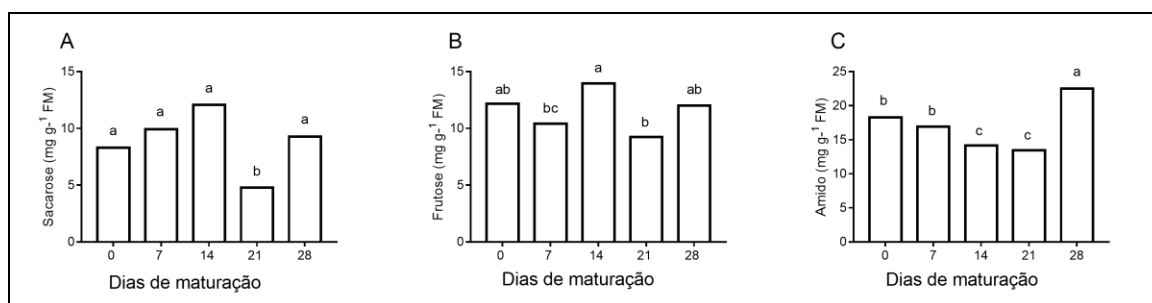


Figura 6. Conteúdo (mg g⁻¹ de MF) de sacarose (A), frutose (B), amido (C) durante o período de maturação de calos embriogênicos *C. papaya*. MF: Massa Fresca. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Coeficiente de variação CV. (n = 3; CV sacarose = 27,99%; CV glicose = 40,16%; CV frutose = 14,76%; CV amido = 10,93%).

5.4 PAs livres em calos embriogênicos e embriões somáticos

O conteúdo de PAs totais foi quantificado durante o período de maturação de calos embriogênicos bem como nos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar). Durante a

maturação dos calos embriogênicos foi observado que o conteúdo de PAs livres totais foi estatisticamente superior no dia 0 e no 14º dia de maturação (Figura 7).

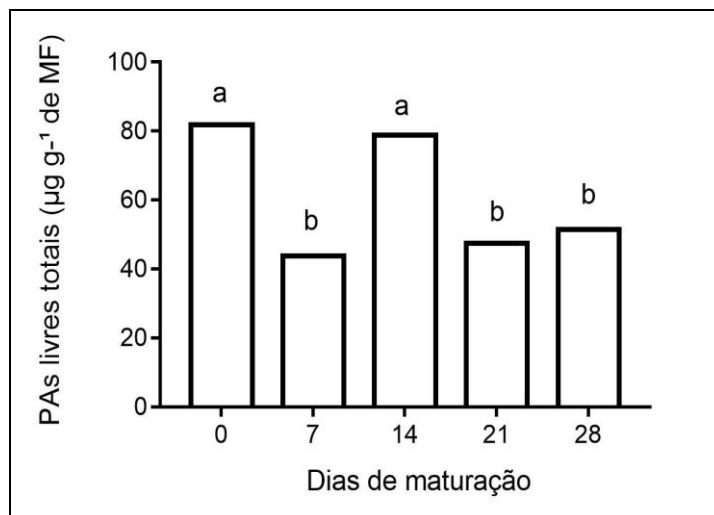


Figura 7: Conteúdo de PAs livres totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ de MF) durante o período de maturação de calos embriogênicos *C. papaya*. MF: Massa Fresca. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n=3$; CV PAs livres totais= 11,71%).

Durante o período de maturação dos calos embriogênicos foi possível detectar e quantificar Put, Spd e Spm livres (Figura 8). O conteúdo de Put livre foi significativamente maior nos calos embriogênicos que estavam no dia 0, ou seja, não estavam expostos ao meio de cultura de maturação (Figura 8 A). Já a maior concentração de Spd e Spm livres ocorreu no 7º dia de maturação (Figura 8 B, C).

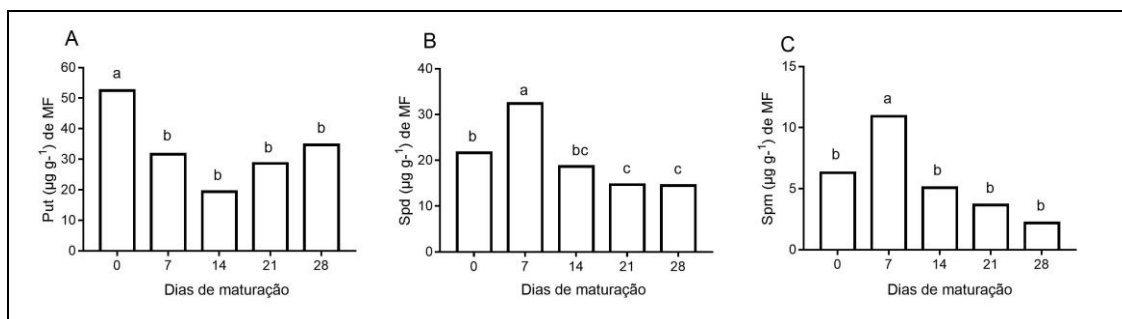


Figura 8: Conteúdo das PAs Put, Spd e Spm livres ($\mu\text{g g}^{-1}$ de MF) durante o período de maturação de calos embriogênicos *C. papaya*. MF: Massa Fresca. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n=3$; CV Put= 18,91%; CV Spd= 12,10%; CV Spm= 36,48%).

Com relação a razão das PAs [Put/(Spd+Spm)] observou-se que no dia 0, 21 e 28º de maturação apresentaram os maiores valores, não diferindo estatisticamente entre si em relação aos demais dias de maturação (Figura 9).

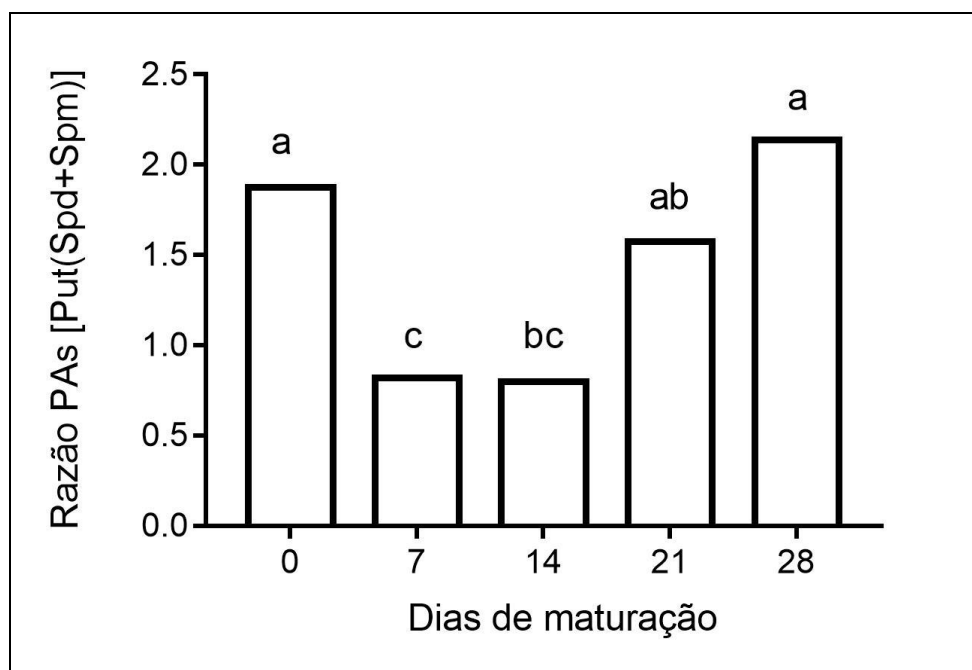


Figura 9: Razão entre PAs [Put/(Spd+Spm)] durante o período de maturação de calos embriogênicos *C. papaya*. MF: Massa Fresca. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n=3$; CV razão PAs= 26,45%).

O estágio de desenvolvimento torpedo apresentou maior conteúdo de PAs livres totais e foi estatisticamente superior aos demais estádios de desenvolvimento (Figura 10). Já o embrião globular apresentou o menor conteúdo de PAs livres totais. Este aumento no conteúdo de PAs livres totais no estágio torpedo deve-se principalmente aos aumentos de Put observados neste estágio de desenvolvimento (Figura 11).

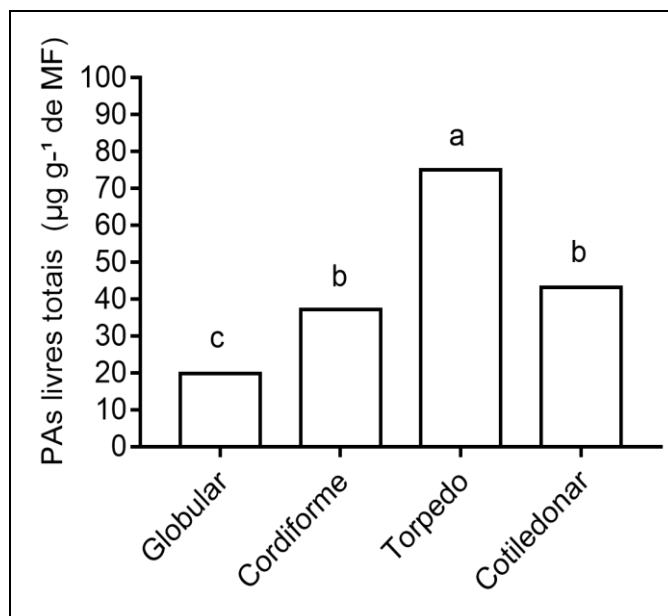


Figura 10: Conteúdo de PAs livres totais ($\mu\text{g g}^{-1}$ de MF) durante os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos em *C. papaya*. MF: Massa Fresca. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n=3$; CV PAs livres totais= 9,41%).

Neste estudo foi possível detectar e quantificar Put, Spd e Spm na forma livre durante todos os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos (Figura 11). O conteúdo de Put endógeno foi significativamente maior no embrião somático torpedo quando comparado aos outros estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos (Figura 11 A). Já as maiores concentrações de Spd ocorreram nos embriões torpedo e cotiledonar não havendo diferença significativa entre esses dois estádios de desenvolvimento (Figura 11 B). As concentrações de Spm não apresentaram diferenças significativas entre os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos (Figura 11 C).

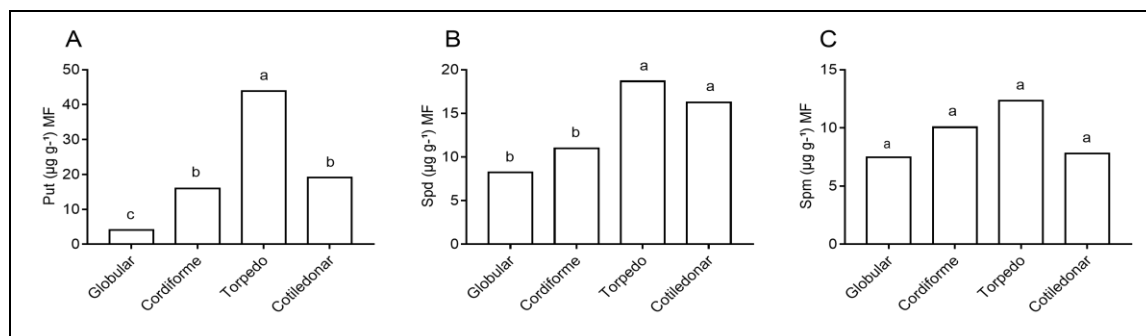


Figura 11: Conteúdo das PAs Put, Spd e Spm ($\mu\text{g g}^{-1}$ de MF) durante os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos em *C. papaya*. MF: Massa Fresca. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n=3$; CV Put= 13,69%; CV Spd= 20,46%; CV Spm= 22,02%).

Foi observado que nos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos a razão das PAs [Put/(Spd+Spm)], o estágio torpedo apresentou a maior razão, apresentando diferença significativa dos demais estádios de desenvolvimento (Figura 12).

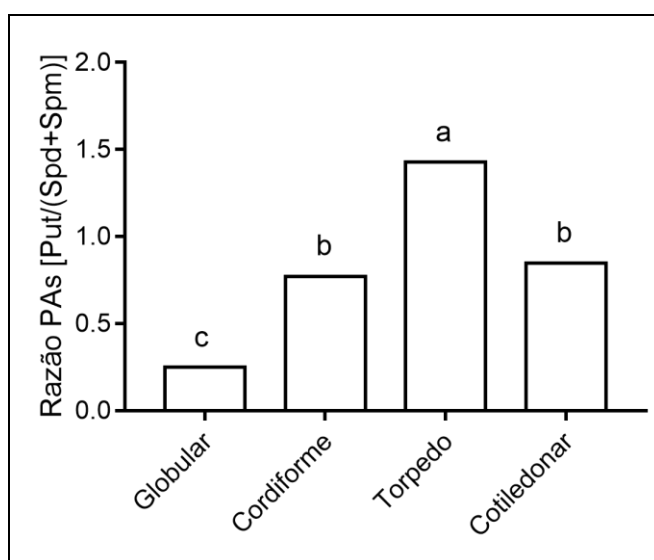


Figura 12: Razão entre PAs [Put/(Spd+Spm)] durante os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos em *C. papaya*. MF: Massa Fresca. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferenças estatísticas significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). ($n=3$; CV razão PAs= 23,80%).

5.5 Alterações no perfil proteômico em diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *C. papaya*

A quantificação das proteínas totais revelou um teor significativamente maior nos embriões somáticos globular, cordiforme e cotiledonar diferindo estatisticamente somente do embrião torpedo que apresentou menor teor (Figura 13).

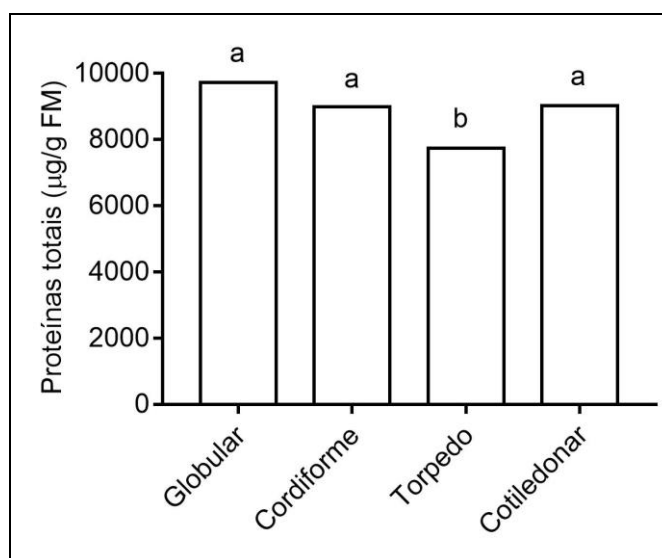


Figura 13: Proteínas totais em embriões somáticos de *C. papaya* cv. 'Golden' em diferentes estádios de desenvolvimento. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). CV = coeficiente de variação. ($n = 3$; CV = 5,85 %).

Na análise proteômica comparativa entre os diferentes estádios de desenvolvimento de embriões somáticos, foram identificadas e quantificadas um total de 800 proteínas, dessas proteínas, 736 atingiram os critérios estabelecidos para análise comparativa. Dentre as 736 proteínas diferencialmente acumuladas, 392 foram comuns nos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos onde 21 proteínas foram exclusivas destas 16 proteínas foram exclusivas no embrião globular, três proteínas exclusivas no cordiforme, uma proteína exclusiva no embrião torpedo e uma exclusiva no embrião cotiledonar (Figura 14).

Após análise estatística, 392 proteínas foram diferencialmente acumuladas e mostraram diferenças significativas no acúmulo relativo de proteínas, de acordo

com o teste de média SNK ($P < 0,05$) (Anexo 1). Após análise, agrupamos as 21 proteínas exclusivas e 37 proteínas que diferencialmente acumuladas e que apresentaram um perfil de acúmulo decrescente ou crescente ao longo dos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos (Tabela 3).

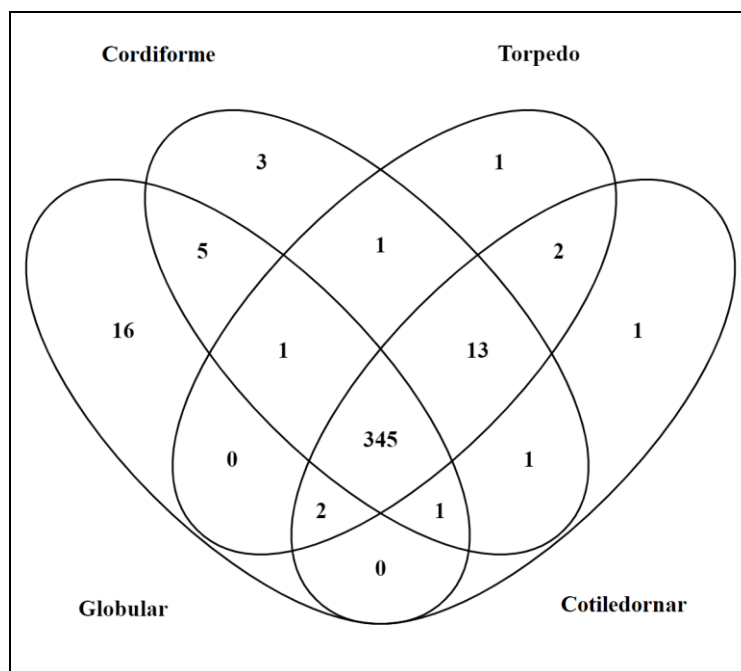


Figura 14. Diagrama de Venn das proteínas diferencialmente acumuladas. Ilustrando os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *C. papaya*. O diagrama mostra proteínas comuns entre os estádios e exclusivas em cada estágio de desenvolvimento.

A análise de PCA foi aplicada às proteínas diferencialmente acumuladas ($P < 0,05$), e o gráfico foi construído usando os dois primeiros componentes principais (Figura 15). Os resultados da PCA sugeriram que os dados de acúmulo de proteínas para os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *C. papaya* foram confiáveis e as proteínas diferencialmente acumuladas nos diferentes estádios tinham distinções significativas que podem ser críticas para a compreensão das diferenças ao longo do desenvolvimento dos embriões somáticos de *C. papaya*. PC1 e PC2 explicaram 78,6% da variância total. A análise demonstra uma clara separação dos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos, indicando que o estágio globular está completamente separado evidenciando a existência de uma distância entre os demais estádios de

desenvolvimento, enquanto os estádios torpedó e cotiledonar estão próximos sendo os estádios mais relacionados.

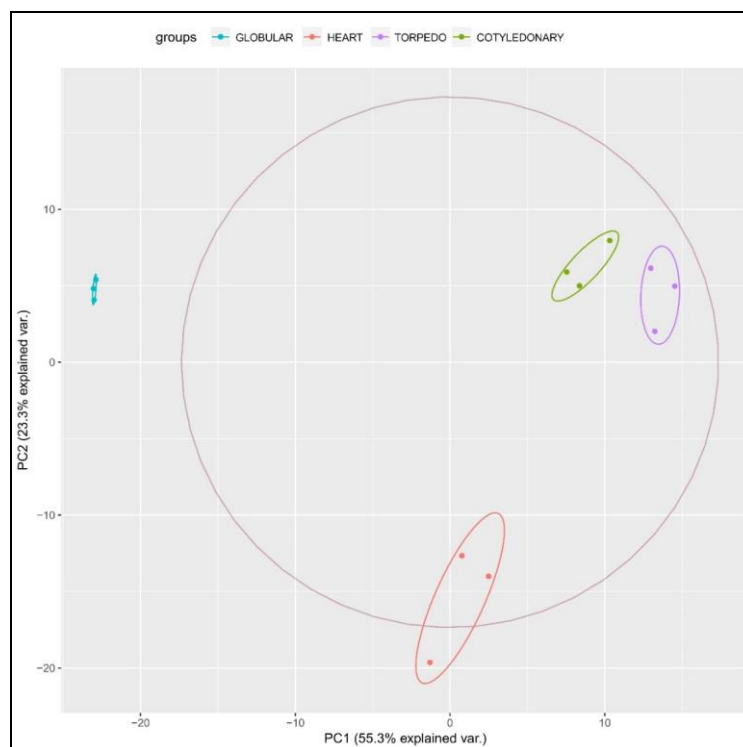


Figura 15. Análise de componentes principais (PCA) na separação de proteínas de acordo com os estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *C. papaya*. Embrião Globular, Cordiforme, Torpedó e Cotiledonar.

Durante a indução e o desenvolvimento de embriões somáticos, geralmente são associados com a mobilização de reservas como proteínas que estão presentes no explante tecidual ou no embrião em desenvolvimento para diferenciação das células somáticas. Entre as 392 proteínas acumuladas diferencialmente, foram gerados dois *heatmaps* com as proteínas listadas na (Tabela 3). No primeiro *heatmap* foram utilizadas apenas as 21 proteínas exclusivas nos embriões somáticos globular, cordiforme, torpedó e cotiledonar (Figura 16). O segundo *heatmap* foi construído usando 37 proteínas que apresentaram um padrão de aumento ou diminuição durante os estádios de desenvolvimento (Figura 17). Portanto, a discussão foi baseada nas proteínas exclusivas para cada estágio de desenvolvimento e nas proteínas que mostraram um perfil de aumento ou diminuição ao longo da diferenciação dos estágios.

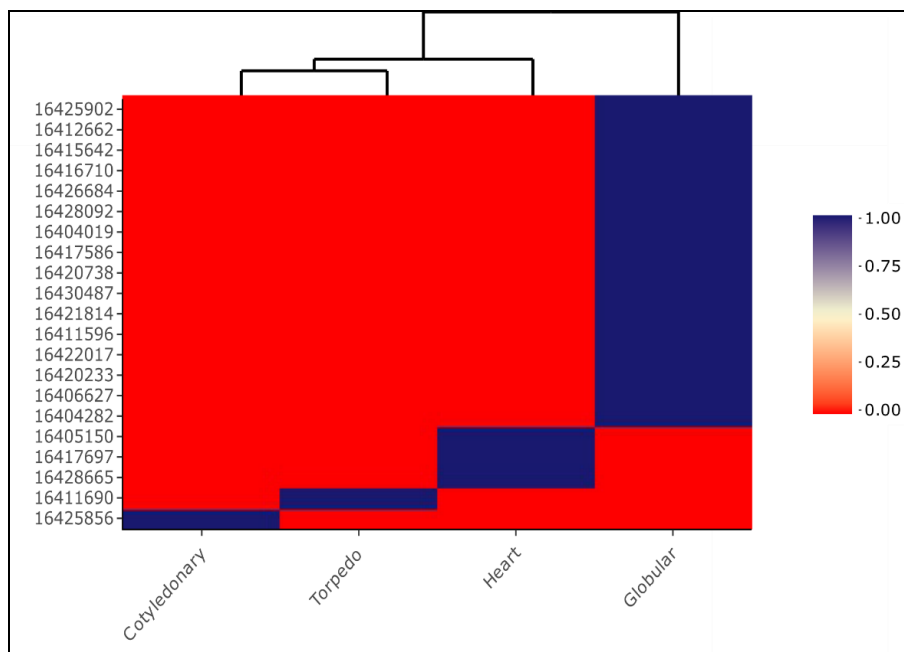


Figura 16. *Heatmap* de proteínas exclusivas durante os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *C. payaya* 'Golden'. Para cada proteína, foi fornecido o número de acesso. Azul indica proteínas únicas e vermelho significa diferença zero. A classificação representa as proporções dos níveis de acúmulo de proteínas.

Como pode ser visto na Figura 16, os embriões globulares representaram cerca de 76% das proteínas exclusivas identificadas dentre os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos. Sendo a maioria dessas proteínas relacionadas à maquinaria da síntese de proteínas (proteínas ribossomal 60S), tráfico intracelular de vesículas e transporte de proteínas (proteínas RAB). O acúmulo dessas classes de proteínas no início do desenvolvimento embrionário indica que há uma intensa síntese e transporte de proteínas, que servirão de base molecular para a transição correta dos embriões para os estágios subsequentes de desenvolvimento.

Dentre as 21 proteínas exclusivas, 16 proteínas foram exclusivas no embrião estágio globular, onde podemos destacar 7 isoformas das proteínas ribossomais 60S (60S L9; PACID - 16411596, 60S L11; PACID - 16422017, 60S L12; PACID - 16406627, 60S L18; PACID - 16420738, 60S L23; PACID - 16420233, 60S L23a; PACID - 16404282 e 60S L27; PACID), 3 proteínas da família RAB de proteínas relacionadas à Ras (RABA5A; PACID - 16415642, RABA5B; PACID - 16415642 e RABA6B; PACID - 16415642), 1 proteína DEAD-box ATP-dependente RNA helicase 20-like isoforma X1 (PACID - 16412662), 1

proteína glutationa S-transferase F13 (PACID - 16428092), 1 proteína catalase isoenzima 1 (PACID - 16425902), 1 proteína UDP-glicose 6-desidrogenase tipo 5 (PACID - 16404019), 1 proteína contendo repetição de pentatricopeptídeo At1g14470 (PACID - 16430487) e 1 proteína da família glicosil hidrolase (PACID - 16421814) três foram exclusivas do embrião estágio cordiforme, sendo elas, as proteínas RABE1c (PACID - 16428665), subunidade reguladora da protease 26S S10B homólogo B (PACID - 16405150), Cytochrome P450 71B10-like (PACID - 16417697) uma foi exclusiva do embrião estágio torpedo sendo a proteína ADP-ribosilação Fator 1 (PACID - 16411690) e a proteína xilose isomerase (PACID - 16425856) que foi exclusiva do embrião estágio cotiledonar.

Em relação às proteínas com padrão altamente acumulado no desenvolvimento inicial e decrescente ao longo dos estágios, podemos destacar três isoformas da proteína do ciclo de divisão celular 48 (CDC48; PACID - 16409681, PACID - 16424442, PACID - 16422730) e dois membros de Ras relacionados família de proteínas (RAB2BV; PACID - 16431634 e RABH1B; PACID - 16422091) (Tabela 3 e Figura 17).

Além disso, pode-se observar uma gama de proteínas relacionadas à biogênese mitocondrial e funções como as proteínas: componente 2 da acetiltransferase de resíduo de di-hidrolipoililina (PDCE2 2; PACID - 16405196), subunidade beta-1 do componente E1 do piruvato desidrogenase (PDH2; PACID - 16407157) , fumarato hidratase 1 (FUM1; PACID - 16415488), proteína de desacoplamento mitocondrial 1 (PUMP1; PACID - 16422697), ADP, proteína transportadora de ATP 1 (AAC1; PACID - 16427868), proteína transportadora de fosfato mitocondrial 3 (MPT3; PACID - 16425371), Gamma anidrase carbônica 2 (GAMMACAL2; PACID - 16407904), proteína de choque térmico de 70 kDa, mitocondrial (HSP70; PACID - 16413063) e a proteína chaperonina CPN60 (HSP60; PACID - 16414832) (Tabela 3 e Figura 17).

Por outro lado, existem várias proteínas com baixo acúmulo no início da embriogênese e que aumentam seu acúmulo até o estágio cotiledonar, como as proteínas cloroplásticas 2-Cys peroxiredoxina BAS1 (BAS1; PACID - 16405064), duas isoformas dependentes de NADPH aldeído redutase 1 (ChiADR1; PACID - 16420894; PACID - 16420895) e piruvato, fosfato dicinase (PPDK1; PACID - 1641011). Proteínas relacionadas ao desenvolvimento e maturação de sementes semelhantes aos estágios de desenvolvimento embrionário somático posteriores

também foram observadas com um acúmulo progressivo em abundância, incluindo quatro isoformas de vicilina (PACID - 16423896; PACID - 16422438; PACID - 16423052 e PACID - 16409088), uma proteína abundante em embriogênese tardia D-34 (LEA34; PACID - 16423076) e a isoforma X1 do tipo proteína-L-isoaspartato O-metiltransferase 1 (PIMT1; PACID - 16419197) (Tabela 3 e Figura 17).

Os diferentes padrões de acúmulo das proteínas durante os estádios de desenvolvimento dos embriões de *C. papaya*, ilustrados nas figuras 16 e 17, indicam que, no estágio globular, as mitocôndrias têm uma importância considerável no fornecimento da maior parte da fonte energética para processos celulares, como a tradução de proteínas. Com a transição entre os estádios de desenvolvimento, quando atingem o estágio cotiledonar, os embriões diminuem a quantidade de proteínas mitocondriais e começam a acumular proteínas cloroplásticas e de reserva. Isso demonstra que, nos estádios iniciais de desenvolvimento, os embriões ainda estão relacionados a fases heterotróficas, enquanto os embriões cotiledonares possuem a maquinaria celular para processos fotorrespiratórios e fontes de reserva sintetizadas, tornando-se autotróficos e capazes de avançar para o próximo estágio de germinação.

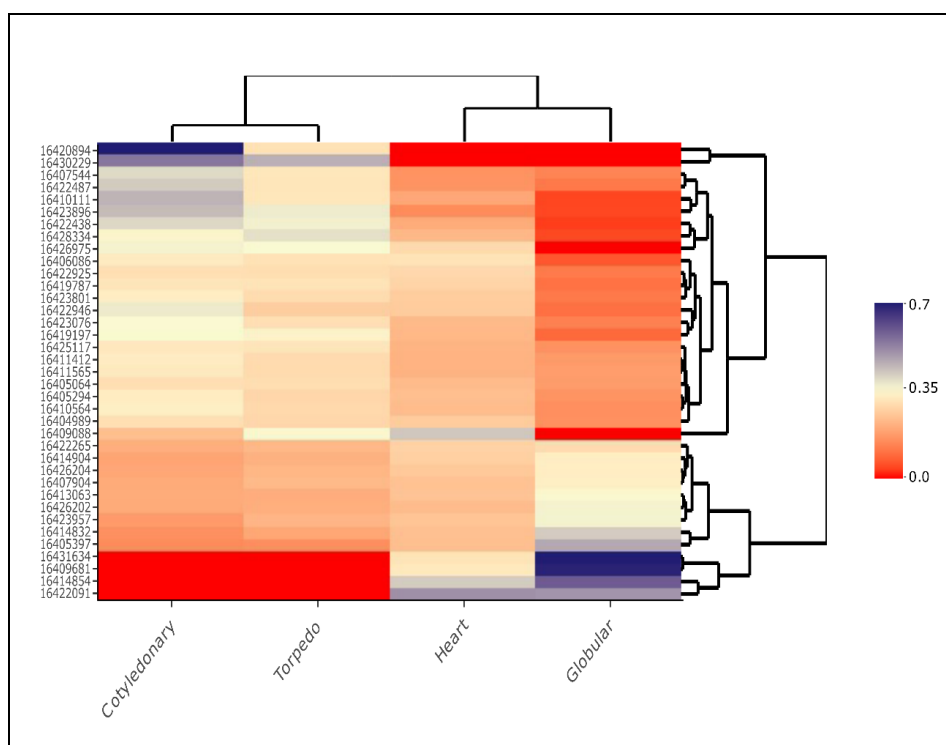


Figure 17. *Heatmap* das proteínas que apresentaram um perfil de acúmulo aumentando ou diminuindo ao longo dos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *C. papaya* 'Golden'. Azul indica o maior valor na contagem total de íons, branco indica o menor valor na contagem total de íons e vermelho significa valor na contagem total de íons zero.

Tabela 3. Proteínas exclusivas e diferencialmente acumuladas durante os estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *C. papaya*.

PAC ID Phytozome	Protein description OmicsBox	Biological process	Max score	Reported peptides	Normalized total ion count
16425902	Catalase isozyme 1	Response to oxidative stress	3103.43	6	
16404282	60S ribosomal protein L23a	Translation	8533.16	2	
16422017	60S ribosomal protein L11-1 isoform X1	Translation; Cellular process	4643.44	5	

Tabela 3 – Cont.

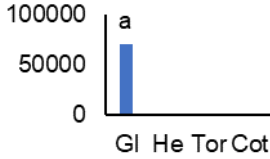
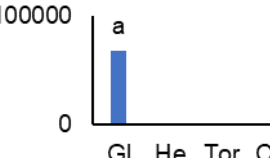
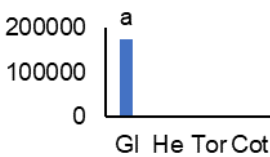
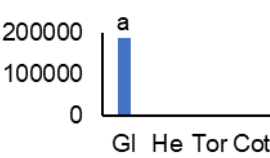
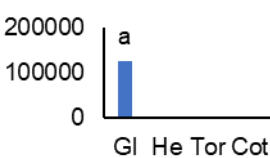


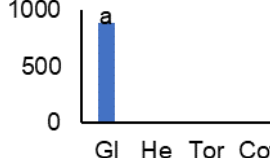
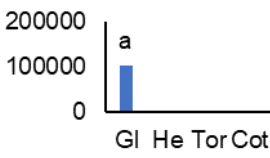
PAC ID Phytozome	Protein description OmicsBox	Biological process	Max score	Reported peptides	Normalized total ion count
16420738	60S ribosomal protein L18-3	Translation; Cellular process	1131.61	3	
16417586	60S ribosomal protein L27a-3-like	Translation; Cellular process	1254.03	3	
16420233	60S ribosomal protein L23	Translation; Post-embryonic development; Multicellular organismal development; Cellular process	5980.35	2	
16406627	60S ribosomal protein L12-1	Translation	3801.55	4	
16411596	60S ribosomal protein L9	Translation	2689.58	3	
16430487	Pentatricopeptide repeat-containing protein At1g14470	RNA modification	3372.44	5	
16428092	Glutathione S-transferase F13	Glutathione metabolic process; Toxin catabolic process	2850.23	3	
16412662	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 20-like isoform X1	mRNA splicing, via spliceosome; mRNA transport	933.78	2	
16421814	Glycosyl hydrolase family protein	Carbohydrate metabolic process	1614.79	2	

Tabela 3 – Cont.

PAC ID Phytozome	Protein description OmicsBox	Biological process	Max score	Reported peptides	Normalized total ion count										
16415642	Ras-related protein RABA5a	Transport; Cell communication	5887.58	4	<table border="1"> <caption>Normalized total ion count for 16415642</caption> <thead> <tr> <th>Phytozome</th> <th>Normalized total ion count</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Gl</td> <td>~25000</td> </tr> <tr> <td>He</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>Tor</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>Cot</td> <td>~0</td> </tr> </tbody> </table>	Phytozome	Normalized total ion count	Gl	~25000	He	~0	Tor	~0	Cot	~0
Phytozome	Normalized total ion count														
Gl	~25000														
He	~0														
Tor	~0														
Cot	~0														
16426684	Ras-related protein RABA5b-like	Transport; Cell communication	5320.12	2	<table border="1"> <caption>Normalized total ion count for 16426684</caption> <thead> <tr> <th>Phytozome</th> <th>Normalized total ion count</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Gl</td> <td>~4000</td> </tr> <tr> <td>He</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>Tor</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>Cot</td> <td>~0</td> </tr> </tbody> </table>	Phytozome	Normalized total ion count	Gl	~4000	He	~0	Tor	~0	Cot	~0
Phytozome	Normalized total ion count														
Gl	~4000														
He	~0														
Tor	~0														
Cot	~0														
16416710	Ras-related protein RABA6a-like	Transport; Cell communication	5481.27	2	<table border="1"> <caption>Normalized total ion count for 16416710</caption> <thead> <tr> <th>Phytozome</th> <th>Normalized total ion count</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Gl</td> <td>~3000</td> </tr> <tr> <td>He</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>Tor</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>Cot</td> <td>~0</td> </tr> </tbody> </table>	Phytozome	Normalized total ion count	Gl	~3000	He	~0	Tor	~0	Cot	~0
Phytozome	Normalized total ion count														
Gl	~3000														
He	~0														
Tor	~0														
Cot	~0														
16404019	UDP-glucose 6- dehydrogenase 5-like	Oxidation- reduction process; Polysaccharide biosynthetic process	1327.79	4	<table border="1"> <caption>Normalized total ion count for 16404019</caption> <thead> <tr> <th>Phytozome</th> <th>Normalized total ion count</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Gl</td> <td>~60000</td> </tr> <tr> <td>He</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>Tor</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>Cot</td> <td>~0</td> </tr> </tbody> </table>	Phytozome	Normalized total ion count	Gl	~60000	He	~0	Tor	~0	Cot	~0
Phytozome	Normalized total ion count														
Gl	~60000														
He	~0														
Tor	~0														
Cot	~0														
16405150	26S protease regulatory subunit S10B homolog B	Protein catabolic process	660.57	4	<table border="1"> <caption>Normalized total ion count for 16405150</caption> <thead> <tr> <th>Phytozome</th> <th>Normalized total ion count</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Gl</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>He</td> <td>~30000</td> </tr> <tr> <td>Tor</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>Cot</td> <td>~0</td> </tr> </tbody> </table>	Phytozome	Normalized total ion count	Gl	~0	He	~30000	Tor	~0	Cot	~0
Phytozome	Normalized total ion count														
Gl	~0														
He	~30000														
Tor	~0														
Cot	~0														
16428665	Ras-related protein RABE1c-like	Transport; Cell communication	3739.42	4	<table border="1"> <caption>Normalized total ion count for 16428665</caption> <thead> <tr> <th>Phytozome</th> <th>Normalized total ion count</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Gl</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>He</td> <td>~15000</td> </tr> <tr> <td>Tor</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>Cot</td> <td>~0</td> </tr> </tbody> </table>	Phytozome	Normalized total ion count	Gl	~0	He	~15000	Tor	~0	Cot	~0
Phytozome	Normalized total ion count														
Gl	~0														
He	~15000														
Tor	~0														
Cot	~0														
16417697	Cytochrome P450 71B10- like	Oxidation- reduction process	1406.35	4	<table border="1"> <caption>Normalized total ion count for 16417697</caption> <thead> <tr> <th>Phytozome</th> <th>Normalized total ion count</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Gl</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>He</td> <td>~35000</td> </tr> <tr> <td>Tor</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>Cot</td> <td>~0</td> </tr> </tbody> </table>	Phytozome	Normalized total ion count	Gl	~0	He	~35000	Tor	~0	Cot	~0
Phytozome	Normalized total ion count														
Gl	~0														
He	~35000														
Tor	~0														
Cot	~0														
16411690	ADP- ribosylation factor 1	Regulation of auxin metabolic process; Auxin- activated signaling pathway; Intracellular protein transport; Vesicle-mediated transport to the plasma membrane	21101.72	8	<table border="1"> <caption>Normalized total ion count for 16411690</caption> <thead> <tr> <th>Phytozome</th> <th>Normalized total ion count</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Gl</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>He</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>Tor</td> <td>~8000</td> </tr> <tr> <td>Cot</td> <td>~0</td> </tr> </tbody> </table>	Phytozome	Normalized total ion count	Gl	~0	He	~0	Tor	~8000	Cot	~0
Phytozome	Normalized total ion count														
Gl	~0														
He	~0														
Tor	~8000														
Cot	~0														

Tabela 3 – Cont.


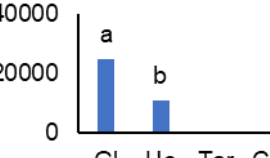

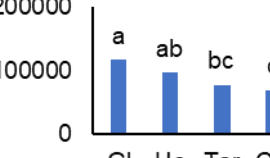
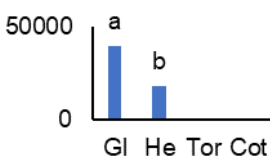
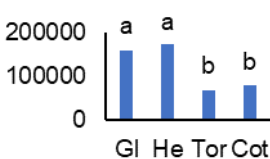
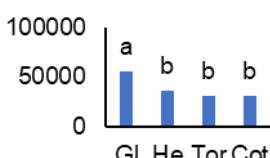
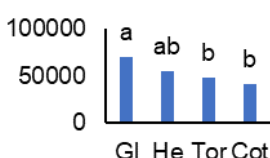
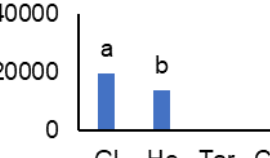
PAC ID Phytozome	Protein description OmicsBox	Biological process	Max score	Reported peptides	Normalized total ion count
16425856	Xylose isomerase	Carbohydrate metabolic process	4645.01	16	
16431634	Ras-related protein Rab2BV-like	Transport; Cell communication	5629.84	3	
16422091	Ras-related protein RABH1b	Transport; Cell communication	1588.25	4	
16414904	Acetolactate synthase small subunit 2, chloroplastic		1162.38	6	
16409681	Cell division cycle protein 48 homolog	Transport; Cellular component organization or biogenesis; Cell cycle; Cell division	3110.53	10	
16422730	cell division cycle protein 48 homolog	Transport; Cellular component organization or biogenesis; Cell cycle; Cell division	4505.82	18	
16426202	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic-like isoform X1		1055.29	4	
16426204	Arginyl-tRNA synthetase, class Ic		1379.98	3	
16414854	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 20	mRNA splicing, via spliceosome; mRNA transport	1022.45	3	

Tabela 3 – Cont.

PAC ID Phytozome	Protein description OmicsBox	Biological process	Max score	Reported peptides	Normalized total ion count
16407904	Gamma carbonic anhydrase-like 2, mitochondrial		884.69	5	
16423957	Glycine-rich RNA-binding protein-like		13713.01	5	
16413063	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial		10915.86	30	
16405397	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 36a-like		2053.83	6	
16422265	Elongation factor 1-alpha	Protein biosynthesis	30587.72	19	
16409088	Patellin-3		726.41	4	
16414832	Chaperonin CPN60-like 2, mitochondrial	Protein refolding; Mitochondrion organization	1808.71	4	
16406086	Ras-related protein RABD1	Transport; Cell communication	3988.72	6	
16426975	Ras-related protein Rab11C	Transport; Cell communication	5629.84	3	

Tabela 3 – Cont.

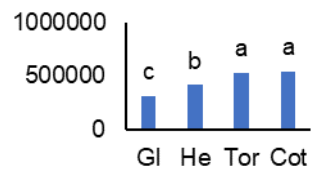
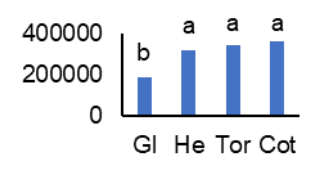
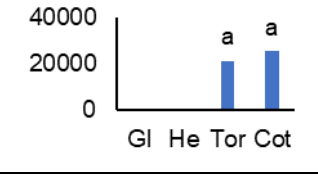
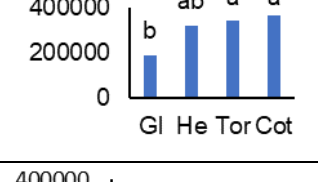

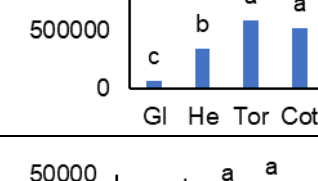
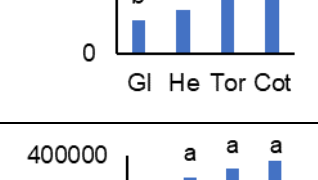
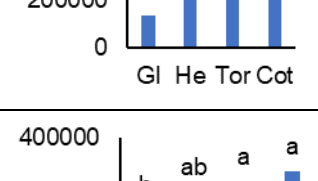
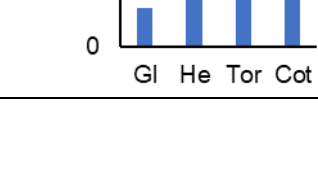
PAC ID Phytozome	Protein description OmicsBox	Biological process	Max score	Reported peptides	Normalized total ion count
16405064	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic		6377.62	13	
16404989	5- methyltetrahydr opteroyltrigluta mate-- homocysteine methyltransfera se-like		6263.60	27	
16430229	AICARFT/IMPC Hase bienzyme family protein isoform 2		893.22	3	
16410564	Bifunctional protein FOLD 2		1184.10	2	
16422946	Cysteine synthase		8231.09	5	
16428334	Universal stress protein PHOS32	Response to molecule of fungal origin	21371.06	6	
16411412	GTP-binding protein SAR1A		2647.88	6	
16423801	Heat shock 70 kDa protein		37138.43	24	
16405294	Heat shock protein 83		5032.37	26	

Tabela 3 – Cont.

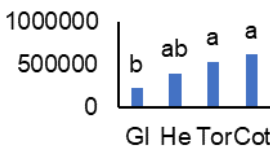
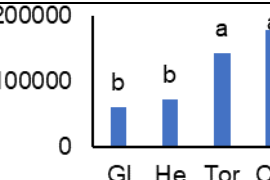
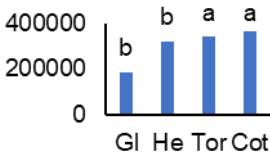
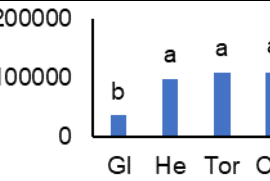
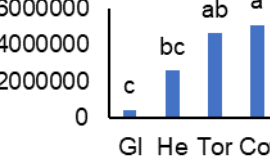
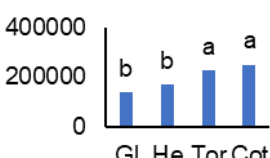
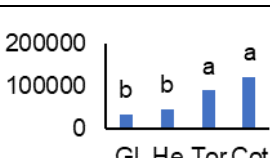
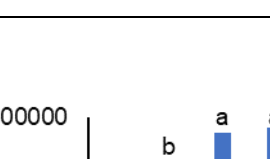
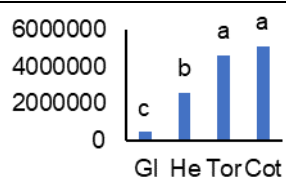
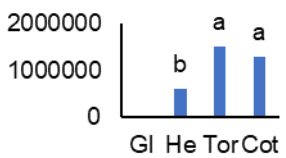
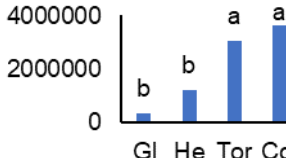
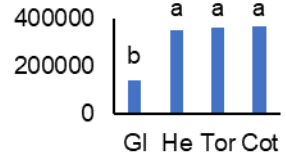
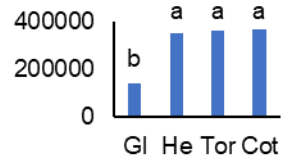
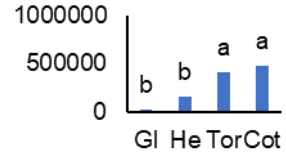
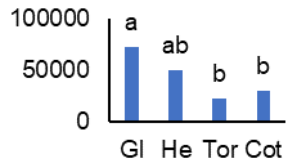
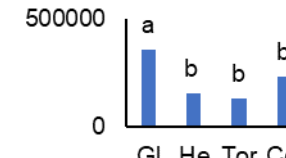
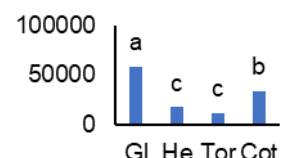
PAC ID Phytosome	Protein description OmicsBox	Biological process	Max score	Reported peptides	Normalized total ion count
16423076	Late embryogenesis abundant protein D-34	Stress response	7997.91	8	
16407544	Malate dehydrogenase, glyoxysomal		8650.70	10	
16425117	NADP-dependent malic enzyme		8042.33	20	
16419787	Nitronate monooxygenase		1062.18	4	
16410111	Pyruvate, phosphate dikinase, chloroplastic	Pyruvate metabolic process; Phosphorylation	3806.98	30	
16411565	S- formylglutathione hydrolase		4820.91	5	
16422487	Cysteine proteinase COT44	Germination	1127.82	2	
16419197	Protein - L- isoaspartate O- methyltransferase 1-like isoform X1	Post-embryonic development; Translation; Response to abiotic stimulus; Response to stress; Multicellular organismal development; Cellular process	1724.50	7	

Tabela 3 – Cont.

PAC ID Phytozome	Protein description OmicsBox	Biological process	Max score	Reported peptides	Normalized total ion count
16422438	7S vicilin	Storage	41793.0 0	23	
16423052	7S vicilin	Storage	23511.2 1	22	
16423896	Vicilin-like seed storage protein At2g28490	Storage	28656.4 7	18	
16422925	Dienelactone hydrolase	Chlorophyll catabolic process	5780.18	9	
16420894	NADPH- dependent aldehyde reductase 1, chloroplastic-like	Oxidation-reduction process	7930.85	7	
16420895	NADPH- dependent aldehyde reductase 1, chloroplastic-like	Oxidation-reduction process	13105.2 6	13	
16427868	ADP, ATP carrier protein 1		4687.24	5	
16407157	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-1, mitochondrial isoform X1	Acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate; glycolytic process	5295.8 0	4	
16415488	Fumarate hydratase 1, mitochondrial		1073.94	3	

6. DISCUSSÃO

6.1 Análise do desenvolvimento dos embriões somáticos

Os resultados mostraram que, aos 14 dias, houve um número estatisticamente maior de embriões somáticos no estágio globular, indicando que nesse período a maioria dos embriões atingiu o primeiro estágio de desenvolvimento (Tabela 2). Durante a maturação de calos embriogênicos do mamão 'Golden' Almeida et al. (2019), também observaram um número maior de embriões globulares aos 14 dias.

Entretanto, durante a maturação de embriões somáticos do mamão híbrido UENF/CALIMAN 01, foi observado um aumento significativo no número de embriões globulares nos primeiros 7 dias de maturação e esse número permaneceu constante até 14 dias (Vale et al., 2018). Esses resultados mostram que esse padrão de desenvolvimento é dependente do genótipo e a caracterização molecular e morfológica do estágio dos embriões somáticos é crucial para o desenvolvimento de protocolos mais adequados e eficazes para a embriogênese somática nos genótipos elite de mamão.

6.2 Carboidratos, análise histomorfológica e histoquímica

Durante a embriogênese somática ocorrem variações nos níveis de carboidratos e amido que podem fornecer informações importantes sobre os

mecanismos pelos quais os embriões são convertidos em plântulas (Pescador et al., 2008). No presente estudo, foi quantificado o maior teor de sacarose no 14º dia de maturação, podemos relacionar esse teor com a divisão e diferenciação celular que estava ocorrendo nos calos embriogênicos uma vez que foi contabilizado o maior número de embriões somáticos nesse período.

Durante a maturação de calos embriogênicos de *C. papaya* híbrido UENF/CALIMAN01 verificou-se que o metabolismo dos carboidratos foi diferencialmente acumulado com culturas tratado com PEG, que podem desempenhar papéis importantes na maturação dessas culturas (Vale et al., 2018). Vale et al. (2014) identificaram a proteína enolase, que é uma proteína chave da via glicolítica, que pode ser usada como marcador da fase de maturação de calos embriogênicos de mamão. Estes estudos reforçam o papel do metabolismo de carboidratos na maturação da cultura para esta espécie.

A diminuição dos níveis de sacarose no 21º dia de cultivo nos calos embriogênicos pode estar associada à sua degradação para o fornecimento de frutose e glicose e também à função regulatória que este açúcar parece exercer durante a diferenciação dos embriões somáticos uma vez que os embriões começam a alongar-se e inicia o desenvolvimento da radícula. Durante a germinação de embriões somáticos de cenoura foi verificado que altos níveis de sacarose são inibitórios para o desenvolvimento da radícula, sugerindo que baixas concentrações de sacarose parecem regular o desenvolvimento da raiz, sendo este açúcar apontado como uma molécula sinalizadora para o alongamento da radícula (Yang et al., 2004). Kubeš et al. (2014) sugerem que a sacarose pode exercer efeitos importantes na cascata de sinalização que desencadeia a embriogênese somática; no entanto, deve permanecer em níveis baixos por uma duração específica do período de cultivo.

O aumento do teor de amido no final do período da maturação sugere que esse aumento pode estar relacionado com o número de embriões somáticos. Sugerindo que a hidrólise do amido pode fornecer a energia necessária para a diferenciação celular durante o desenvolvimento dos embriões somáticos. He et al. (2011) afirma que o amido é um 'pool de carbono temporário' nas células e pode ser usado a qualquer momento para a biossíntese de outros carboidratos. Em algumas sementes, o amido serve como reserva temporária de energia e

carbono, disponível para uso durante todo o desenvolvimento biossintese de outras moléculas como lipídios e proteínas (Bewley et al., 2013).

No presente estudo, foi observada uma oscilação no conteúdo de frutose, o que pode estar relacionado com o desenvolvimento dos estádios dos embriões somáticos, uma vez que o desenvolvimento ocorre de forma muito rápida. Vale et al. (2018) identificaram em calos embriogênicos de *C. papaya* híbrido UENF/CALIMAN01 sacarose e glicose que foram reconhecidas por desempenhar papéis na expressão gênica para uma ampla gama de processos, como controle do ciclo celular, respostas ao estresse, energia armazenamento, diferenciação e desenvolvimento celular.

Nas análises histomorfológicas foi possível verificar que o calo embriogênico de *C. papaya* apresentou pequenas células isodiamétricas, com núcleos proeminentes e citoplasma denso, as células tratadas com azul de toluidina mostraram reação ortocromática no citoplasma e reação metacromática na célula parede, indicando a presença de polissacarídeos ácidos. Segundo Pilarska et al. (2013) essa reação metacromática pode estar relacionada com a presença de polissacarídeos importantes como a pectina, envolvida no crescimento, desenvolvimento e morfogênese dos vegetais.

Silveira et al. (2013) demonstraram que células embriogênicas são caracterizadas por pequenas células isodiamétricas contendo núcleos proeminentes e citoplasma denso, enquanto as células não embriogênicas são altamente vacuoladas e alongadas. Essas características apresentadas confirmam a caracterização do calo embriogênico relatado em *C. papaya* por (Vale et al., 2014).

Rocha et al. (2016) afirmam que os corpos protéicos se acumulam durante a formação de calos embriogênicos. Estes são rapidamente degradados por enzimas proteolíticas nos estádios iniciais do desenvolvimento no embrião, servindo como fontes de carbono e nitrogênio (Cangahuala-Inocente et al., 2004). Segundo Cangahuala-Inocente et al. (2014) a degradação dos corpos protéicos nos estádios iniciais da embriogênese somática é considerado crucial para a aquisição de competência embriogênica. Assim, sugere-se que altas concentrações de corpos protéicos no início da maturação pode ser fundamental para o sucesso na formação e desenvolvimento do embrião somático.

De acordo com de Carvalho Silva et al. (2014), o acúmulo de grânulos de amido no calo embriogênico pode ser associado ao processo de aquisição da competência embriogênica, além das alterações morfológicas, sabe-se que alterações fisiológicas também estão associadas à transição de células somáticas para o estado embriogênico. Rocha et al. (2016) identificaram o acúmulo de grânulos de amido no calo embriogênico de *Passiflora edulis* e sugeriu que é um passo importante para o sucesso da embriogênese somática.

Assim, podemos afirmar que os calos embriogênicos possuem regiões meristemáticas com células pequenas e isodiamétricas, citoplasmas densos e núcleos evidentes, apresentaram reação positiva ao corante azul de toluidina, bem como apresentaram reação positiva para o corante CBB corando proteínas e reação positiva ao corante PAS corando polissacarídeos podemos inferir que durante o período de maturação essas reações podem ser alteradas conforme ocorre a desdiferenciação dos embriões somáticos.

6.3 PAs em calos e nos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos

As PAs são compostos importantes para o desenvolvimento das plantas, especialmente para culturas *in vitro*. A modulação do metabolismo dos PAs durante a embriogênese somática foi estudada em diferentes espécies, demonstrando que os PAs endógenos são fundamentais para o desenvolvimento de embriões somáticos (Minocha et al., 1999; Santa-Catarina et al., 2006; Silveira et al., 2006; Kusano et al., 2008; Minocha et al., 2014).

Os dados mostraram que Put foi a PA mais abundante nos calos embriogênicos no dia 0 (Figura 8) já nos embriões somáticos a Put foi a PA mais abundante no estágio torpedo (Figura 11A), enquanto Spd teve sua maior quantidade nos estádios torpedo e cotiledonar (Figura 11B). Essa mesma tendência também foi relatada em *Acca sellowiana*, na qual os níveis de ambas as poliaminas aumentaram com o curso da embriogênese somática (Cangahuala-Inocente et al., 2014). Em embriões zigóticos de *Brassica rapa* L. Puga-Hermida et al. (2003) observaram que o acúmulo máximo de Put coincidia com o maior crescimento e células em divisão. Santa-Catarina et al. (2006) observaram uma relação entre o aumento da concentração de poliaminas e a divisão celular das

culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis*. Embriões somáticos de *Pinus radiata* apresentaram os maiores níveis de Spd em embriões germináveis (Minocha et al., 1999). Esses dados indicam um papel de Put e Spd nas fases posteriores do desenvolvimento embrionário do mamão, possivelmente atuando no controle da divisão e diferenciação celular, mediando o desenvolvimento de embriões somáticos.

Através da análise proteômica identificou-se algumas proteínas relacionadas à biossíntese de PAs, reforçando a ideia de sua importância na diferenciação de embriões somáticos de mamão. A proteína acetilornitina desacetilase (PACID - 16414453), apresentou um acúmulo que foi aumentando conforme a progressão do desenvolvimento embrionário (Tabela S1). Esta proteína está envolvida na etapa 1 da rota de síntese da L-ornitina a partir de N (2) -acetil-L-ornitina, que faz parte da biossíntese das PAs, a biossíntese de ornitina em plantas é catalisada por N2-acetilornitina: N-acetilglutamato via da acetiltransferase uma via cíclica (Slocum, 2005). Majumdar et al. (2013) propuseram um papel direto da ornitina na regulação não apenas de sua própria biossíntese, mas também de toda a via de glutamato e arginina, incluindo um papel crítico na regulação da biossíntese de PAs.

Além disso, também foi identificado a proteína S-adenosilmetionina sintase 2 (PACID - 16409125) que apresentou maior acúmulo no estágio cordiforme (Tabela S1). A S-adenosilmetionina sintase (SAMS) catalisa a síntese de S-adenosilmetionina, que atua na síntese de PAs (He et al., 2019). Ravanel et al. (1998) descobriram que a SAMS é uma enzima chave na síntese de metionina e o precursor metabólico SAM do aspartato, e atuam alimentando a produção de etileno e PAs no interior da célula, por isso está associada com várias reações essenciais para o desenvolvimento das plantas.

Reis et al. (2016) e Satish et al. (2016) afirmam que as poliaminas participam fundamentalmente nas etapas de indução e maturação na embriogênese somática. Portanto, os resultados deste trabalho reforçam a importância dessa proteína nos tecidos embriogênicos, sugerindo sua participação nos processos de detoxificação celular, fornecimento de energia, controle da metilação de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lípidos, biossíntese de poliaminas e etileno, manutenção da homeostase e formação da parede celular.

De acordo com Minocha et al. (1999) durante as fases de desenvolvimento de embriões zigóticos de *Pinus radiata* a fase de estabelecimento dos meristemas apicais e radiculares ocorre o alongamento dos cotilédones e o acúmulo de substâncias de reserva; e Spd é a PA predominante com relação à Put e Spm. No entanto, neste estudo, os embriões nos estádios torpedo e o cotiledonar não mostraram diferença significativa no conteúdo de Spd, e o embrião cotiledonar apresentou um declínio no conteúdo de Put. Isso pode estar relacionado ao fato do embrião estar em pleno desenvolvimento e alongamento dos cotilédones (Figura 4 F).

Shukla et al. (2008) investigaram o papel das PAs na embriogênese somática de *C. papaya*, e afirmam que as PAs desempenham um papel positivo na indução da embriogênese somática, indicando que 100 μM de Put desempenhou um papel significativo na indução da embriogênese direta no mamão. Adicionalmente, Kumari et al. (2018) obtiveram um aumento de três vezes o número de embriões somáticos no meio suplementado com 100 μM de Spd durante a embriogênese somática de três cultivares de *C. papaya* na Índia.

Portanto, essas duas proteínas podem estar ligadas à biossíntese de PAs e, conseqüentemente, contribuir para o acúmulo de PAs no desenvolvimento de calos embriogênicos e dos embriões somáticos em seus diferentes estádios de desenvolvimento.

6.4 Análise proteômica comparativa durante o desenvolvimento dos embriões somáticos

Durante o desenvolvimento dos embriões somáticos de *C. papaya* ocorreram alterações no perfil proteico. As proteínas são moléculas importantes envolvidas em processos ligados ao crescimento e desenvolvimento e embrionário, os estádios globular, cordiforme e cotiledonar apresentaram maior teor na quantificação de proteínas totais (Figura 13).

6.4.1 Proteínas estágio-específicas durante o desenvolvimento de embriões somáticos

De acordo com a análise proteômica entre os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos, foram identificadas 21 proteínas exclusivas onde o

estádio globular representou o estágio com mais proteínas exclusivas (16), sendo a maioria proteínas ribossomais, com 7 isoformas de proteínas ribossomais 60S (Tabela 3). Isso sugere que no início da embriogênese somática do mamão há uma alta atividade de tradução. As proteínas ribossomais atuam na biossíntese de proteínas, diversas proteínas ribossomais com isoformas diferentes também foram identificadas no desenvolvimento e reprogramação de protoplastos em *Physcomitrella patens* (Wang et al., 2017). O metabolismo proteico é muito intenso nas células embriogênicas e as proteínas ribossômicas já foram relatadas na embriogênese somática de outras espécies (Heringer et al., 2018). Portanto, o metabolismo proteico representa um evento-chave no desenvolvimento inicial dos embriões somáticos de mamão.

Além disso, a proteína DEAD-box ATP dependente RNA helicase 20-like isoforma X1 (RH20; PACID = 16412662) também foi identificada como exclusiva no estágio globular (Tabela 3). As helicases de RNA são enzimas altamente conservadas que modulam a estrutura do RNA. Essa enzima está relacionada a vários processos biológicos que envolvem RNA, como transcrição, splicing, tradução, além da embriogênese, divisão celular e diferenciação (Gustafson and Wessel, 2010). As proteínas RH20 participam de quase todos os processos metabólicos do RNA e de múltiplas respostas ao estresse abiótico (Yang et al., 2014). Uma proteína homóloga de RH20 também foi identificada nos embriões globular e cordiforme (Tabela 3). O acúmulo dessas enzimas, bem como das proteínas ribossomais nos estágios iniciais do desenvolvimento dos embriões somáticos de mamão, sugere um papel importante do metabolismo de RNA e proteínas no início da embriogênese somática do mamão.

Durante os estágios iniciais de desenvolvimento (embriões globular e cordiforme), várias proteínas da família Rab foram identificadas. As proteínas RABA5A, RABA5B, e RABA6A foram exclusivas no embrião globular e a RABE1C foi exclusiva no estágio cordiforme (Tabela 3).

Além disso, duas proteínas da família RAB (RAB2BV e RABH1b) também foram identificados apenas nos embriões globular e cordiforme e não foram mais observados nos estágios de desenvolvimento (torpedo e cotiledonar) (Tabela 3). As proteínas RAB GTPase são um componente essencial na formação de vesículas a partir de uma membrana doadora, no transporte, amarração e fusão

de vesículas de tráfego para uma membrana alvo, controlando processos como o movimento e maturação das organelas (Minamino and Ueda, 2019).

Membros da família de proteínas RAB foram relatados no início da embriogênese para outras espécies incluindo papaya cv. Golden (Gonçalves et al., 2007; Quinga et al., 2018; Almeida et al., 2019). De acordo com esses achados e conforme apontado em outros estudos, propõe-se que o acúmulo de RAB GTPases seja especialmente importante durante os estágios iniciais da embriogênese, participando do processo de ancoragem das vesículas derivadas do Retículo Endoplasmático com a via de Golgi nas células que devem sofrer rápido crescimento e biogênese da membrana (Gonçalves et al., 2007; Quinga et al., 2018).

O embrião globular também apresentou as proteínas exclusivas glutathione S-transferase F13 (GSTF13; PACID = 16428092) e catalase isoenzima 1 (CAT1; PACID – 16425902) (Tabela 3). Ambas as enzimas atuam de maneira antioxidante, respondendo às condições de estresse, promovidas principalmente pelo herbicida 2,4-D (Pazmino et al., 2011) e são constantemente identificadas em estudos proteômicos durante a embriogênese somática (Heringer et al., 2018). O estresse induzido pelo 2,4-D é essencial na aquisição da competência embriogênica, porém as células precisam de uma maquinaria eficiente para manter a homeostase celular e tornar-se tolerante ao estresse (Fehér, 2015; Heringer et al., 2018).

As GSTs catalisam a conjugação de tripéptido glutathione (GSH) em moléculas de herbicida para obter compostos menos tóxicos (Gong et al., 2005). As proteínas CATs são importantes na eliminação de espécies reativas de oxigênio induzidas por 2,4-D (ROS), ajudando a diminuir os efeitos tóxicos desse herbicida (Del Río et al., 2016). Assim, esses achados sugerem que as enzimas antioxidantes GST e CAT desempenham um papel importante na formação de embriões somáticos de mamão, servindo como mecanismos para promover a tolerância ao estresse e a homeostase celular durante condições de cultivo *in vitro*. A proteína UDP-glicose 6-desidrogenase tipo 5 (UGD5; PACID – 16404019) foi exclusiva no estágio globular (Tabela 3) essa proteína está envolvida na biossíntese do ácido UDP-ácido glucurônico descarboxilase: (UDP-GlcA), sendo extremamente importante no fornecimento de açúcares nucleotídeos para polímeros da parede celular (Klinghammer and Tenhaken, 2007).

Essa enzima já é relatada em investigações de eventos moleculares precoces do desenvolvimento de embriões somáticos em *Pinus pinaster* Ait. (Morel et al., 2014), em massas embriogênicas de *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] durante as fases de proliferação (Gautier et al., 2019) e na embriogênese somática de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (Gulzar et al., 2019). As UGDs são importantes para a síntese de polissacarídeos da parede celular, e a identificação dessa enzima no estágio de desenvolvimento do embrião globular de mamão indica a participação no metabolismo dos carboidratos, que é importante no desenvolvimento estrutural de embriões somáticos e na síntese da parede celular, promovendo o correto crescimento e desenvolvimento celular.

No embrião cordiforme foi identificada a proteína subunidade reguladora da protease 26S S10B homólogo B (RPT4B; PACID - 16405150) (Tabela 3). O proteossoma 26S está envolvido no processo de renovação de proteínas, reconhecendo o substrato ubiquitinado para proteólise (Kurepa and Smalle, 2008). O proteossoma 26S é composto pelo complexo proteolítico 20S e regulatório 19S. O complexo regulatório inclui outros subcomplexos compostos de ATPases, como a RPT4B, que interage com ARQUITETURA RAIZ ASSOCIADA1 (RAA1), levando à sua proteólise e, assim, regulando a divisão celular em células meristemáticas radiculares (Han et al., 2008). Além disso, o RPT4B foi enriquecido no estudo do interactoma com a proteína CDC48, indicando uma participação do RPT4B na degradação do CDC48 (Bègue et al., 2019). Conforme observado no presente estudo (Tabela 3 e S1), no qual as proteínas CDC48 foram identificadas nos estádios globular e cordiforme e após esses estágios, com o acúmulo de RPT4B nos embriões cordiformes, não foram mais identificados nos estágios finais (Tabela 3 e S1). Esses achados sugerem a participação do RPT4B na regulação do processo de renovação de proteínas envolvidas na morfogênese radicular primária e nas vias CDC48 durante o desenvolvimento de embriões somáticos de mamão.

No embrião torpedo, apenas a proteína ADP-ribosilação Fator 1 (ARF1; PACID – 16411690) foi identificada como exclusiva (Tabela 3). Essa proteína é necessária para que ocorra a reciclagem de transportadores de auxina PIN-FORMED (PINs), mediando o transporte direcional de auxina entre células e, conseqüentemente, as vias de desenvolvimento mediadas por auxina (Tanaka et al., 2014). Os mutantes de *Arabidopsis* ARF1 mostraram um gradiente de

resposta de auxina prejudicado, causando defeitos no padrão embrionário e a parada no crescimento (Tanaka et al., 2014).

Consistente com a importância do desenvolvimento dos portadores de auxina, o ARF1 também é responsável pelo estabelecimento de gradientes de auxina que determinam a polaridade do embrião e o eixo principal do embrião (Su et al., 2009). Márquez-López et al. (2018) verificaram a dinâmica do transporte e localização da auxina durante a embriogênese somática em *Coffea canephora* L. sugerindo que no estágio globular a auxina é distribuída uniformemente. No entanto, durante os seguintes estádios de desenvolvimento, as auxinas são mobilizadas para um conjunto específico de células, onde esse transporte é mediado pela PIN1. Assim, o acúmulo de ARF1 no estágio torpedo sugere-se que esta enzima pode desempenhar um papel crucial no transporte de auxina para diferenciação de embriões somáticos de mamão.

No estágio final de desenvolvimento o embrião cotiledonar, a proteína xilose isomerase (XYLA; PACID - 16425856) foi identificada como exclusiva (Tabela 3). A XYLA catalisa a isomerização entre D-xilose e D-xilulose, que são componentes de polissacarídeos da parede celular de embriões somáticos (Yeo et al., 1998). Essa enzima também é identificada nos embriões cotiledonares do mamão (Vale et al., 2014) e na etapa final de maturação do calo embriogênico da cana-de-açúcar (Heringer et al., 2017).

O acúmulo da proteína xilose isomerase no embrião cotiledonar sugere que esta enzima pode desempenhar um papel crucial no fornecimento de energia para o desenvolvimento cotilédones e o desenvolvimento inicial da raiz no embrião somático, semelhante à embriogênese zigótica, os embriões somáticos se desenvolvem com a orientação apical e basal assimetria, resultando em formação apropriada de embriões e suspensões, respectivamente. O acúmulo de XYLA apenas no embrião cotiledonar sugere que essa enzima pode desempenhar um importante papel na mediação das fontes de carboidratos e polissacarídeos para processos de desenvolvimento, como formação da parede celular e crescimento celular no final da embriogênese somática do mamão.

6.4.2 Proteínas com diferentes padrões de acúmulos durante os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de mamão

No presente trabalho, foram identificadas 45 proteínas que mostraram uma tendência de acúmulo congruente, aumentando ou diminuindo seu acúmulo durante o desenvolvimento de embriões somáticos (Tabela 3). Em relação às proteínas com padrão altamente acumulado no desenvolvimento inicial e decrescente ao longo dos estágios, podemos destacar uma gama de proteínas relacionadas à biogênese mitocondrial e funções, incluindo as proteínas PDCE2, PDH2, FUM1, PUMP1, AAC1, MPT3, GAMMACAL2, PHB3, HSP70 e HSP60 (Tabela 3, S1 e Figura 17). As mitocôndrias são vistas como protagonistas da embriogênese somática, regulando a homeostase celular através do controle dos estados redox, morte celular programada, suprimento de energia e compostos metabólicos, integrando respostas ao estresse no desenvolvimento embrionário (Arnholdt-Schmitt et al., 2016).

As proteínas PDCE2 e PDH2 são membros do complexo piruvato desidrogenase e o FUM1 catalisa a hidratação do fumarato em L-malato no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), essas enzimas são identificadas na embriogênese somática de diferentes espécies e têm sido associadas ao suprimento de energia (Lyngved et al., 2008; Correia et al., 2012; Liu et al., 2018). Também foram identificadas proteínas portadores mitocondriais PUMP1, AAC1, MPT3 e GAMMACAL2. PUMP1 criam vazamentos de prótons através da membrana mitocondrial e medeia a fosforilação oxidativa Borecký et al. (2001), AAC1 são responsáveis pelo transporte de ADP/ATP através da membrana mitocondrial Pebay-Peyroula et al. (2003), MPT3 regulam a troca de fosfato do citosol para a matriz mitocondrial Zhu et al. (2012) e o GAMMACAL2 que estão associados à montagem e respiração do complexo mitocondrial (Martin et al., 2009). A identificação dessas proteínas no início do desenvolvimento embrionário indica que a mitocôndria é a principal fonte de energia para o desenvolvimento de embriões durante suas fases heterotróficas.

Além disso, a proteína PHB3 participa da estabilização da proteína mitocondrial recém-sintetizada, sendo essencial em vários processos, como respostas hormonais, a interação entre respostas de óxido nítrico induzidas por H₂O₂, aquisição da tolerância ao estresse e desenvolvimento de meristemas de

parte aérea e raiz (Van Aken et al., 2010). Os PHBs são expressos mais abundantemente em células jovens e em desenvolvimento, como embriões e mutantes de *Arabidopsis* para AtPHB3, que não produziram sementes viáveis (Van Aken et al., 2010). Além disso, a proteína Mge2 funciona como uma cochaperona no complexo HSP70, regulando o enovelamento dos peptídeos protéicos mitocondriais nascentes, translocação de proteínas precursoras em organelas e reenovelamento de proteínas mitocondriais desnaturadas sob condições de estresse (Hu et al., 2012).

A proteína HSP60 ajuda no enovelamento e reenovelamento correto da proteína mitocondrial transportada, bem como na prevenção de proteínas mitocondriais mal enoveladas, desnaturadas e agregadas causadas por condições de estresse (Haq et al., 2019). As proteínas HSP60 e HSP70 já foram relatadas em calos embriogênicos para diferentes espécies (Lyngved et al., 2008; Zhang et al., 2009; Gulzar et al., 2019), como em nossos resultados, sugerindo uma relevante participação dessas proteínas no correto funcionamento mitocondrial em resposta ao estresse promovido pelo ambiente *in vitro* durante o desenvolvimento de embriões somáticos de mamão.

Entre as proteínas que apresentaram aumento no acúmulo nos estágios iniciais e diminuíram seu acúmulo ao longo dos estágios, podemos destacar três isoformas do CDC48 (Tabela 3). Sabe-se que o CDC48 está envolvido nas vias mediadas pela ubiquitina, no controle e degradação da qualidade das proteínas, fusão de membranas, replicação do DNA e reparação de danos, expressão gênica, apoptose, autofagia e imunidade (Bègue et al., 2017). No início da maturação do calo embriogênico de *C. papaya* 'Golden', em que o maior número de embriões globulares foi observado, Almeida et al. (2019) identificaram a proteína CDC48 altamente acumulada e sugeriram a participação dessa proteína na promoção do desenvolvimento embrionário através da regulação de diferentes processos celulares, como o ciclo celular. A proteína CDC48 atua positivamente na indução e manutenção da embriogênese somática, controlando a expansão celular e mediando o estabelecimento do complexo SERK1-CDC48 e suas transduções de sinal (Karlova et al., 2006). Portanto, esses dados demonstram que a proteína CDC48 é um potencial biomarcador para os estágios iniciais da embriogênese somática no mamão.

Em relação às proteínas que apresentaram aumento progressivo no seu acúmulo ao longo dos estágios de desenvolvimento, podemos destacar aquelas envolvidas no processo de cloroplastos, como BAS1, ChiADR1 e PPK1 bem como as proteínas específicas de sementes, incluindo quatro isoformas de vicilina, uma proteína LEA e o PIMT1 (Tabela 3). A proteína BAS1 é um peróxido redutase à base de tiol que atua principalmente na desintoxicação de H₂O₂ produzido fotoquimicamente e está envolvida na proteção do DNA, enzimas e lipídios contra danos, na modulação da sinalização intracelular relacionada ao H₂O₂ e no controle da integridade metabólica (Dietz et al., 2006). Esta enzima foi encontrada altamente acumulada em culturas embriogênicas para *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Fraga et al., 2016). Do mesmo jeito, ChiADR1 é uma enzima antioxidante que desintoxica carbonilos reativos nos cloroplastos, sendo essencial para manter a homeostase celular (Yamauchi et al., 2011). PPK1 catalisa a formação de ATP e Pi-dependente de piruvato de fosfoenol, a molécula primária aceitadora de CO₂ durante a fotossíntese e foi sugerida uma função do PPK no desenvolvimento de sementes de arroz (Chastain et al., 2006). Nesse sentido, podemos postular que, nas fases posteriores do desenvolvimento (torpedo e cotiledonar), os embriões somáticos de mamão mudam o uso da maquinaria mitocondrial para maquinaria de cloroplastos, tornando-se autotróficos e capazes de germinar. Os embriões somáticos de mamão durante os estágios finais também mostraram um acúmulo das proteínas vicilina, LEA e PIMT1 proteínas específicas de semente (Tabela 3). A vicilina é uma das principais proteínas de armazenamento, servindo principalmente como suprimento de nitrogênio nos embriões em germinação. As proteínas LEA estão envolvidas na tolerância à dessecação do embrião, nas vias de ABA e nas respostas aos estresses (Šunderlíková and Wilhelm, 2002). O PIMT1 limita o acúmulo anormal de L-isoaspartil nas proteínas das sementes, combatendo o reenovelamento de proteínas resultante da formação de L-isoaspartil e melhora as características das sementes, como longevidade e vigor (Pescador et al., 2008). Vicilinas e proteínas LEA são marcadores bem conhecidos de estágios de desenvolvimento posteriores (torpedo e cotiledonar) de embriões somáticos em maturação (Šunderlíková and Wilhelm, 2002; Lara-Chavez et al., 2012; Mishra et al., 2012; Teyssier et al., 2013) e PIMT1 aparecem como um potencial marcador para estágios posteriores do desenvolvimento de embriões somáticos de mamão.

Portanto, a identificação dessas proteínas específicas de sementes indica que os embriões somáticos passam pelo desenvolvimento normal, acumulando compostos de armazenamento e adquirindo a tolerância à dessecação, essenciais para o correto processo de germinação.

7. CONCLUSÕES

A- Os calos embriogênicos tratados com azul de toluidina apresentaram reação ortocromática no citoplasma e reação metacromática na parede da célula indicando a presença de polissacarídeos ácidos.

B- As células dos calos embriogênicos apresentaram com regiões meristemáticas com células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso e núcleo proeminente.

C- Os calos embriogênicos apresentaram reação positiva ao corante azul brilhante de Coomassie corando proteínas durante o 0 e 7º dia de maturação.

D- Os calos embriogênicos apresentaram reação positiva ao reagente ácido periódico de Schiff corando amido durante o 0, 7º, 21º e 28º dia de maturação.

E- A sacarose e frutose apresentaram-se como o carboidrato majoritário no 14º dia de maturação dos calos embriogênicos, enquanto glicose parece ser o carboidrato requerido em pequena quantidade durante o período de maturação.

F- O amido foi encontrado em maior concentração no 28º dia de maturação.

G- O conteúdo de PAs totais foi maior no 0 e 14º dias de maturação nos calos embriogênicos.

H- O conteúdo de Put foi maior no dia 0 de maturação nos calos embriogênicos.

I- O conteúdo de Spd e Spm foi maior no 7º dia de maturação nos calos embriogênicos.

J- A razão entre as PAs aumentou nos dias 0 e no 28º dia de maturação de nos calos embriogênicos.

K- O embrião no estágio torpedo apresentou maior conteúdo de PAs totais, bem como o maior conteúdo de Put.

L- Os embriões nos estádios torpedo e cotiledonar apresentaram maiores conteúdo de Spd.

M- A razão entre as PAs foi maior no embrião torpedo.

N- Identificação das proteínas acetilornitina desacetilase e SAM2, que fazem parte da biossíntese de PAs.

O- As proteínas identificadas apresentaram um acúmulo congruente durante os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *C. papaya*.

P- Identificação de possíveis proteínas estágio-específicas que podem ser biomarcadoras do estágio de desenvolvimento do embrião somático globular: proteína ribossomal 60S tipo L27a-3, proteína ribossomal 60S L18-3, proteína ribossomal 60S L9, proteína ribossomal 60S isoforma X11, Proteína ribossomal 60S L23, proteína ribossomal 60S L12-1, proteína ribossomal 60S L23a, DEAD-box ATP-dependente RNA helicase 20-like isoforma X1, RABA5b, a RABA5a, RABA6a, glutationa S-transferase F13, catalase isoenzima 1, UDP-glicose 6-desidrogenase tipo 5, proteína contendo repetição de pentatricopeptídeo At1g14470 e a proteína da família glicosil.

Q- Identificação de possíveis proteínas estágio-específicas que podem ser biomarcadoras do estágio de desenvolvimento do embrião somático cordiforme: RABE1c, subunidade reguladora da protease 26S S10B homólogo B, Cytochrome P450 71B10-like.

R- Identificação de possível proteína estágio-específica que pode ser biomarcadora do estágio de desenvolvimento do embrião somático torpedo: proteína ADP-ribosilação Fator 1.

S- Identificação de possível proteína estágio-específica que podem ser biomarcadora do estágio de desenvolvimento do embrião somático cotiledonar sendo a proteína xilose isomerase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Khayri, J.M., Jain, S.M., Johnson, D.V. (2016) *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools*. Springer vol 1,
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., Tiburcio, A.F. (2010) Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231(6):1237-1249.
- Almeida, F.A., Vale, E.M., Reis, R.S., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2019) LED lamps enhance somatic embryo maturation in association with the differential accumulation of proteins in the *Carica papaya* L. 'Golden' embryogenic callus. *Plant Physiology and Biochemistry* 143:109-118.
- Anandan, R., Sudhakar, D., Balasubramanian, P., Gutiérrez-Mora, A. (2012) In vitro somatic embryogenesis from suspension cultures of *Carica papaya* L. *Scientia horticultrae* 136:43-49.
- Arnholdt-Schmitt, B., Ragonezi, C., Cardoso, H. (2016) Do mitochondria play a central role in stress-induced somatic embryogenesis? In vitro embryogenesis in higher plants. Springer, p. 87-100.
- Ascencio-Cabral, A., Gutiérrez-Pulido, H., Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A. (2008) Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic

embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. *Scientia horticultrae* 118(2):155-160.

- Aslam, J., Khan, S.A., Cheruth, A.J., Mujib, A., Sharma, M.P., Srivastava, P.S. (2011) Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Saudi journal of biological sciences* 18(4):369-380.
- Badillo, V. (2000) *Carica* L. vs. *Vasconcella* St. Hil.(Caricaceae) con la rehabilitación de este último. *Ernstia* 10(2):74-79.
- Badillo, V., Leal, F. (2020) Taxonomy and Botany of the Caricaceae. *Horticultural Reviews* 47:289-323.
- Bagni, N., Tassoni, A.J.A.a. (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. 20(3):301-317.
- Balbuena, T.S., Jo, L., Pieruzzi, F.P., Dias, L.L., Silveira, V., Santa-Catarina, C., Junqueira, M., Thelen, J.J., Shevchenko, A., Floh, E.I. (2011) Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* 72(4):302-311.
- Baron, K., Stasolla, C. (2008) The role of polyamines during in vivo and in vitro development. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 44(5):384-395.
- Bègue, H., Jeandroz, S., Blanchard, C., Wendehenne, D., Rosnoblet, C.J.B.e.B.A.-G.S. (2017) Structure and functions of the chaperone-like p97/CDC48 in plants. 1861(1):3053-3060.
- Bègue, H., Mounier, A., Rosnoblet, C., Wendehenne, D. (2019) Toward the understanding of the role of CDC48, a major component of the protein quality control, in plant immunity. *Plant science* 279:34-44.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W., Nonogaki, H. (2013) Structure and composition Seeds. Springer, p. 1-25.
- Bhattacharya, J., Khuspe, S., Renukdas, N., Rawal, S. (2002) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo explant of

papaya (*Carica papaya* L. cv. washington and honey dew). *Indian Journal Experimental Biology* 40:624-627.

Borecký, J., Maia, I.G., Costa, A.D., Ježek, P., Chaimovich, H., de Andrade, P.B., Vercesi, A.b.E., Arruda, P.J.F.I. (2001) Functional reconstitution of Arabidopsis thaliana plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMP1) expressed in Escherichia coli. *505(2):240-244.*

Borém, A. (1997) *Melhoramento de plantas. Viçosa-MG: UFV*

Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant science* 140(2):103-125.

Bruijne, E., Langhe, E., Rijck, R. (1974) Actions of hormones and embryoid formation in callus cultures of *Carica papaya*. *International Symposium on Crop Protection, Fytopharmacie* 39:637-645.

Bukhori, M.F.M., Jin, C.n.S., Khalid, N., Pillai, V., Rahman, N.A. (2013) Improved protocol for high frequency plant regeneration through somatic embryogenesis in *Carica papaya*. *Research in Biotechnology* 4(5)

Campos, N.A., Paiva, L.V., Panis, B., Carpentier, S.C. (2016) The proteome profile of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. *Proteomics* 16(6):1001-1005.

Cangahuala-Inocente, G., Steiner, N., Santos, M., Guerra, M. (2004) Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma* 224(1-2):33-40.

Cangahuala-Inocente, G.C., Silveira, V., Caprestano, C.A., Floh, E.I., Guerra, M.P. (2014) Dynamics of physiological and biochemical changes during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 50(2):166-175.

Cangahuala-Inocente, G.C., Silveira, V., Caprestano, C.A., Floh, E.I., Guerra, M.P.J.I.V.C., Biology-Plant, D. (2014) Dynamics of physiological and biochemical changes during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *50(2):166-175.*

- Carvalho, F., Renner, S.J.M.P., Evolution. (2012) Molecular Phylogenetics and Evolution A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history. 65(1):46-53.
- Castillo, B., Smith, M., Yadava, U. (1998) Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. *Plant Cell Reports* 17(3):172-176.
- Chastain, C.J., Heck, J.W., Colquhoun, T.A., Voge, D.G., Gu, X.-Y. (2006) Posttranslational regulation of pyruvate, orthophosphate dikinase in developing rice (*Oryza sativa*) seeds. *Planta* 224(4):924.
- Chávez-Pesqueira, M., Núñez-Farfán, J. (2017) Domestication and Genetics of Papaya: A Review. 5(155)
- Chen, M., Wang, P., Maeda, E. (1987) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. *Plant Cell Reports* 6(5):348-351.
- Cipriano, J.L., Cruz, A.C.F., Mancini, K.C., Schmildt, E.R., Lopes, J.C., Otoni, W.C., Alexandre, R.S. (2018) Somatic embryogenesis in *Carica papaya* as affected by auxins and explants, and morphoanatomical-related aspects. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90(1):385-400.
- Clarindo, W.R., de Carvalho, C.R., Araújo, F.S., de Abreu, I.S., Otoni, W.C. (2008) Recovering polyploid papaya in vitro regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92(2):207-214.
- Corrêa, D.J.P., Pereira, T.N.S., Neto, M.F., Pereira, M.G. (2010) Meiotic behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*. *Caryologia* 63(3):229-236.
- Correia, S., Vinhas, R., Manadas, B., Lourenço, A.S., Veríssimo, P., Canhoto, J.M.J.J.o.p.r. (2012) Comparative Proteomic Analysis of Auxin-Induced Embryogenic and Nonembryogenic Tissues of the Solanaceous Tree *Cyphomandra betacea* (Tamarillo). 11(3):1666-1675.
- Costa, A.d.F., Pacova, B.J.S. (2003) Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. *In: Martins, D.Y.C., Af*

(ed) *A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção.*, Vitória: Incaper, vol 3, p. 59-102.

Cramer, R., Bindschedler, L., Agrawal, G. (2013) Plant proteomics in crop improvement. *Proteomics* 13(12-13):1771.

Damasceno Junior, P.C., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Silva, F.F., Souza, M.d.M., Nicolo, R.G. (2009) Preferential reproduction mode of hermaphrodite papaya plant (*Carica papaya* L; Caricaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*:182-189.

De Carvalho Silva, R., Luis, Z.G., Scherwinski-Pereira, J.E.J.P.g.r. (2014) The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). 72(1):67-80.

Del Río, L.A., López-Huertas, E.J.P., Physiology, C. (2016) ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. 57(7):1364-1376.

Dhekney, S., Kandel, R., Bergey, D., Sitther, V., Soorianathasundaram, K., Litz, R.J.B., Biotechnology, A. (2016) Advances in papaya biotechnology. 5:133-142.

Di Palma, S., Hennrich, M.L., Heck, A.J., Mohammed, S. (2012) Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. *Journal of Proteomics* 75(13):3791-3813.

Dias, L.L.C., Balbuena, T.S., Silveira, V., Santa-Catarina, C., Shevchenko, A., Floh, E.I.S. (2010) Two-dimensional gel electrophoretic protein profile analysis during seed development of *Ocotea catharinensis*: a recalcitrant seed species. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 22(1):23-33.

Dias, L.L.C., Santa-Catarina, C., Ribeiro, D.M., Barros, R.S., Floh, E.I.S., Otoni, W.C. (2009) Ethylene and polyamine production patterns during in vitro shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 99(2):199-208.

- Dietz, K.-J., Jacob, S., Oelze, M.-L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S.M.N., Baier, M., Finkemeier, I. (2006) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany* 57(8):1697-1709.
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., Levin, Y., Schild, H., Tenzer, S. (2014) Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nature methods* 11:167.
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., Tenzer, S. (2016) Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. *Nature protocols* 11(4):795.
- Elhiti, M., Stasolla, C., Wang, A.J.I.V.C., Biology-Plant, D. (2013) Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. 49(6):631-642.
- Eveland, A.L., Jackson, D.P. (2012) Sugars, signalling, and plant development. *Journal of Experimental Botany* 63(9):3367-3377.
- FAO (2018) FAOSTAT - Crop Production. 2018. Disponível em: <
<http://faostat.fao.org/>>.
- Farzana, A., Palkadapala, P., Meddegoda, K., Samarajeewa, P., Eeswara, J.J.J.o.t.N.S.F.o.S.L. (2008) Somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya* L.) cv. Rathna. 36(1)
- Fehér, A. (2015) Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta -Gene Regulatory Mechanisms* 1849(4):385-402.
- Fehér, A., Pasternak, T.P., Dudits, D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 74(3):201-228.
- Fernando, J.A., Melo, M., Soares, M.K.M., Appezzato-da-Glória, B. (2001) Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44(3):247-255.
- Filson, P.B., Dawson-Andoh, B.E. (2009) Characterization of sugars from model and enzyme-mediated pulp hydrolyzates using high-performance liquid

chromatography coupled to evaporative light scattering detection. *Bioresource technology* 100(24):6661-6664.

Fitch, M.M. (1993) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 32(2):205-212.

Fitch, M.M., Manshardt, R.M. (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Cell Reports* 9(6):320-324.

Fitch, M.M., Moore, P.H., Leong, T.C., Akashi, L.A.Y., Yeh, A.K., White, S.A., Cruz, A.S.D., Santo, L.T., Ferreira, S.A., Poland, L.J. (2005) Clonally propagated and seed-derived papaya orchards: I. Plant production and field growth. *HortScience* 40(5):1283-1290.

Fraga, H.P.F., Vieira, L.N., Heringer, A.S., Puttkammer, C.C., Silveira, V., Guerra, M.P.J.P.C., Tissue, Culture, O. (2016) DNA methylation and proteome profiles of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze embryogenic cultures as affected by plant growth regulators supplementation. 125(2):353-374.

Gabrovska, I., Valdivieso, A., Becquer, A., Saenz, B. (1967) Las enfermedades virosas de la fruta bomba (*Carica papaya* L.) en Cuba. *Revista de Agricultura, Piracicaba* 1:1-21.

Gautier, F., Label, P., Eliášová, K., Leplé, J.-C., Motyka, V., Boizot, N., Vondrakova, Z., Malbeck, J., Trávníčková, A., Le Metté, C.J.F.i.p.s. (2019) Cytological, biochemical and molecular events of the embryogenic state in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]). 10:118.

Ge, F., Hu, H., Huang, X., Zhang, Y., Wang, Y., Li, Z., Zou, C., Peng, H., Li, L., Gao, S. (2017) Metabolomic and Proteomic Analysis of Maize Embryonic Callus induced from immature embryo. *Scientific reports* 7(1):1004.

George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.-J. (2008) Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors Plant propagation by tissue culture. Springer, p. 175-204.

- Gonçalves, S., Cairney, J., Rodríguez, M.P., Cánovas, F., Oliveira, M., Miguel, C., Genomics (2007) PpRab1, a Rab GTPase from maritime pine is differentially expressed during embryogenesis. *Molecular Genetics* 278(3):273-282.
- Gong, H., Jiao, Y., Hu, W.-w., Pua, E.-C. (2005) Expression of glutathione-S-transferase and its role in plant growth and development in vivo and shoot morphogenesis in vitro. *Plant molecular biology reporter* 57(1):53-66.
- Gouvea, D.S., Chagas, K., Cipriano, J.L., Lopes, J.C., Schmildt, E.R., Otoni, W.C., Schmildt, O., ARAUJO, C.P., Alexandre, R.S.J.A.d.A.B.d.C. (2019) Somatic embryogenesis in the commercial papaya hybrid UENF/Caliman 01 relying on plantlet production from sexed adult hermaphrodite donor plants. 91(3)
- Grzesiak, M., Filek, M., Barbasz, A., Kreczmer, B., Hartikainen, H. (2013) Relationships between polyamines, ethylene, osmoprotectants and antioxidant enzymes activities in wheat seedlings after short-term PEG-and NaCl-induced stresses. *Plant growth regulation* 69(2):177-189.
- Gschwend, A.R., Wai, C.M., Zee, F., Arumuganathan, A.K., Ming, R. (2013) Genome size variation among sex types in dioecious and trioecious Caricaceae species. *Euphytica* 189(3):461-469.
- Guerra, M., Torres, A., Teixeira, J., Torres, A., Caldas, L., Buso, J. (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*
- Guerra, M.P., Silveira, V., dos Santos, A.L., Astarita, L.V., Nodari, R.O. (2000) Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (BERT) O. KTZE Somatic embryogenesis in woody plants. Springer, p. 457-478.
- Gulzar, B., Mujib, A., Rajam, M.V., Fruk, A., Zafar, N. (2019) Identification of somatic embryogenesis (SE) related proteins through label-free shotgun proteomic method and cellular role in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 1-13.
- Gustafson, E.A., Wessel, G.M. (2010) DEAD-box helicases: posttranslational regulation and function. *Biochemical biophysical research communications* 395(1):1.

- Han, Y., Cao, H., Jiang, J., Xu, Y., Du, J., Wang, X., Yuan, M., Wang, Z., Xu, Z., Chong, K.J.P.p. (2008) Rice ROOT ARCHITECTURE ASSOCIATED1 binds the proteasome subunit RPT4 and is degraded in a D-box and proteasome-dependent manner. *148(2):843-855.*
- Haq, u.S., Khan, A., Ali, M., Gai, W.-X., Zhang, H.-X., Yu, Q.-H., Yang, S.-B., Wei, A.-M., Gong, Z.-H. (2019) Knockdown of CaHSP60-6 confers enhanced sensitivity to heat stress in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Planta* 250(6):2127-2145.
- He, M.-W., Wang, Y., Wu, J.-Q., Shu, S., Sun, J., Guo, S.-R.J.P.P., Biochemistry (2019) Isolation and characterization of S-Adenosylmethionine synthase gene from cucumber and responsive to abiotic stress. 141:431-445.
- He, Y., Young, T.E., Clark, K.R., Kleppinger-Sparace, K.F., Bridges, W.C., Sparace, S.A. (2011) Developmental profile of storage reserve accumulation in soybean somatic embryos. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 47(6):725-733.
- Heringer, A.S., Barroso, T., Macedo, A.F., Santa-Catarina, C., Souza, G.H.M.F., Floh, E.I.S., de Souza-Filho, G.A., Silveira, V. (2015) Label-free quantitative proteomics of embryogenic and non-embryogenic callus during sugarcane somatic embryogenesis. *Plos One* 10(6):e0127803.
- Heringer, A.S., Reis, R.S., Passamani, L.Z., de Souza-Filho, G.A., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2017) Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum* 39(2):52.
- Heringer, A.S., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2018) Insights from proteomic studies into plant somatic embryogenesis. *Proteomics* 18(5-6):1700265.
- Heringer, A.S., Vale, E.M., Barroso, T., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2013) Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds. *Theoretical Experimental Plant Physiology* 25(2):116-124.

- Hernandez-Valladares, M., Aasebø, E., Mjaavatten, O., Vaudel, M., Bruserud, Ø., Berven, F., Selheim, F.J.B.p.o. (2016) Reliable FASP-based procedures for optimal quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis on samples from acute myeloid leukemia patients. *18(1):13*.
- Hu, C., Lin, S.-y., Chi, W.-t., Charng, Y.-y.J.P.p. (2012) Recent gene duplication and subfunctionalization produced a mitochondrial GrpE, the nucleotide exchange factor of the Hsp70 complex, specialized in thermotolerance to chronic heat stress in *Arabidopsis*. *158(2):747-758*.
- Huerta-Ocampo, J.Á., Osuna-Castro, J.A., Lino-López, G.J., Barrera-Pacheco, A., Mendoza-Hernández, G., De León-Rodríguez, A., de la Rosa, A.P.B.J.J.o.P. (2012) Proteomic analysis of differentially accumulated proteins during ripening and in response to 1-MCP in papaya fruit. *75(7):2160-2169*.
- IBGE (2018) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - LSPA. 2018. Disponível em: <
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/> >. Acesso em: 29/11/2019.
- Jamaluddin, N.D., Noor, N.M., Goh, H.-H. (2017) Genome-wide transcriptome profiling of *Carica papaya* L. embryogenic callus. *Physiology Molecular Biology of Plants* *23(2):357-368*.
- Jing, D., Zhang, J., Xia, Y., Kong, L., OuYang, F., Zhang, S., Zhang, H., Wang, J. (2017) Proteomic analysis of stress related proteins and metabolic pathways in *Picea asperata* somatic embryos during partial desiccation. *Plant biotechnology journal* *15(1):27-38*.
- Karlova, R., Boeren, S., Russinova, E., Aker, J., Vervoort, J., de Vries, S.J.T.P.C. (2006) The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor-like kinase1 protein complex includes brassinosteroid-insensitive1. *18(3):626-638*.
- Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A.F., Altabella, T., Galston, A.W. (2003) Polyamines in plants: an overview. *Journal of Cell and Molecular Biology* *2:1-12*.

- Klinghammer, M., Tenhaken, R.J.J.o.E.B. (2007) Genome-wide analysis of the UDP-glucose dehydrogenase gene family in Arabidopsis, a key enzyme for matrix polysaccharides in cell walls. *58(13):3609-3621*.
- Kormuťák, A., Salaj, T., Vooková, B. (2006) Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir. *Biologia Plantarum* 61(4):479-485.
- Kubeš, M., Drážná, N., Konrádová, H., Lipavská, H. (2014) Robust carbohydrate dynamics based on sucrose resynthesis in developing *Norway spruce* somatic embryos at variable sugar supply. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 50(1):45-57.
- Kumari, S., Trivedi, M., Shukla, N., Mishra, M. (2018) Polyamine mediated genotype independent somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Archives* 18(1):581-589.
- Kurepa, J., Smalle, J.A.J.B. (2008) Structure, function and regulation of plant proteasomes. *90(2):324-335*.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228(3):367-381.
- Lara-Chavez, A., Egertsdotter, U., Flinn, B.S.J.I.V.C., Biology-Plant, D. (2012) Comparison of gene expression markers during zygotic and somatic embryogenesis in pine. *48(3):341-354*.
- Li, W., Zhao, F.a., Fang, W., Xie, D., Hou, J., Yang, X., Zhao, Y., Tang, Z., Nie, L., Lv, S. (2015) Identification of early salt stress responsive proteins in seedling roots of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) employing iTRAQ-based proteomic technique. *Frontiers in plant science* 6(732):1-14.
- Lipecka, J., Chhuon, C., Bourderioux, M., Bessard, M.A., van Endert, P., Edelman, A., Guerrero, I.C.J.P. (2016) Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation (FASP). *16(13):1852-1857*.
- Litz, R.E., Conover, R.A.J.Z.f.P. (1981) In vitro polyembryony in *Carica papaya* L. ovules. *104(3):285-288*.

- Liu, B., Shan, X., Wu, Y., Su, S., Li, S., Liu, H., Han, J., Yuan, Y. *J.I.J.o.m.s.* (2018) iTRAQ-Based quantitative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic calli derived from a maize (*Zea mays* L.) Inbred line Y423. *19(12):4004.*
- Lyngved, R., Renaut, J., Hausman, J.-F., Iversen, T.-H., Hvoslef-Eide, A.K.J. *J.o.P.G.R.* (2008) Embryo-specific proteins in *Cyclamen persicum* analyzed with 2-D DIGE. *27(4):353.*
- Majumdar, R., Shao, L., Minocha, R., Long, S., Minocha, S.C. (2013) Ornithine: the overlooked molecule in the regulation of polyamine metabolism. *Plant Cell Physiology* *54(6):990-1004.*
- Malabadi, R.B., Kumar, S.V., Mulgund, G.S., Nataraja, K. (2011) Induction of somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya*). *Research in Biotechnology* *2(5):40-55.*
- Márquez-López, R.E., Pérez-Hernández, C., Ku-González, Á., Galaz-Ávalos, R.M., Loyola-Vargas, V.M. (2018) Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Protoplasma* *255(2):695-708.*
- Martin, V., Villarreal, F., Miras, I., Navaza, A., Haouz, A., González-Lebrero, R.M., Kaufman, S.B., Zabaleta, E.J.F.I. (2009) Recombinant plant gamma carbonic anhydrase homotrimers bind inorganic carbon. *583(21):3425-3430.*
- Minamino, N., Ueda, T. *J.C.o.i.p.b.* (2019) RAB GTPases and their effectors in plant endosomal transport. *52:61-68.*
- Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A., Saw, J.H., Senin, P., Wang, W., Ly, B.V., Lewis, K.L. (2008) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* *452(7190):991-996.*
- Ming, R., Yu, Q., Blas, A., Chen, C., Na, J.-K., Moore, P. (2008) Genomics of Papaya a Common Source of Vitamins in the Tropics. *In: Moore, P., Ming, R. (eds) Genomics of Tropical Crop Plants. Volume 1. New York: Springer New York, p.*

- Ming, R., Yu, Q., Moore, P.H. (2012) Papaya genome and genomics Genomics of Tree Crops. Springer, p. 241-259.
- Minocha, R., Majumdar, R., Minocha, S.C. (2014) Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship1. *Frontiers in Plant Science* 5:175.
- Minocha, R., Smith, D.R., Reeves, C., Steele, K.D., Minocha, S.C. (1999) Polyamine levels during the development of zygotic and somatic embryos of *Pinus radiata*. *Physiologia plantarum* 105(1):155-164.
- Mishra, M., Shukla, N., Chandra, R. (2010) Role of Polyethylene Glycol in Maturation and Germination of Transformed Somatic Embryos of Papaya (*Carica Papaya* L.). *In*: Kumar, N., Soorianathasundaram, K. , Jeyakumar, P. (eds) II International Symposium on Papaya Madurai, India: Acta Horticulturae, vol 851, p.
- Mishra, S., Sanyal, I., Amla, D.V. (2012) Changes in protein pattern during different developmental stages of somatic embryos in chickpea. *Biologia Plantarum* 56
- Morel, A., Teysier, C., Trontin, J.F., Eliášová, K., Pešek, B., Beaufour, M., Morabito, D., Boizot, N., Le Metté, C., Belal-Bessai, L.J.P.p. (2014) Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: transcriptomic and proteomic analyses. 152(1):184-201.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3):473-497.
- Nanjo, Y., Skultety, L., Uváčková, L.u., Klubicová, K.n., Hajduch, M., Komatsu, S. (2012) Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings. *Journal of Proteome Research* 11(1):372-385.
- Oliveira, A.M.G., Farias, A., Santos Filho, H., Oliveira, J.R.P., Dantas, J.L.L., Santos, L.d., Oliveira, M.d.A., Souza Júnior, M., Silva, M.J., Almeida, O.d. (1994) *Mamão para exportação: aspectos técnicos da produção*. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Secretaria de

Desenvolvimento Rural, SDR, Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças, Flores e Plantas Ornamentais--FRUPEX vol 9,

- Papadakis, A.K., Roubelakis-Angelakis, K.A.J.P. (2005) Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death induced by polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. *220(6):826-837*.
- Passamani, L.Z., Bertolazi, A.A., Ramos, A.C., Santa-Catarina, C., Thelen, J.J., Silveira, V. (2018) Embryogenic Competence Acquisition in Sugar Cane Callus Is Associated with Differential H⁺-Pump Abundance and Activity. *Journal of Proteome Research* 17(8):2767-2779.
- Passamani, L.Z., Reis, R.S., Vale, E.M., Sousa, K.R., Aragão, V.P., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2019) Long-term culture with 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid affects embryogenic competence in sugarcane callus via changes in starch, polyamine and protein profiles. *Plant Cell, Tissue Organ Culture:1-15*.
- Pazmino, D.M., RODRÍGUEZ-SERRANO, M., ROMERO-PUERTAS, M.C., ARCHILLA-RUIZ, A., Del Rio, L.A., Sandalio, L.M.J.P., cell, environment (2011) Differential response of young and adult leaves to herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species. *34(11):1874-1889*.
- Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trézéguet, V., Lauquin, G.J.-M., Brandolin, G. (2003) Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 426(6962):39-44.
- Pereira, M.G., Ferregueti, G.A., Ramos, H.C.C., Santa Catarina, R.S.C., Vettorazzi, J.C.F., Poltronieri, T.P.d.S., Arêdes, F.A.S., Boechat, M.S.B., Azevedo, A.O.N., Moreira, N.F., Bohry, D., Pereira, T.N.S., da Silveira, S.F., Vivas, M. (2018) *Melhoramento genético do mamoeiro: Programa UENF/CALIMAN*. Vitória: vol 1, 1-59p.
- Pérez, L.P., Montesinos, Y.P., Olmedo, J.G., Rodriguez, R.B., Sánchez, R.R., Montenegro, O.N., Escriba, R.C.R., Daniels, D., Gómez-Kosky, R. (2016)

- Effect of phloroglucinol on rooting and in vitro acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol Roja). *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 52(2):196-203.
- Pescador, R., Kerbauy, G.B., Kraus, J.E., de Melo Ferreira, W., Guerra, M.P., Rita de Cássia, L. (2008) Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 44(4):289.
- Pilarska, M., Knox, J.P., Konieczny, R. (2013) Arabinogalactan-protein and pectin epitopes in relation to an extracellular matrix surface network and somatic embryogenesis and callogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 115(1):35-44.
- Puga-Hermida, M.I., Gallardo, M., Matilla, A.J. (2003) The zygotic embryogenesis and ripening of *Brassica rapa* seeds provokes important alterations in the levels of free and conjugated abscisic acid and polyamines. *Physiologia plantarum* 117(2):279-288.
- Quinga, L.A.P., Heringer, A.S., de Freitas Fraga, H.P., do Nascimento Vieira, L., Silveira, V., Steinmacher, D.A., Guerra, M.P. (2018) Insights into the conversion potential of *Theobroma cacao* L. somatic embryos using quantitative proteomic analysis. *Scientia horticultrae* 229:65-76.
- R Team Core (2014) R: A language and environment for statistical computing. . p. R Foundation for Statistical Computing, 2014. Disponível em: < <http://www.R-project.org/>. >. >.
- Ravanel, S., Gakière, B., Job, D., Douce, R. (1998) The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(13):7805-7812.
- Reis, R.S., de Moura Vale, E., Heringer, A.S., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2016) Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. *Journal of proteomics* 130:170-179.

- Renukdas, N., Mohan, M., Khuspe, S., Rawal, S. (2006) Influence of phytohormones, culture conditions and ethylene antagonists on somatic embryo maturation and plant regeneration in papaya. *International Journal of Agricultural Research* 1:151-160.
- Renukdas, N., Mohan, M., Khuspe, S.S., Rawal, S. (2003) *Influence of Boron on Somatic Embryogenesis in Papaya*. vol 47, 129-132p.
- Reuveni, O., Shlesinger, D., Lavi, U. (1990) In vitro clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 20(1):41-46.
- Rocha, D.I., Dornelas, M.C. (2013) Molecular overview on plant somatic embryogenesis. *CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources* 8(022):1-17.
- Rocha, D.I., Pinto, D.L.P., Vieira, L.M., Tanaka, F.A.O., Dornelas, M.C., Otoni, W.C. (2016) Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of SERK gene expression. *Protoplasma* 253(2):595-609.
- Ruggiero, C., Marin, S.L.D., Durigan, J.F. (2011) Mamão, uma história de sucesso. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33(SPE1):76-82.
- Santa-Catarina, C., Silveira, V., Balbuena, T.S., Viana, A.M., Estelita, M.E.M., Handro, W., Floh, E.I.S. (2006) IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. *Plant growth regulation* 49
- Santa-Catarina, C., Silveira, V., Scherer, G.F., Floh, E.I.S. (2007) Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90(1):93-101.
- Satish, L., Rency, A.S., Rathinapriya, P., Ceasar, S.A., Pandian, S., Rameshkumar, R., Rao, T.B., Balachandran, S., Ramesh, M. (2016) Influence of plant growth regulators and spermidine on somatic embryogenesis and

- plant regeneration in four Indian genotypes of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn). *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 124(1):15-31.
- Schlüter, H., Apweiler, R., Holzhütter, H.-G., Jungblut, P.R.J.C.C.J. (2009) Finding one's way in proteomics: a protein species nomenclature. 3(1):11.
- Schmidt, O., Campostrini, E., Schmidt, E.R., Netto, A.T., Peçanha, A.L., Ferraz, T.M., Ferregueti, G.A., Alexandre, R.S., González, J.C. (2016) Effects of indol butyric acid concentration on propagation from cuttings of papaya cultivars 'Golden' and 'Uenf/Caliman 01'. *Fruits* 71(1):27-33.
- Schmidt, O., Netto, A.T., Schmidt, E.R., Carvalho, V.S., Otoni, W.C., Campostrini, E.J.T., Physiology, E.P. (2015) Photosynthetic capacity, growth and water relations in 'Golden' papaya cultivated in vitro with modifications in light quality, sucrose concentration and ventilation. 27(1):7-18.
- Sharp, W., Sondahl, M., Caldas, L., Maraffa, S. (1980) The physiology of in vitro asexual embryogenesis Vegetative propagation.
- Shukla, N., Mishra, M., Chandra, R. Influence of Polyamine on Induction of Adventive Embryony in Papaya (*Carica papaya* L.). In: II International Symposium on Papaya 851, 2008. p 231-234
- Silveira, V., Balbuena, T.S., Santa-Catarina, C., Floh, E.I., Guerra, M.P., Handro, W. (2004) Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant growth regulation* 44(2):147-156.
- Silveira, V., Santa-Catarina, C., Tun, N.N., Scherer, G.F., Handro, W., Guerra, M.P., Floh, E.I. (2006) Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Plant science* 171(1):91-98.
- Silveira, V., Vita, A., Macedo, A., Dias, M., Floh, E., Santa-Catarina, C. (2013) Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell Tiss Organ Culture* 114:351-364.

- Slocum, R.D. (2005) Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiology Biochemistry* 43(8):729-745.
- Smeeckens, S., Ma, J., Hanson, J., Rolland, F. (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* 13(3):273-278.
- Solórzano-Cascante, P., Sánchez-Chiang, N., Jiménez, V.M.J.F.i.p.s. (2018) Explant type, culture system, 6-benzyladenine, meta-topolin and encapsulation affect indirect somatic embryogenesis and regeneration in *Carica papaya* L. 9:1769.
- Steiner, N., Santa-Catarina, C., Andrade, J.B., Balbuena, T.S., Guerra, M.P., Handro, W., Floh, E.I., Silveira, V., Biotechnology (2008) *Araucaria angustifolia* biotechnology. *Functional Plant Science* 2(1):20-28.
- Steward, F., Mapes, M.O., Mears, K. (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*:705-708.
- Storey, W.B. (1953) Genetics of the papaya. *Journal of Heredity* 44(2):70-78.
- Su, Y.H., Zhao, X.Y., Liu, Y.B., Zhang, C.L., O'Neill, S.D., Zhang, X.S. (2009) Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 59(3):448-460.
- Šunderlíková, V., Wilhelm, E.J.P. (2002) High accumulation of legumin and Lea-like mRNAs during maturation is associated with increased conversion frequency of somatic embryos from pedunculate oak (*Quercus robur* L.). 220(1-2):0097-0103.
- Tanaka, H., Nodzyński, T., Kitakura, S., Feraru, M.I., Sasabe, M., Ishikawa, T., Kleine-Vehn, J., Kakimoto, T., Friml, J.J.P., Physiology, C. (2014) BEX1/ARF1A1C is required for BFA-sensitive recycling of PIN auxin transporters and auxin-mediated development in *Arabidopsis*. 55(4):737-749.

- Tautorus, T.E., Fowke, L.C., Dunstan, D.I. (1991) Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal of Botany* 69(9):1873-1899.
- Teyssier, C., Maury, S., Beaufour, M., Grondin, C., Delaunay, A., Le Mette, C., Ader, K., Cadene, M., Label, P., Lelu-Walter, M.A. (2013) In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses *Physiol Plant*. p.
- Thorpe, T.A. (1990) The current status of plant tissue culture *Developments in crop science*. Elsevier, vol 19, p. 1-33.
- Thorpe, T.A. (2007) History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology* 37(2):169-180.
- Tsai, S.-F., Yeh, S.-D., Chan, C.-F., Liaw, S.-I. (2009) High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of in vitro grown shoot tips of transgenic papaya lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 98(2):157-164.
- Urasaki, N., Tokumoto, M., Tarora, K., Ban, Y., Kayano, T., Tanaka, H., Oku, H., Chinen, I., Terauchi, R. (2002) A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical applied genetics* 104(2-3):281-285.
- Vale, M.E., Heringer, A.S., Barroso, T., da Silva Ferreira, A.T., da Costa, M.N., Perales, J.E.A., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2014) Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in *Carica papaya* L. *Proteome science* 12(1):37.
- Vale, M.E., Reis, R.S., Passamani, L.Z., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2018) Morphological analyses and variation in carbohydrate content during the maturation of somatic embryos of *Carica papaya*. *Physiology Molecular Biology of Plants* 24(2):295-305.
- Van Aken, O., Whelan, J., Van Breusegem, F. (2010) Prohibitins: mitochondrial partners in development and stress response. *Trends in plant science* 15(5):275-282.

- Verdeil, J.-L., Alemanno, L., Niemenak, N., Tranbarger, T.J. (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in plant science* 12(6):245-252.
- Von Arnold, S., Alsterborg, E., Walles, B. (1988) Micromorphological studies of adventitious bud formation on *Picea abies* embryos treated with cytokinin. *Physiologia plantarum* 72(2):248-256.
- Vuosku, J., Suorsa, M., Ruottinen, M., Sutela, S., Muilu-Mäkelä, R., Julkunen-Tiitto, R., Sarjala, T., Neubauer, P., Häggman, H. (2012) Polyamine metabolism during exponential growth transition in *Scots pine* embryogenic cell culture. *Tree Physiology* 32(10):1274-1287.
- Wang, X., Chen, L., Yang, A., Bu, C., He, Y.J.P., Physiology, C. (2017) Quantitative proteomics analysis of developmental reprogramming in protoplasts of the moss *Physcomitrella patens*. 58(5):946-961.
- Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L., Humphery-Smith, I. (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16(1):1090-1094.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.-C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I. (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Nature Biotechnology* 14(1):61-65.
- Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods* 6(5):359-362.
- Yamauchi, Y., Hasegawa, A., Taninaka, A., Mizutani, M., Sugimoto, Y.J.J.o.b.c. (2011) NADPH-dependent reductases involved in the detoxification of reactive carbonyls in plants. 286(9):6999-7009.
- Yang, H., Vallandingham, J., Shiu, P., Li, H., Hunter, C.P., Mak, H.Y.J.C.B. (2014) The DEAD box helicase RDE-12 promotes amplification of RNAi in cytoplasmic foci in *C. elegans*. 24(8):832-838.

- Yang, X., Zhang, X. (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science* 29(1):36-57.
- Yang, Z., Zhang, L., Diao, F., Huang, M., Wu, N. (2004) Sucrose regulates elongation of carrot somatic embryo radicles as a signal molecule. *Plant Molecular Biology* 54(3):441-459.
- Yemm, E., Willis, A. (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical journal* 57(3):508.
- Yeo, U.-D., Kohmura, H., Nakagawa, N., Sakurai, N.J.P., physiology, c. (1998) Quantitative and qualitative changes of cell wall polysaccharides during somatic embryogenesis and plantlet development of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). 39(6):607-614.
- Yeung, E.C. (1995) Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis In vitro embryogenesis in plants. Springer, p. 205-247.
- Yie, S.T., Liaw, S.I. (1977) Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. *In Vitro* 13(9):564-568.
- Yu, T.-A., Yeh, S.-D., Yang, J.-S. (2003) Comparison of the effects of kanamycin and geneticin on regeneration of papaya from root tissue. *Plant cell, tissue and organ culture* 74(2):169-178.
- Zhang, J., Ma, H., Chen, S., Ji, M., Perl, A., Kovacs, L., Chen, S. (2009) Stress response proteins- differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon - a proteomic approach. *Plant science* 177
- Zhao, C., Zhao, S., Hou, L., Xia, H., Wang, J., Li, C., Li, A., Li, T., Zhang, X., Wang, X. (2015) Proteomics analysis reveals differentially activated pathways that operate in peanut gynophores at different developmental stages. *BMC Plant Biology* 15(1):188.
- Zhao, J., Li, H., Fu, S., Chen, B., Sun, W., Zhang, J., Zhang, J. (2015) An iTRAQ-Based Proteomics Approach to Clarify the Molecular Physiology of Somatic

Embryo Development in Prince Rupprecht's Larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *PLoS One* 10(3):e0119987.

Zhu, W., Miao, Q., Sun, D., Yang, G., Wu, C., Huang, J., Zheng, C.J.P.O. (2012)
The mitochondrial phosphate transporters modulate plant responses to salt stress via affecting ATP and gibberellin metabolism in *Arabidopsis thaliana*.
7(8)