

ANÁLISE PROTEÔMICA E DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS
NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO MAMOEIRO
(*Carica papaya L.*)

ELLEN DE MOURA VALE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2013

ANÁLISE PROTEÔMICA E DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS
NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO MAMOEIRO
(*Carica papaya* L.)

ELLEN DE MOURA VALE

“Dissertação 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 Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientador: Professor Vanildo Silveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2013

ANÁLISE PROTEÔMICA E DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS
NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO MAMOEIRO
(*Carica papaya* L.)

ELLEN DE MOURA VALE

“Dissertação 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 Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 2 de abril de 2013.

Comissão Examinadora:

Prof. Leonardo Lucas Carnevalli Dias (Dr. Biotecnologia) – (UFSJ)

Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (Dr. Biotecnologia) – (UENF)

Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira (Dr. Biologia Vegetal) – UENF

Prof. Vanildo Silveira (Dr. Biotecnologia) – UENF
(Orientador)

*À minhã mãe, Maria Alves de Moura (in memorian),
maior exemplo de vida, força e coragem,
um sol que iluminava a todos,
dedico*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que permitiu que tudo isso fosse possível.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Vanildo Silveira, pela orientação, pela confiança e pela paciência.

À professora Claudete Santa Catarina, pela colaboração e pelos conselhos no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Luis Lopes e Maria Alves (*in memorian*), que dedicaram as suas vidas à realização dos meus sonhos. Em especial à minha mãe que, além de tudo, foi o maior e o melhor exemplo de vida que tive.

À minha irmã, que, mesmo a distância, me auxilia e me escuta em momentos de dificuldade.

Ao meu noivo, Lucas Lins, que, desde sempre, está ao meu lado em qualquer circunstância.

Ao pesquisador Valdomiro Aurélio Barbosa de Souza (*in memorian*), que me deu a primeira oportunidade de trabalhar com pesquisa e me ensinou o que é pesquisa científica e ética.

À grande amiga Clenilda Tolentino, que me ensinou não só práticas laboratoriais, mas, principalmente, responsabilidade e amor pelo trabalho.

Aos amigos do LBT/LBCT, Tatiana, Lucas, Ricardo, Jackellinne, Bruno, Tainá, Bianca, Victor, Carol, Luis André e Kariane, que me ajudaram em diversos pontos do trabalho.

Ao Daniel, secretário do programa, pela presteza no atendimento e pela amizade.

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

SUMÁRIO

RESUMO _____	vii
ABSTRACT _____	ix
1. INTRODUÇÃO _____	1
2. REVISÃO DE LITERATURA _____	3
2.1. Mamoeiro _____	3
2.2. Biotecnologia aplicada ao Melhoramento de Plantas _____	5
2.3. Embriogênese Somática _____	7
2.4. Análise proteômica na embriogênese _____	10
2.5. Determinação de carboidratos durante a embriogênese somática _____	14
3. MATERIAL E MÉTODOS _____	16
3.1. Indução das Culturas _____	16
3.2. Maturação das culturas embriogênicas _____	17
3.3. Germinação dos embriões somáticos _____	18
3.4. Análise histomorfológica das culturas _____	18
3.5. Determinação de carboidratos _____	19
3.6. Análise Proteômica _____	20
3.6.1. Preparo da amostra – Extração proteica _____	20
3.6.2. Eletroforese Bidimensional (2-DE) _____	21

3.6.3.	Análise de imagens	22
3.6.4.	Identificação de proteínas	22
4.	RESULTADOS	25
4.1.	Indução das culturas embriogênicas	25
4.2.	Maturação	28
4.3.	Análises histomorfológicas durante morfogênese in vitro	36
4.4.	Concentração dos carboidratos durante a maturação	43
4.5.	Análise proteômica durante a maturação	48
5.	DISCUSSÃO	64
5.1.	Indução das culturas embriogênicas	64
5.2.	Maturação	67
5.3.	Análises histomorfológicas durante morfogênese in vitro	69
5.4.	Concentração dos carboidratos durante a maturação	71
5.5.	Proteômica	73
6.	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

RESUMO

VALE, Ellen de Moura; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Abril de 2013; Análise proteômica e determinação de carboidratos na embriogênese somática do mamoeiro (*Carica papaya* L.). Orientador: Vanildo Silveira; Conselheiros: Messias Gonzaga Pereira e Gonçalo Apolinário de Souza Filho.

Este estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo para a embriogênese somática em genótipos de mamoeiro adaptadas às condições brasileiras e comparar a evolução histomorfológica, o conteúdo de carboidratos e o perfil de proteínas diferencialmente expressos relacionados com a maturação de embriões somáticos. Para a indução das culturas, embriões zigóticos, isolados a partir de sementes de mamão em diferentes estádios de maturação do fruto (100% verde, 50% amarelo e 100% amarelo) da variedade Golden e da geração F2 do híbrido (UENF / CALIMAN 01), foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (2,4 - diclorofenoxiacético) (0 μ M, 10 μ M e 20 μ M) e NAA (ácido naftalenoacético) (0 μ M, 10 μ M e 20 μ M). Para a maturação dessas culturas, três colônias de 300 mg de massa fresca (FM) foram inoculadas em meio de cultura MS, suplementadas com mio-inositol 0,005% e 3% de sacarose, em diferentes concentrações de PEG (polietileno-glicol) (0%, 3 % e 6%). Amostras de 300 mg de todos os tratamentos de maturação foram coletadas em intervalos de 7 dias para a quantificação de carboidratos. A análise histomorfológica foi realizada com amostras coletadas a cada 7 dias, utilizando-se culturas do tratamento controle e T2. Ao final de 42 dias de cultivo, amostras de

300 mg foram coletadas para análise proteômica das culturas provenientes, apenas, do híbrido F2 (UENF / CALIMAN 01), elas foram submetidas à extração e, subsequentemente, à eletroforese bidimensional (2-DE). Os géis foram corados com Coomassie coloidal, digitalizados e analisados, utilizando-se o *software Image Master Platinum v.7*, os *spots* selecionados foram identificados através de espectrômetro de massa tipo MS / MS (MALDI-TOF/TOF). O meio de cultura com a maior taxa de indução de calos com aspecto embriogênico, para as duas culturas, foi o meio de cultura MS, suplementado com 20 µM de 2,4-D; os embriões obtidos a partir de frutos nos estádios 3 e 5 de maturação resultaram em melhores taxas de indução. O PEG foi importante para o processo de maturação, uma vez que o meio MS, suplementado com 6% de PEG (T2), promoveu uma maior percentagem de maturação de embriões somáticos normais, embora o tratamento controle também tenha promovido a maturação, esse promoveu maior desenvolvimento de embriões anormais para ambos os genótipos. Na análise histomorfológica, em ambos os tratamentos, as colônias não apresentavam características completamente homogêneas e eram formadas por um conjunto de células com características embriogênicas, regiões meristemáticas com células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso e núcleo evidente e as células com características não embriogênicas, com células mais alongadas e dispersas, com grandes vacúolos, sendo esse tipo de célula mais evidente nas colônias do tratamento controle. Na análise de carboidratos, foi demonstrado que a glicose e a frutose foram encontradas em concentrações mais elevadas no decorrer do cultivo (28 dias), seguindo o mesmo padrão de variação em todos os tratamentos e genótipos. Na análise proteômica, foi possível associar um padrão de expressão diferencial de proteínas, com a capacidade de maturação de embriões somáticos em mamão. Nas amostras de proteínas solúveis totais, o número de *spots* expressos, exclusivamente, em T2 (70) foi um pouco mais do que o dobro do valor de controle (31), enquanto que 79 *spots* estavam presentes em ambos os tratamentos. Foram identificadas 180 proteínas e agrupadas de acordo com sua função biológica. As proteínas identificadas foram principalmente relacionadas a processos celulares e metabólicas, sendo mais abundante nas culturas sob estresse hídrico.

ABSTRACT

VALE, Ellen de Moura, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; April 2013; Proteomic analysis and determination of carbohydrates on somatic embryogenesis of papaya (*Carica papaya* L.). Advisor: Vanildo Silveira; Directors: Messias Gonzaga Pereira and Gonçalo Apolinario de Souza Filho.

This study aimed to establish a protocol for somatic embryogenesis in papaya genotypes adapted to Brazilian conditions and to compare the histomorphologic evolution, the carbohydrates contents and the protein profile differentially expressed related to the maturation of somatic embryos. For the induction of embryogenic cultures, isolated embryos from seeds of the Golden papaya variety and the F₂ generation of the hybrid (UENF / CALIMAN 01) were inoculated into MS medium culture supplemented with different concentrations of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) (0 µM, 10 µM and 20 µM) and NAA (naphthaleneacetic acid) (0 µM, 10 µM and 20 µM) at different stages of fruit ripening (100% green, 50% green and 100% yellow). For the maturation of these cultures three colonies of 300 mg fresh matter (FM) were collected and inoculated into MS medium culture supplemented with myo-inositol 0.005% and 3% sucrose, in varying concentrations of PEG (polyethylene glycol) (0%, 3% and 6%). 300 mg samples of all treatments were collected at 7-day intervals for the quantification of carbohydrates. The histomorphologic analysis was performed with samples collected every 7 days using T2 Control treatment cultures. At the end of 42 days of harvesting, 300 mg samples were collected for proteomic analysis of cultures

derived only from the F₂ Hybrid (UENF / CALIMAN 01), were subjected to extraction and subsequently to two-dimensional electrophoresis (2-DE). The gels were stained with Colloidal Coomassie, digitized and analyzed using the software Image Master Platinum v.7, the selected spots were identified by a mass spectrometry-type MS / MS (MALDI-TOF/TOF). The culture medium with a better rate of callus induction with an embryogenic aspect, for the two cultures, was the MS medium supplemented with 20µM of 2,4-D, the embryos derived from fruits between 3 and 5 stages, resulted in improved rates of induction. The PEG was important in the process of maturation, since the MS medium was supplemented with 6% of PEG (T2), which promoted a greater maturation of normal somatic embryos, although the control treatment has also promoted maturation of a number of abnormal embryos for both genotypes. In the histomorphological analysis, in both treatments colonies did not have completely homogeneous features and were formed by a set of cells with embryogenic characteristics, meristematic regions with small cells, they were isodiametric, with dense cytoplasm and evident nucleus and cells with non-embryogenic characteristics, with more elongated and dispersed cells, with large vacuoles. This latter type of cell was most evident in the colonies from the control treatment. In the carbohydrate analysis, it was demonstrated that glucose and fructose were found in a higher concentration throughout the harvest (28 days) following the same variation pattern in all the treatments and genotypes. In proteomic analysis it was possible to match a pattern on differential expression of proteins with the ability to mature somatic embryos in papaya. In the soluble protein samples, the number of expressed spots exclusively in T2 (70) was a little more than twice the amount for the control (31), whereas 79 spots were present in both treatments. One-hundred and eighty proteins were identified and grouped according to their biological function. The proteins identified were mainly related to cellular and metabolic processes, being more abundant in cultures under water stress.

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. O Brasil é, atualmente, o segundo maior produtor do fruto, tendo produzido, no ano de 2011, um volume de 1,8 milhões de toneladas de frutos (FAO, 2013).

Um dos fatores de entrave da produtividade do mamoeiro é a produção de mudas de boa qualidade, pois está ligada, diretamente, ao potencial de produção e à qualidade dos frutos, já que sua propagação, embora possa ser feita assexuadamente através da enxertia, estaquia ou cultura de tecidos, ainda ocorre via seminífera (Francisco et al., 2010).

Nesse contexto, a micropropagação eficiente de mamão tornou-se importante para a multiplicação de tipos sexuais específicos de mamão e na aplicação de tecnologias de transformação genética (Lai et al., 2000). Um progresso significativo foi alcançado, usando-se organogênese e embriogênese somática (Litz e Conover, 1982; Reuveni et al., 1990; Yu et al., 2003; Bhattacharya e Khuspe, 2003; Cabral et al., 2008; Tsai et al., 2009; Anandan et al.; 2012). Entretanto, atualmente, ainda não foi estabelecido um protocolo eficiente de micropropagação que justifique o seu emprego em nível comercial.

Comparativamente às demais técnicas de micropropagação, a embriogênese somática apresenta vantagens: permite a obtenção de uma grande quantidade de propágulos (embriões somáticos); o sistema permite um alto grau

de automatização, permitindo baixar os custos por unidade produzida, através da utilização de biorreatores; os embriões somáticos podem ser produzidos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização e pureza genética; pode ser utilizada como uma ferramenta integrada a programas de melhoramento genético, em especial quando associada às técnicas de criopreservação e engenharia genética (Guerra et al., 1999; Steiner et al., 2008).

Os processos que ocorrem ao longo da embriogênese são regulados por inúmeros fatores, como regulação endógena do conteúdo de fitormônios, proteínas, fatores de transcrição e outras substâncias relacionadas com a embriogênese. Muitos estudos têm sido realizados usando diversas técnicas experimentais com o objetivo de compreender os mecanismos que controlam esse processo (Ikeda et al., 2006).

Estudos em nível de proteoma e metabolismo de carboidratos associados ao desenvolvimento e controle da embriogênese somática ainda são esparsos, embora possam fornecer informações importantes sobre a competência e grau de evolução da morfogênese *in vitro*. A determinação das dinâmicas de alterações dos conteúdos de proteínas e carboidratos, no desenvolvimento embrionário, podem culminar na otimização de protocolos e, conseqüentemente, permitir o emprego de ferramentas biotecnológicas.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi estudar o processo de indução e controle da embriogênese somática nas cultivares Golden e UENF/CALIMAN 01 (Híbrido), por meio da identificação de proteínas expressas diferencialmente e da determinação do perfil de carboidratos em culturas embriogênicas. Tendo como objetivos específicos: 1) determinar os efeitos de dois reguladores de crescimento, 2,4-D e ANA, na indução de culturas embriogênicas; 2) determinar os efeitos do PEG na maturação de culturas embriogênicas; 3) determinar as variações nos conteúdos de proteínas solúveis e insolúveis, em calos embriogênicos provenientes de diferentes tratamentos de maturação; 4) estudar o padrão de expressão de proteínas, através da interface 2-DE x MS/MS, em calos embriogênicos provenientes de diferentes tratamentos de maturação; 5) caracterizar os diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de mamoeiro por meio de análises histomorfológicas; 6) determinar, quantitativa e qualitativamente, os carboidratos sintetizados nas culturas embriogênicas.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Mamoeiro

O mamoeiro (*Carica papaya* L.), membro da família Caricaceae, é uma das fruteiras mais cultivadas, e seus frutos um dos mais consumidos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Incaper, 2012), onde ela é cultivada em até 32° de latitude Norte ou Sul, encontrando-se ótimas condições para o seu desenvolvimento e produtividade (Schmildt et al., 2005).

Sua produção, no ano de 2011, foi de cerca de 11,8 milhões de toneladas numa área de 421,51 mil hectares, representando um rendimento de 28,1 t.ha⁻¹. Os cinco países maiores produtores dessa fruta, no ano de 2011, foram Índia, Brasil, Indonésia, Nigéria e México (FAO, 2013) (Tabela 1).

O Brasil, como terceiro maior produtor de frutas do mundo e segundo maior produtor mundial de mamão, apresentou uma produção de 1,85 milhões de toneladas em 2011 (FAO, 2013). O cultivo do mamoeiro é realizado em quase todo o território brasileiro, concentrado na Bahia (49,7%) e no Espírito Santo (30,7%) (IBGE, 2013). As maiores produtividades são observadas no Espírito Santo (79 t.ha⁻¹), Bahia (60 t.ha⁻¹) e Ceará (43 t.ha⁻¹) (Tabela 2).

Tabela 1. Produção mundial de mamão em 2011.

País	Produção (t)	Área Colhida (ha)	Participação (%)
Índia	4.180.080	104.307	35,3
Brasil	1.854.340	35.531	15,6
Indonésia	958.251	11.055	8,1
Nigéria	705.000	94.000	5,95
México	634.369	14.223	5,35
Outros	3.506.611	162.398	29,7
Total	11.838.651	421.514	100,0

Fonte: FAO, 2013.

Tabela 2. Produção brasileira de mamão em 2011.

Estados	Área Colhida (ha)	Produção (t)	Rendimento (Kg/ha)
Bahia	15.264	928.035	60,7
Espírito Santo	7.069	560.576	79,3
Ceará	2.612	112.579	43,1
Rio Grande do Norte	1.991	69.410	34,8
Minas Gerais	1.364	44.948	32,9
Outros	7.231	138.795	19,2

Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal.

A cultura do mamoeiro possui grande importância econômica, especialmente devido ao potencial aumento de demanda no mercado internacional. Segundo Hinojosa e Montgomer (1988), o mamão contém açúcares, vitaminas A, B1, C e niacina, além de ser fonte de cálcio (Oliveira et al., 1994). Dele podem ser extraídos diversos produtos como a papaína e a carpaína, um alcalóide utilizado como ativador cardíaco (Oliveira et al., 1994).

O desenvolvimento da cultura tem sido limitado por fatores relacionados à sexagem, à suscetibilidade a doenças e à falta de métodos comerciais de multiplicação vegetativa (Rajeevan e Pandey, 1986; Almeida et al., 2000).

Embora o mamoeiro possa ser propagado assexuadamente através da enxertia, estaquia ou cultura de tecidos, sua produção, ainda, é exclusivamente seminífera (Francisco et al., 2010). Em função dos altos preços praticados no mercado, muitos produtores optam por produzir suas próprias sementes, contribuindo, com isso, para que sejam multiplicados e disseminados materiais genéticos de baixo padrão de qualidade (Alves et al., 2003).

As variedades do mamoeiro podem ser agrupadas em dois grupos principais: Solo e Formosa (Dias et al, 2011). No grupo Solo, algumas variedades destacam-se como mais plantadas: Sunrise Solo, Improved Sunrise Solo, Baixinho de Santa Amália, Sunrise Golden e Taiwan. No grupo Formosa, as seguintes cultivares são cultivadas no Brasil: Tainung n.1 e UENF/CALIMAN 01 (Costa e Pavoca, 2003).

O mamão Golden é uma cultivar brasileira que se originou através de mutação natural que foi selecionada por Caliman S/A em Linhares, Espírito Santo (Pommer e Barbosa, 2009), apresentando características agradáveis, como a doçura e vermelhidão da polpa, maciez, menor ocorrência de machas fisiológicas na casca, sabor não tão adocicado e indicativos de vida pós-colheita superior (Fabi et al., 2007).

O mamoeiro UENF/CALIMAN 01 é um híbrido nacional, desenvolvido a partir de progenitores do grupo 'Formosa' e 'Solo'. Esse híbrido permitirá ao Brasil economizar, potencialmente, cerca de US\$ 2 milhões por ano em material genético importado. Além dessa economia, os riscos de introdução de novas pragas na cultura, associados a sementes importadas, serão, substancialmente, minimizados (Pommer e Barbosa, 2009).

1.2. Biotecnologia aplicada ao Melhoramento de Plantas

O melhoramento de plantas tem uma longa história de integração com a biologia e a genética. Desde a pré-história, ele vem sendo utilizado para a seleção de fenótipos viáveis, podendo ser considerado o primeiro exemplo de biotecnologia em plantas (Moose e Mumm, 2008).

A partir dos anos 70, com o desenvolvimento de técnicas para o cultivo de células e cultura de tecidos e sua aplicação a uma vasta gama de espécies

(Drew, 1997), foi possível, logo nos anos 80, um grande avanço biotecnológico com os primeiros relatórios de produção de plantas transgênicas, utilizando-se agrobactéium. Esse desenvolvimento, em conjunto com os avanços em genômica e o desenvolvimento dos marcadores moleculares, estabeleceu novas ferramentas para a criação, análise e manipulação do material genético como também para o desenvolvimento de cultivares melhoradas (Moose e Mumm, 2008).

O emprego de técnicas biotecnológicas ao melhoramento do mamoeiro inclui técnicas como a micropropagação, embriogênese somática, resgate de embriões, transformação genética, marcadores moleculares (Ashmore e Drew, 2006; Sun et al., 2011), cultura de anteras, isolamento e cultivo de protoplastos, seleção *in vitro* e produção de sementes artificiais (Oliveira et al., 1996).

Particularmente, a embriogênese somática apresenta grande potencial como sistema modelo para estudos de eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares e bioquímicos em plantas superiores, apresentando aplicações biotecnológicas, tais como produção de sementes sintéticas, micropropagação e transformação genética (Castro et al., 2010).

Um exemplo de avanço importante oriundo da embriogênese somática foi a produção das primeiras plantas triplóides derivadas da cultura de endosperma de mamoeiro. Esse protocolo vislumbra a produção de frutos sem semente, em face da grande preferência desse tipo de fruto pelos consumidores (Sun et al., 2011).

Em mamoeiro, um exemplo da utilização de técnicas biotecnológicas, em particular de técnicas de cultivo *in vitro*, foi um extenso programa de pesquisa financiado pelo Centro Australiano para a Pesquisa Agrícola Internacional (ACIAR), onde foram desenvolvidas técnicas de hibridação interespecífica e resgate de embriões de mamão e parentes silvestres (Drew et al., 1995). Neste projeto, foram produzidos híbridos entre *C. papaya* e *C. cauliflora*, *C. quercifolia*, *C. pubescens*, *C. parviflora* e *C. goudotiana*. Dentre as características mais importantes de espécies silvestres de mamão, incluem-se resistência ao vírus da mancha anelar, resistência à *Phytophthora*, alto teor de açúcar e as características ornamentais (Drew, 1997).

Em mamoeiro, também é possível observar projetos com ênfase em transformação genética, sendo que as principais características estudadas são a resistência ao *papaya ringspot vírus* (PRSV) (Carmo e Souza Junior, 2003), causador da mancha anelar do mamoeiro, que é a principal doença que limita o cultivo da fruta em todo o mundo (Martins, 2003), e a maturação tardia dos frutos (OGTR, 2003)

Em trabalhos de transformação genética de mamão, utilizando-se tanto a biobalística quanto *Agrobacterium*, verificou-se que a eficiência do sistema utilizado depende do tipo de explante utilizado, sendo os principais tipos de explantes empregados embriões somáticos ou calos embriogênicos derivados de embriões zigóticos imaturos e segmentos de hipocótilo de plantas germinadas *in vitro* (Carmo e Souza Junior, 2003).

Outro aspecto importante da biotecnologia vegetal foi o desenvolvimento das técnicas de marcadores de DNA, que trouxeram novos avanços para o melhoramento genético vegetal de várias culturas. Dentre suas diversas aplicações, estão os estudos de divergência genética em populações, a confecção de mapas genéticos de ligação (Ferreira e Grattapaglia, 1988; Pereira et al., 1994) e o mapeamento de QTLs (Pereira e Lee, 1995), além de ser ferramenta importante em trabalhos de seleção assistida por marcadores (Cattaneo, 2003).

A utilização da Biotecnologia vegetal pode representar uma importante estratégia para o melhoramento vegetal, podendo contribuir e acelerar o desenvolvimento de cultivares melhoradas.

2.3. Embriogênese Somática

Embriogênese zigótica é um processo complexo e essencial que inicia o ciclo de vida das plantas superiores. Ela pode ser dividida em duas etapas principais: a primeira caracterizada pela divisão celular e diferenciação do embrião e a segunda pela maturação do embrião, onde ocorre o acúmulo dos principais compostos de reserva e a preparação do embrião para a tolerância à desidratação, dormência e germinação (Sallandrouze et al., 2002).

Na natureza, a maioria das espécies reproduz-se via seminífera, cuja formação do embrião se inicia na divisão assimétrica do zigoto, dando origem a uma célula apical e a outra basal, que dará origem ao embrião globular. O embrião globular progride morfológicamente até atingir o estágio cotiledonar, onde ocorre a iniciação do primórdio radicular, seguido pelo caule, no caso de não monocotiledônea (Almeida, 2007).

A embriogênese somática é uma técnica de cultivo *in vitro*, em que células isoladas ou um pequeno grupo de células somáticas dão origem a embriões (Tautorus et al., 1991). Esse sistema é utilizado para a propagação massal de plantas elites, apresentando grande potencial, pois possibilita elevadas taxas de multiplicação (Gupta et al., 1993; Santa Catarina et al., 2001).

O primeiro caso de embriogênese somática *in vitro* foi relatado por Steward et al. (1958), em tecidos de cenoura (*Daucus carota* L.) (Donato et al., 2000). A partir daí, essa técnica tem sido utilizada em várias espécies de plantas, partindo-se de uma grande variedade de explantes, como micrósporos, protoplastos, embriões imaturos, explantes de tecidos e células cultivados *in vitro* (Schmidt et al., 1997).

Este processo pode ser dividido em quatro fases: 1) a indução em meios de culturas contendo auxinas (mais frequentes) e citocininas (menos frequentes); 2) multiplicação em meios contendo auxinas em baixas concentrações; 3) maturação em presença de ABA e/ou agentes osmóticos e 4) germinação em meios de cultura isentos de fitorreguladores (Guerra et al., 1999).

Em mamoeiro, essa técnica foi iniciada por Bruijne et al. (1974), utilizando-se pecíolos como explante. Entretanto, as primeiras plântulas somáticas só foram regeneradas em 1977, utilizando-se entrenós como explantes (Yie e Liaw, 1977). Esses primeiros trabalhos já demonstravam que a auxina era fundamental para o início e subsequente crescimento de calos. A partir daí, diversos trabalhos vêm sendo realizados no intuito de desenvolver um protocolo eficiente e que permita sua utilização a nível comercial.

Com esse propósito, diversas fontes de explante já foram testadas em mamoeiro, como: pecíolo (Bruijne et al., 1974); entrenó (Yie Liaw, 1977); raízes (Arora e Singh, 1978; Chen et al., 1987; Lin e Yang, 2001); óvulos (Litz e Conover, 1980, 1981, 1982 e 1983); hipocótilo (Fitch, 1993); epicótilo (Consoli et al., 1995); mas o embrião zigótico tem sido o explante mais utilizado (Fitch et al.

1990; Magdalita et al. 2002; Bhattacharya e Khuspe, 2003; Farzana et al., 2008; Anandan et al., 2012; Azad et al., 2012).

Diversos fatores podem afetar o sistema de cultura *in vitro* de mamoeiro, tais como o sexo, clone, idade da planta, época de coleta dos explantes, tipo de explante, infecções sistêmicas, além de fatores relacionados à composição do meio de cultivo e às condições de cultura (Oliveira et al., 1996; Almeida et al., 2000).

Na embriogênese somática, o estágio de desenvolvimento dos embriões zigóticos utilizados como fonte de explante é fundamental para a expressão de seu potencial morfogênético (Chalupa, 1999; Santa Catarina et al., 2001). A germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos e maduros pode ser utilizada para o resgate de embriões em programas de conservação e melhoramento genético, na recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis e, também, como fonte de explante para a cultura de tecidos (Zhang e Lespinasse, 1991; Mortiz et al., 2009).

Os reguladores de crescimento são considerados os principais fatores responsáveis pelo desencadeamento da resposta morfogênética induzida *in vitro*, inclusive da embriogênese somática (Gaj et al., 2006)

A auxina é considerada o fitorregulador mais importante na regulação da embriogênese somática *in vitro* (Cooke et al., 1993). Sua presença contínua induz a síntese de proteínas necessárias para iniciar a formação do embrião somático até o estágio globular e inibir a sua diferenciação para os demais estágios de desenvolvimento embrionário (Zimmerman, 1993).

Em geral, a fase de maturação ocorre com a retirada da auxina do meio e a adição de promotores de maturação. Como produtos desse segundo ciclo, são obtidos embriões somáticos maduros passíveis de germinação *in vitro* e *ex vitro* ou que podem, ainda, ser utilizados para produção de sementes sintéticas (Steiner et al., 2008).

As principais substâncias promotoras de maturação são o ácido abscísico (ABA); agentes osmóticos, como polietilenoglicol (PEG), carboidratos e hexitois e carvão ativado (Thorpe, 1995; Lakshmanan, 2006).

A adição de ABA ao meio de cultura, durante a maturação, provoca mudanças na morfologia, no padrão de expressão gênica e no metabolismo de substâncias de reserva (Salajova et al., 1999), contribuindo, assim, para a

promoção do desenvolvimento normal dos embriões somáticos e sua conversão em plântula em várias espécies (Stasolla e Yeung, 2003).

O PEG é um agente osmótico não plasmolizante, que não penetra nas células vegetais (Svobodová et al., 1999); a adição desse agente osmótico ao meio de cultura reduz a disponibilidade de água, simulando as condições do desenvolvimento zigótico, promovendo a histodiferenciação do embrião (Stasolla e Yeung, 2003).

Estudos com diferentes espécies demonstram um aumento na quantidade e na qualidade dos embriões somáticos quando o meio de cultura utilizado na maturação continha ABA e PEG (Klimaszewska e Smith, 1997; Guerra et al., 2000).

Os carboidratos, como sacarose e maltose, atuam como fonte de carbono e, também, como agentes osmóticos plasmolizantes (Shoji et al., 2006). Sua quebra disponibiliza a glicose que é, rapidamente, assimilável pelas células vegetais (Salajova et al., 1999).

O carvão ativado, também, vem sendo utilizado com frequência para otimizar ou regular o crescimento de plantas *in vitro* (Lameira et al., 1997). O seu efeito benéfico é atribuído à adsorção de compostos fenólicos (Perera *et al.*, 2008) e ao excesso de fitormônios, vitaminas, etileno (Van Winkle et al., 2003) e demais substâncias que podem comprometer o crescimento vegetal.

Estudos em nível de proteoma e metabolismo de carboidratos associados ao desenvolvimento e controle da embriogênese somática podem fornecer informações importantes sobre a competência e grau de evolução da morfogênese *in vitro* e suas dinâmicas de alterações no desenvolvimento embrionário.

2.4. Análise proteômica na embriogênese

Atualmente, a segurança alimentar e os problemas relacionados a ela têm sido um dos temas mais discutidos em todo o mundo. Nos últimos anos, a associação do melhoramento de plantas à biotecnologia agrícola vem proporcionando grandes avanços nessa área, principalmente relacionados ao aumento de produtividade, resistência a doenças e ganho nutricional. Entretanto,

novas abordagens devem somar-se a elas no intuito de buscar a resolução desses problemas (Agrawal et al., 2013).

Nesse contexto, a proteômica tem um grande potencial para gerar novos avanços, já que atende a abordagens como: estudo de plantas não-modelo, biocombustíveis, estresses bióticos e abióticos, tecnologia pós-colheita, análise de alimentos, culturas geneticamente modificadas e alérgenos (Agrawal et al., 2013).

O termo proteoma foi cunhado para descrever todas as proteínas expressas em uma determinada célula, tecido ou organismo (Wasinger et al., 1995). Essa tecnologia permite a análise global dos produtos dos genes em vários tecidos e estados fisiológicos de células (Park, 2004).

Os estudos em proteômica apresentam quatro importantes justificativas: 1) a função gênica é levada à “ação” pelas proteínas; 2) a maior parte dos genes identificados não tem nenhuma função conhecida; 3) a informação obtida usando transcriptoma é incompleta, reflexo das modificações pós-traducionais e das interações proteína-proteína e 4) a correlação entre mRNA e níveis de proteínas é baixa (Jorin et al., 2006; Dias et al., 2009).

A pesquisa em proteômica vegetal, ainda, é pouco desenvolvida, quando comparada à área das humanas, tendo como principais espécies de estudo *Arabidopsis*, arroz e trigo (Foster et al., 2006; Godoy et al., 2006). Embora a eletroforese bidimensional seja um processo relativamente trabalhoso e demorado, a principal estratégia de análise proteômica em plantas consiste na separação das proteínas através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE), seleção das proteínas no gel, digestão e posterior identificação das proteínas por espectrometria de massas e cruzamento com os bancos de dados disponíveis (Cánovas et al., 2004; Dias et al., 2007; Takáč et al., 2011) (Figura 1).

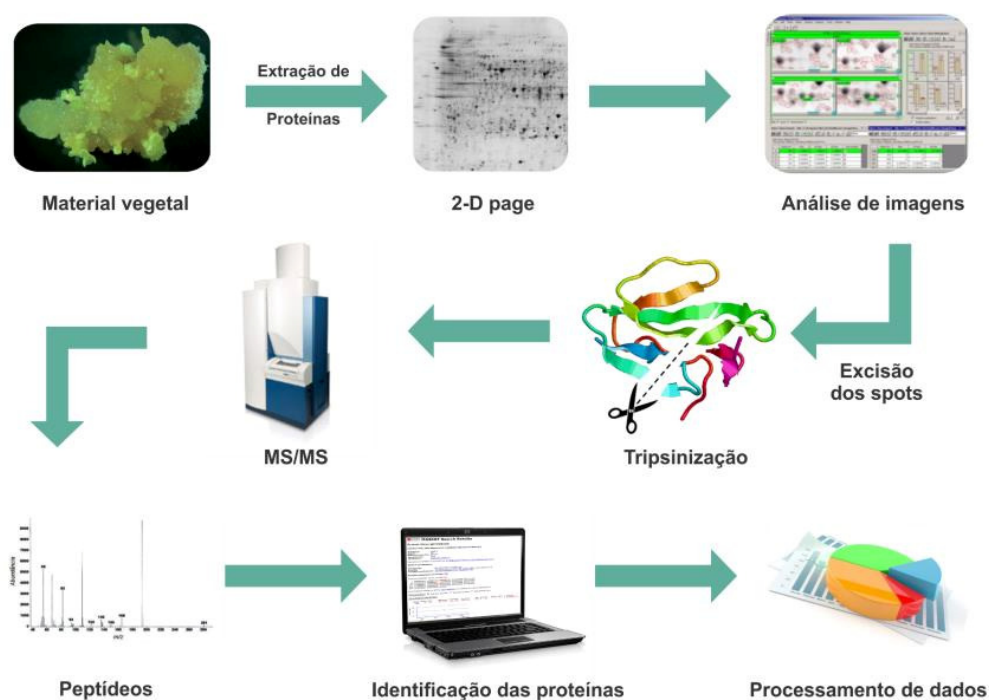


Figura 1. Etapas da análise proteômica em plantas, utilizando-se a plataforma 2-DE.

Diversos estudos sobre o desenvolvimento das plantas vêm sendo realizados, sendo a embriogênese, maturação de sementes e germinação os processos de desenvolvimento mais estudados, com trabalhos já publicados em *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *M. truncatula*, *Zea mays*, *Brassica napus* e *Fagus sylvatica* (revisão de Jorrín-Novo et al., 2009). Esses estudos têm fornecido informações importantes acerca das proteínas envolvidas nesses processos (Figura 2).

Em culturas de tecidos vegetais, o nível endógenos de hormônios é artificialmente modificado para dirigir, especificamente, o destino celular. O uso de proteômica em sistemas de cultura de tecidos pode ajudar a detectar proteínas que são reguladas por hormônios (Takáč et al., 2011).

Desenvolvimento da Planta

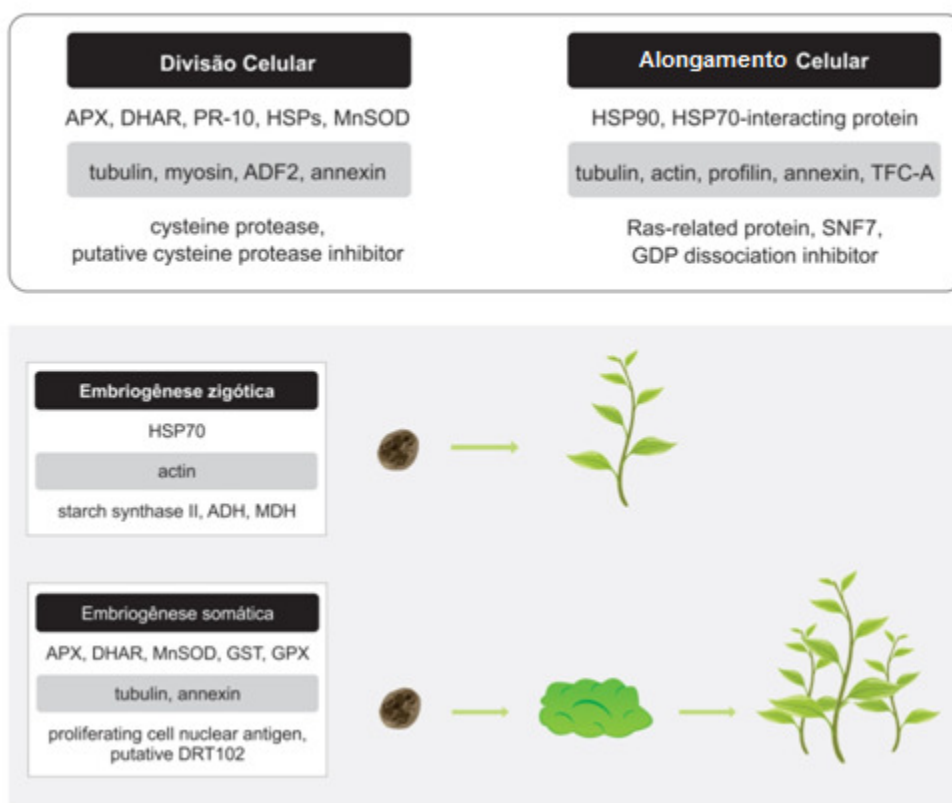


Figura 2. Proteínas mais representativas para diversos processos do desenvolvimento da planta identificadas em experimentos de proteômica. APX = ascorbato peroxidase, Dhar = dehydroascorbatereductase, PR-10 = relacionadas à patogênese proteína 10, MnSOD = manganês superóxido dismutase, HSP = proteína de choque térmico, ADF2 = fator de despolimerização de actina 2, TFC-A = A tubulina formando cofactor, proteína SNF7 = encontrados em sacarose não fermentadores, ADH mutante álcool desidrogenase, MDH = malato desidrogenase, GST = glutationa transferase, GPX = glutationa peroxidase, MDAR monodehydroascorbate = redutase, CPN-60 = chaperonina 60. (Adaptado de Takáč et al., 2011).

Com isso, a identificação de proteínas diferencialmente expressas durante o desenvolvimento vegetal configura-se como um potente marcador molecular do metabolismo em plantas, podendo fornecer informações sobre o monitoramento e compreensão de diferentes respostas biológicas (Gifford, 1988; Campalans et al., 2000; Garelo et al., 2000).

Um dos maiores entraves ao avanço da proteômica em plantas é a falta das sequências de DNA genômico ou de *Expressed sequence tag* (ESTs), existindo, apenas, informações para poucas espécies. A atualização e expansão

dos bancos de dados com um maior número de espécies facilitaria a identificação das moléculas por espectrometria de massas (Silveira et al., 2011).

O mamoeiro, cujo genoma foi sequenciado em 2008, apresenta-se como um excelente sistema para estudos de genômica funcional e proteômica, por possuir um genoma relativamente pequeno distribuído em nove cromossomos (Ming et al., 2008).

Portanto, estudos dessa natureza podem fornecer informações para o desenvolvimento de marcadores para a embriogênese somática, relacionando, assim, os estágios embriogênicos e suas alterações nos perfis protéicos com o desenvolvimento embrionário (Campalans et al., 2000).

2.5. Determinação de carboidratos durante a embriogênese somática

O desenvolvimento embrionário envolve distintos, porém integrados processos, como mitose, estabelecimento de polaridade, diferenciação celular, síntese de metabólitos complexos e estoque de substâncias de reserva (Pescador et al., 2008).

Os níveis de açúcares solúveis, tais como glicose e sacarose, são conhecidos por regular os processos de desenvolvimento, abrangendo desde o desenvolvimento do embrião até a senescência (Gibson, 2005). Eles podem atuar como moléculas de sinalização e/ou como reguladores da expressão gênica (Eveland e Jackson, 2012).

Na embriogênese somática, a variação dos carboidratos solúveis e do amido podem fornecer informações importantes sobre a conversão de embriões somáticos em plântulas (Pescador et al., 2008).

O acúmulo adequado de reservas, como carboidratos solúveis, amido e proteínas, afeta a embriogênese somática, sendo crucial para a retomada do desenvolvimento após a obtenção de embriões cotiledonares (Chanprame et al., 1998; Mengarda et al., 2009). O acúmulo desses compostos, segundo Hoekstra e Golovina (1999), pode ser responsável pela proteção das células embrionárias durante a dessecação, substituindo a água na manutenção de estruturas hidrofílicas, evitando a formação de cristais intra e intercelulares. Eles também

são importantes na formação do embrião, atuando como sinalizadores do processo morfogênético (Lou et al., 1996; Mengarda, 2009)

A presença de carboidratos no meio de cultura é fundamental para o desenvolvimento regular dos explantes na formação e desenvolvimento de raízes adventícias, pois essas não são estabelecidas com facilidade para diversas plantas, já que a indução e crescimento das mesmas são processos que requerem muita energia (Custodio et al., 2004).

A utilização de calos de mamão fornece, então, um modelo experimental apropriado para a caracterização qualitativa e quantitativa do metabolismo de carboidratos em calos embriogênicos e não embriogênicos, e a identificação de possíveis marcadores bioquímicos para a embriogênese, conforme estudado em outras espécies (Martin et al., 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Indução das Culturas

Para introdução das culturas *in vitro*, foram utilizadas sementes de frutos em diferentes estádios de maturação, (0, 3 e 5), respectivamente, completamente verdes, 50% amarelos e 100% amarelos, da cultivar Golden e híbrido UENF/CALIMAN 01 (UC01).

Para determinação da melhor condição de meio de cultura, foram utilizados embriões zigóticos de mamão no estágio 0 de maturação do fruto para as linhagens Golden e UC01. Os frutos foram desinfestados por 2 min em etanol 70% e 30 min em água sanitária comercial 50%, seguido de três lavagens com água destilada e autoclavada. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram individualizadas e os embriões isolados para serem utilizados como explante. Os embriões isolados foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescidos de vitaminas, sacarose (20 g.L⁻¹), phytigel[®] (2,0 g.L⁻¹) e suplementados com diferentes concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (0 µM, 10 µM e 20 µM) ou ANA (ácido naftalenacético) (0 µM, 10 µM e 20 µM). O pH foi ajustado para 5,8 e os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 15 min. Após a inoculação dos explantes, os tubos de ensaio foram mantidos em estufas de crescimento com temperatura de 25 ± 1 °C, no escuro, durante, aproximadamente,

45 dias. Foram utilizadas três repetições formadas por 10 tubos de ensaio para cada tratamento.

A partir dos resultados desse primeiro experimento, foi realizado um novo ensaio a fim de determinar o efeito do estágio de desenvolvimento embrionário na indução das culturas. Foram utilizados três estádios diferentes de maturação do fruto (0; 3 e 5) para as linhagens Golden e híbrido, fixando a concentração de 20 μM de 2,4-D ou ANA, que apresentaram os melhores resultados no experimento anterior. O pH foi ajustado para 5,8 e os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 15 min. Após a inoculação dos explantes, os tubos de ensaio foram mantidos em estufas de crescimento com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro. Cada tratamento foi constituído por 5 repetições formadas por 10 tubos de ensaio. Após 30 dias, foram avaliados a porcentagem de indução e o diâmetro dos calos induzidos.

Os dados foram submetidos à análise de variância e às médias comparadas pelo teste SNK a 5%, utilizando o programa SAEG v. 9.1.

3.2. Maturação das culturas embriogênicas

As culturas induzidas para os genótipos Golden e UC01 foram submetidas a quatro ciclos de repicagem com intervalos de 21 dias, para a multiplicação, e, posteriormente, foram transferidas para os tratamentos de maturação. Foi utilizado o meio de cultura MS suplementado com mio-inositol 0,005% e sacarose 3%, variando na concentração de PEG MW 3350 (polietilenoglicol) (0%, 3%, 6% e 9%) (Tabela 3). O pH foi ajustado para 5,8 e os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 15 min.

Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada uma composta pela inoculação de três colônias de 300 mg de MF e uma placa de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura do respectivo tratamento.

Tabela 3. Tratamentos para a maturação dos calos de mamoeiro.

Tratamentos	PEG (%)
Controle	0
T1	3
T2	6
T3	9

As placas de Petri foram, então, incubadas em câmara de crescimento à 25°C, em um regime de 16h no claro e 8h no escuro por 42 dias, repicando o material a cada 21 dias. Foram avaliados a porcentagem de maturação, o incremento de matéria fresca e o número de embriões maduros ao final dos 42 dias e a contagem do número de embriões somáticos por estágio de desenvolvimento a cada sete dias até o 28º dia de cultivo.

Os dados foram submetidos à análise de variância e às médias comparadas pelo teste SNK a 5%, utilizando o programa SAEG v. 9.1.

Amostras de 300 mg de matéria fresca foram armazenadas a -20º C para eletroforese de proteínas e determinação de carboidratos.

3.3. Germinação dos embriões somáticos

Para germinação dos embriões somáticos, foi preparado um meio MS suplementado com 3% de sacarose, 5,5 g/L de mio-inositol e 7g/L de Agar de acordo com Clarindo et al. (2008). Foram utilizados frascos de 240 mL de capacidade, contendo 30 mL de meio de cultura. Em cada frasco, foram inoculados cinco embriões maturados em cada e estes foram mantidos em câmara de crescimento à 25°C, em um regime de 16h no claro até a germinação.

3.4. Análise histomorfológica das culturas

As análises histomorfológicas foram conduzidas para amostras de calos embriogênicos dos genótipos Golden e UC01 para amostras coletadas em

intervalos de 7 dias ao longo do experimento de maturação para os tratamentos Controle e T2.

As amostras foram fixadas em solução aquosa, contendo glutaraldeído (2,5 %) e formaldeído (4,0 %) diluídos em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) pH ~7,2, sob temperatura ambiente, durante 24 h. Após lavagem por 45 min em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) pH ~ 7,2, as amostras foram submetidas a séries etanólicas crescentes (30, 50, 70, 90 e 100 %), por três vezes de 1 h em cada etapa. Em seguida, as amostras foram infiltradas com historesina (Leica) e etanol 100% (1:1; v/v) por 12 h, seguido de resina 100% por 24 h.

As amostras foram emblocadas em historesina, e cortes de 3 a 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo (Leica) e corados com solução aquosa de azul de toluidina (1,0%). As lâminas foram observadas em microscópio óptico Axioplan ZEISS (Carls Zeiss, Jena, Germany), adaptado com câmera digital AxioCam MRc5 para captura de imagens e software AxioVisionLE versão 4.8 (Carls Zeiss, Jena, Germany) para análise das imagens.

3.5. Determinação de carboidratos

Amostras de calos embriogênicos dos genótipos Golden e UC01 foram coletadas em intervalos de 7 dias ao longo do experimento de maturação para determinação dos conteúdos endógenos de carboidratos, em todos os tratamentos. A metodologia utilizada para a determinação de carboidratos foi baseada na proposta por Filson et al (2009), com modificações.

Para a determinação dos carboidratos, foram utilizadas amostras de 300 mg de MF de calos de mamão que foram maceradas com a adição de 1 mL de solução de extração composta por etanol (ETOH) 80%, polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 3% (p/v) e ácido ascórbico 1% (p/v) a 4 °C. Após a maceração, a amostra foi agitada, brevemente, em vórtex, e os microtubos foram levados ao banho-maria a 70°C por 90 min.

Após a retirada dos microtubos do banho-maria, os mesmos foram centrifugados a 12000g por 10 min, sendo procedida a coleta e o armazenamento do sobrenadante e ressuspenso o pellet em 1 mL de solução de extração, resubmetida a centrifugação nas mesmas condições anteriores. Os

sobrenadantes resultantes foram adicionados aos provenientes da primeira centrifugação e armazenados a -20°C . Os carboidratos foram identificados e quantificados por HPLC, usando-se um detector de espalhamento de luz (ELSD-LT II), com a seguinte configuração do detector: temperatura de 40°C ; pressão de N_2 em 350 mPa, com ganho 9 e filtro 4.

A coluna utilizada, que representa a fase estacionária (FE), foi uma coluna Prevail Carbohydrate ES $5\ \mu\text{m}$ ($250 \times 4,6\ \text{mm}$), com uma pré-coluna do tipo Prevail Carbohydrate ES $5\ \mu\text{m}$ ($7,5 \times 4,6\ \text{mm}$), sendo a temperatura do forno de colunas mantida a 25°C .

Como solventes, que representam a fase móvel (FM), foram utilizados: Água Milli-Q, como solvente A, e acetonitrila 100%, como solvente B, sendo ambas as soluções submetidas à filtração prévia, em filtros de $0,2\ \mu\text{m}$. A corrida foi realizada em gradiente isocrático ajustado para 85% de solvente B durante 50 min. O fluxo de corrida foi determinado em vazão de $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

As áreas e tempos de retenção dos carboidratos glicose, frutose e sacarose foram avaliados por comparação com padrões em diferentes concentrações.

3.6. Análise Proteômica

As análises proteômicas foram conduzidas para amostras de calos embriogênicos da população UC01, coletadas ao final de 42 dias de cultivo do experimento de maturação dos tratamentos Controle e T2. A etapa de espectrometria de massas foi realizada em parceria com a FIOCRUZ, mediante colaborações previamente estabelecidas.

3.6.1. Preparo da amostra – Extração proteica

Extratos proteicos foram preparados em triplicatas biológicas (300mg FM) para cada tratamento de maturação. As proteínas solúveis foram extraídas a partir dessas culturas, de acordo com o método descrito por Santa-SC et al. (2006). As proteínas foram extraídas com um tampão de fosfato (pH 7,5), contendo 50 mM

de fosfato de sódio dibásico, 10 mM de 2-mercaptoetanol e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos claros, e as proteínas foram precipitadas por duas vezes, em gelo, durante 30 minutos, em ácido tricloroacético (10%), e lavaram-se três vezes, com acetona fria. Finalmente, as proteínas foram re-suspensas e concentraram-se em 0,5 mL de tampão de ureia / tiourea, com adição de 0,5% de gradiente imobilizados (IPG) em solução tampão de pH (pH 4-7) (GE Healthcare), em vez de Pharmalyte. A concentração de proteína foi estimada por 2-DQuantKit (GEHealthcare).

3.6.2. Eletroforese Bidimensional (2-DE)

Para a realização da eletroforese bidimensional (2-DE), alíquotas de proteína (500 µg) foram precipitadas com TCA (ácido tricloroacético) 10%.

O pellet resultante foi ressuspenso em 375 µL de tampão de reidratação composto por ureia (7M), tiourea (2M), CHAPS (2%), IPG Buffer (0,5%), azul de bromofenol (0,002%) e DTT (1%) (Balbuena, 2009).

A focalização isoeletrica (IEF) foi conduzida numa unidade IPGPhor 3 (GE HealthCare). Foram utilizadas tiras de gel IPG de 18 cm, com gradientes de pH 4-7. A reidratação da tira de gel IPG (strip) e o carregamento da amostra foram realizados, simultaneamente, com a aplicação direta das amostras solubilizadas no tampão de reidratação.

A reidratação da tira de gel IPG foi conduzida por 12 h, a 20 °C. A IEF foi configurada de acordo com recomendações do fabricante.

Antes do início da segunda dimensão, as tiras de gel IPG foram reduzidas (125 mM ditioneitol) e alquiladas (125 mM iodoacetoamida).

A segunda dimensão foi conduzida num sistema Protean II XI cell (BIO-RAD®), com a utilização de uma fonte modelo Power Pac Universal (BIO-RAD®), para geração de corrente elétrica, onde cada tira de gel foi disposta, horizontalmente, na extremidade superior do gel de poliacrilamida 12% e a separação eletroforética foi conduzida com corrente constante por gel de 12,5 mA nos primeiros 30 min e 25 mA até atingir o final da corrida.

As proteínas foram visualizadas pela coloração com Coomassie coloidal proposta por Neuhoff et al. (1985).

3.6.3. Análise de imagens

Os géis corados foram digitalizados e analisados no programa Image Master Platinum v.7.0 (GE Healthcare®). Foram utilizados géis em triplicata para cada amostra biológica. A autenticidade e o contorno de cada *spot* de proteína foram validados por inspeção visual e editados quando necessário. A identificação e seleção de proteínas expressas diferencialmente foram obtidas através de análises comparativas dos diferentes géis. Após a digitalização, os géis foram desidratados através da incubação em solução 3% de glicerol e 30% metanol por 12h e posterior secagem e imobilização em papel celofane hidrofílico para serem utilizados, posteriormente, na identificação de massas.

3.6.4. Identificação de proteínas

Após a análise dos géis no *software* Image Master Platinum v.7 (GE Healthcare®) e seleção dos *spots*, os mesmos foram excisados dos géis e cortados em pedaços menores de, aproximadamente, 1 mm². Os *spots* selecionados foram digeridos com tripsina de acordo com a metodologia proposta por Silveira et al. (2008). Após a excisão, os *spots* foram submetidos à adição de 350 µL de água por 5 minutos, procedendo-se à remoção da água e adição de 190 µL de acetonitrila por 20 minutos. Decorrida essa etapa, retirou-se o excesso de acetonitrila, e iniciou-se a secagem no Speed vac Plus - SC210A –Savant, por 15 minutos. Após a secagem, adicionou-se 15 µL de uma solução de tripsina (Promega, Madison, WI) com uma concentração final de 33 ng/µL, a fim de que a mesma cobrisse os pedaços de gel e permanecesse em contato com os pedaços de gel por 60 minutos, sob banho de gelo. Após esse período, removeu-se o excesso de tripsina e iniciou-se a incubação em banho-maria a 58°C por 30 minutos.

Decorrida a digestão pela ação da tripsina, adicionaram-se 30 µl de uma solução de ácido fórmico 5%/acetonitrila 50%, sendo a mesma vortexada por 20 segundos, ultassonicada por 10 minutos e, novamente, vortexada por 20 segundos. Esse procedimento foi repetido a fim de que, ao final do mesmo, fosse obtida uma solução de peptídeos, que foi concentrada em Speed Vac até o

volume aproximado de 10 μ L. Os peptídeos contidos na solução resultante foram concentrados e dessalinizados com o uso de ponteiras do tipo Zip Tip C18 (Millipore®) anteriormente à espectrometria de massas.

Com a obtenção da amostra concentrada e dessalinizada da solução de peptídeos, procedeu-se à preparação para análise por espectrometria de massas. Para a identificação das sequências de peptídeos por espectrometria de massas, foram aplicados 0,3 μ l de amostra e 0,3 μ l de matriz (Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinamico-Sigma®), sendo a leitura das amostras realizada no Espectrometro de Massas do tipo MS/MS (MALDI-TOF/TOF) - AB SCIEX TOF-TOF 5.800 (Applied Biosystems®).

As sequências de peptídeos obtidas foram submetidas à análise *in silico* no programa MASCOT (www.matrixscience.com), para a identificação de proteínas. A lista de peptídeos foi pesquisada, usando-se as bases de dados de proteína NCBI (National Center for Biotechnology Information) e SwissProt (Swiss Institute of Bioinformatics).

A classificação funcional e determinação da função molecular das proteínas, identificadas pelo programa MASCOT, foram obtidas com a utilização do programa Blast2go (www.blast2go.com), utilizado com os parâmetros descritos na tabela 4.

Tabela 4- Parâmetros utilizados do programa Blast2go.

Parâmetros Blast2go	Configuração utilizada
Blast configuration	
Blast Sever URL	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi
Blast DB	swissprot
Number of Blast Hits	5
Blast ExpectValue	1.0E-10
Blast Program	blastp
Blast Mode	QBLast- NCBI
HSP Length Cutoff	33
Annotation Configuration	
E-Value- Hit-Filter	1.0E-6
Annotation Cutoof	55
GOWeight	5
HSP-Hit-Coverage Cutoff	0
Graph drawing Configuration	
SEQ.Filter for Molecular Function	5
SEQ.Filter for for Biological Process	3
Node Information	Node score
Mode of graph-couloring	byScore
Score alpha	0.6
Node Score Filter	0

4. RESULTADOS

4.1. Indução das culturas embriogênicas

Buscando uma melhor compreensão acerca das condições necessárias para o desenvolvimento de culturas embriogênicas de mamoeiro, realizaram-se dois experimentos de indução.

No primeiro experimento, foram testados os efeitos das auxinas 2,4-D e ANA em diferentes concentrações, na indução de culturas embriogênicas dos genótipos Golden e UC01. Como resultado, observou-se que, após a primeira semana de inoculação dos embriões zigóticos, houve o início da desdiferenciação e formação de calos, que apresentaram características diferentes para os reguladores de crescimento testados. Os calos provenientes de meio suplementado com 2,4-D apresentaram coloração amarelo claro e aspecto friável enquanto os calos do tratamento com ANA apresentaram coloração branca translúcida de aspecto esponjoso e não friável (Figura 3).

Para o genótipo Golden, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) na indução dos calos entre as concentrações de reguladores de crescimento, sendo as concentrações 20 μM de 2,4-D; 10 μM e 20 μM de ANA as que apresentaram maiores taxas de indução de calos, com 80,0; 83,3; e 73,3%, respectivamente (Tabela 5). Não foram observadas diferenças significativas para as variáveis diâmetro e matéria fresca dos calos (Tabela 5).

Para o híbrido, houve diferenças significativas ($P<0,05$) para todas as variáveis analisadas. A variável taxa de indução apresentou entre 73,3% e 100% de indução para todos os tratamentos, com exceção do tratamento controle, que obteve, apenas, 13,3% de indução (Tabela 5). Para a variável diâmetro dos calos, os melhores índices foram alcançados nas concentrações de 10 μM e 20 μM de 2,4-D e 20 μM de ANA; já para a variável matéria fresca, as melhores percentagens foram alcançadas nas concentrações 10 μM e 20 μM de 2,4-D (Tabela 5).

Embora os tratamentos com a presença de ANA tenham alcançado altas taxas de indução, entre 73 e 100% para os dois genótipos testados, as culturas provenientes desse tratamento apresentavam características não embriogênicas, caracterizadas por calos compactos, coloração branco translúcido e com a formação de raízes (Figura 3).

Tabela 5. Taxa de indução, Diâmetro e Matéria fresca de calos dos genótipos Golden e híbrido submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D (2,4 diclorofenoxiacético) e ANA (ácido naftalenoacético).

Genótipo	Tratamentos	Indução (%)	Diâmetro (mm)	Matéria fresca (mg)
Golden	Controle	16,7 c	3,3 a	33,5 a
	10 μM – 2,4-D	36,7 b	3,4 a	38,6 a
	20 μM – 2,4-D	80,0 a	3,3 a	46,3 a
	10 μM – ANA	83,3 a	2,9 a	33,5 a
	20 μM – ANA	73,3 a	2,6 a	21,4 a
	Média	58,0	3,1	34,6
	C.V. (%)	16,2	17,1	35,4
UC01	Controle	13,3 b	3,0 c	39,0 c
	10 μM – 2,4-D	73,3 a	7,0 a	148,8 b
	20 μM – 2,4-D	96,7 a	7,6 a	260,2 a
	10 μM – ANA	90,0 a	3,6 c	71,9 c
	20 μM – ANA	100,0 a	5,5 b	24,8 c
	Média	74,7	5,3	108,9
	C.V. (%)	16,3	13,3	21,7

Médias seguidas pela mesma letra não diferem, significativamente, entre si de acordo com o teste de SNK ($P<0,05$) $n=3$.

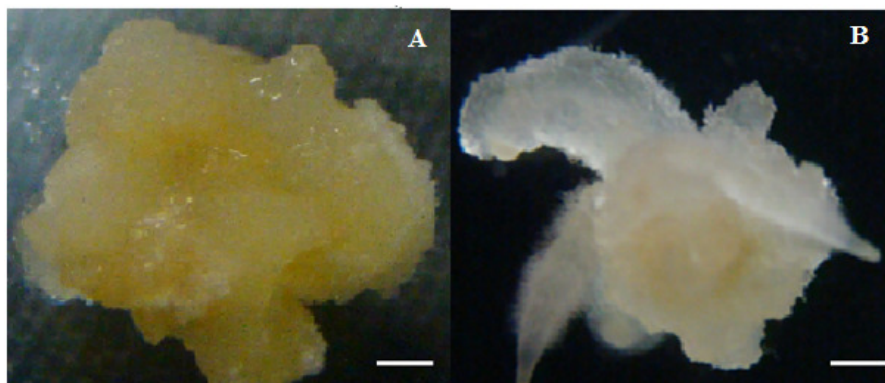


Figura 3. Aspecto morfológico de calos induzidos em mamoeiro cv. Golden. A) Calo proveniente de meio acrescido de 2,4-D. barra 9 mm, B) Calo proveniente de meio acrescido de ANA.

No segundo experimento de indução, manteve-se constante a concentração das auxinas ($20 \mu\text{M}$) no meio de cultura, e foram testados os efeitos do estágio de desenvolvimento de embriões zigóticos provenientes de frutos em diferentes estádios de maturação, na indução de calos de mamoeiro.

Nesse experimento, verificou-se que os genótipos testados responderam de forma diferenciada aos tratamentos. Quando se avaliou a relação entre a maturação dos frutos e os reguladores de crescimento na taxa de indução do genótipo Golden verificou-se que os explantes provenientes dos frutos em estágio 3 e 5 obtiveram as melhores taxas de indução para ambos os reguladores testados. Para as variáveis diâmetro e matéria fresca, os maiores índices foram alcançados em meio suplementado com ANA (Tabela 6).

Para o genótipo UC01, não houve diferenças estatisticamente significativas para a taxa de indução dos calos, entretanto essas taxas foram altas, entre 94 e 100%, sendo significativas, apenas, para diâmetro e matéria fresca dos calos, onde os frutos em estágio 3 e 5 apresentaram as maiores médias para ambos os reguladores testados (Tabela 6).

Tabela 6. Taxa de indução, diâmetro e matéria fresca de calos das linhagens Golden e UC01 sob o efeito de diferentes reguladores de crescimento e estádios de maturação do fruto de mamoeiro.

Genótipo	Tratamentos	Estádio de Maturação do Fruto			Médias
		0	3	5	
Indução (%)					
Golden	2,4-D	78,0Ba	100,0Aa	100,0Aa	92,6
	ANA	82,0Ba	92,0Aa	96,0Aa	90,0
UC01	2,4-D	94,0Aa	96,0Aa	96,0Aa	95,3
	ANA	94,0Aa	100,0Aa	100,0Aa	98,0
Diâmetro (mm)					
Golden	2,4-D	4,0Ab	5,4Ab	4,5Ab	4,6
	ANA	7,4Ba	10,5Aa	9,4Aa	9,1
UC01	2,4-D	2,8Cb	8,8Ab	8,6Ab	6,7
	ANA	2,7Cb	18,8Aa	13,0Ba	14,4
Matéria fresca (g)					
Golden	2,4-D	0,03Bb	0,1Ab	0,1Ab	0,1
	ANA	0,9Aa	0,7Aa	0,8Aa	0,8
UC01	2,4-D	0,1Bb	0,4Ab	0,3Ab	0,3
	ANA	0,2Ca	2,3Aa	1,3Ba	1,6

Médias seguidas na mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de SNK ($P < 0,05$). Golden: $CV_{\text{Indução}} = 8,4\%$; $CV_{\text{Diâmetro}} = 18,8\%$; $CV_{\text{Matéria Fresca}} = 28\%$; Híbrido: $CV_{\text{Indução}} = 6,4\%$; $CV_{\text{Diâmetro}} = 13,7\%$; $CV_{\text{Matéria Fresca}} = 39\%$; $n=5$.

4.2. Maturação

No experimento de maturação, foi testado o efeito do PEG, em diferentes concentrações, na taxa de maturação, incremento de matéria fresca, número médio de embriões somáticos e o no número de embriões somáticos por estágio de desenvolvimento.

Os resultados obtidos mostraram que todos os tratamentos promoveram a formação de embriões somáticos nos genótipos testados (Tabela 7, Figura 4). Também foi possível observar a evolução morfogenética de embriões somáticos

nos diferentes estádios de desenvolvimento, conforme apresentado para o genótipo UC01 (Figura 5).



Figura 4. Estádios de desenvolvimento do embrião somático do genótipo UC01. A) embrião globular, B) embrião cordiforme, C) embrião torpedo e D) embrião cotiledonar. Barra: 0,2 mm

Para o genótipo Golden, em geral, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as concentrações de PEG analisadas para número de embriões e incremento de matéria fresca (Tabela 7). O meio suplementado com 6% de PEG (T2) resultou na maior taxa de maturação (100%) e número de embriões somáticos (em média 120,3 por placa de petri), seguido pela concentração de 3%, que apresentou 83,3% de maturação e 84,5 embriões/placa (Tabela 7). O tratamento controle, sem PEG, resultou no maior ganho de matéria fresca dos calos (6,2g) e apresentou a menor taxa de maturação (67%)

juntamente com o tratamento T3 (75%). A menor média do número de embriões foi produzida em meio suplementado com 9% de PEG, (49,0) (Tabela 7).

Tabela 7. Taxa de maturação, matéria fresca e número de embriões de calos submetidos a diferentes concentrações de PEG.

Genótipo	Tratamentos	Maturação (%)	Matéria fresca (g)	Nº Embriões/placa
Golden	Controle	66,7b	6,2a	82,3b
	T1	83,3 ^a	4,8ab	84,5b
	T2	100,0a	4,1b	120,3 ^a
	T3	75,0b	4,0b	49,0c
	Média	81,2	4,8	84,0
	C.V. (%)	36,3	19,4	28,1
UC01	Controle	100,0a	3,3a	115,0b
	T1	100,0a	2,5ab	114,5b
	T2	100,0a	1,9b	150,0a
	T3	91,7 ^a	1,5b	133,5ab
	Média	97,9	2,3	128,2
	C.V. (%)	8,5	22,6	9,7

Médias seguidas na mesma letra não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de SNK ($P < 0,05$).

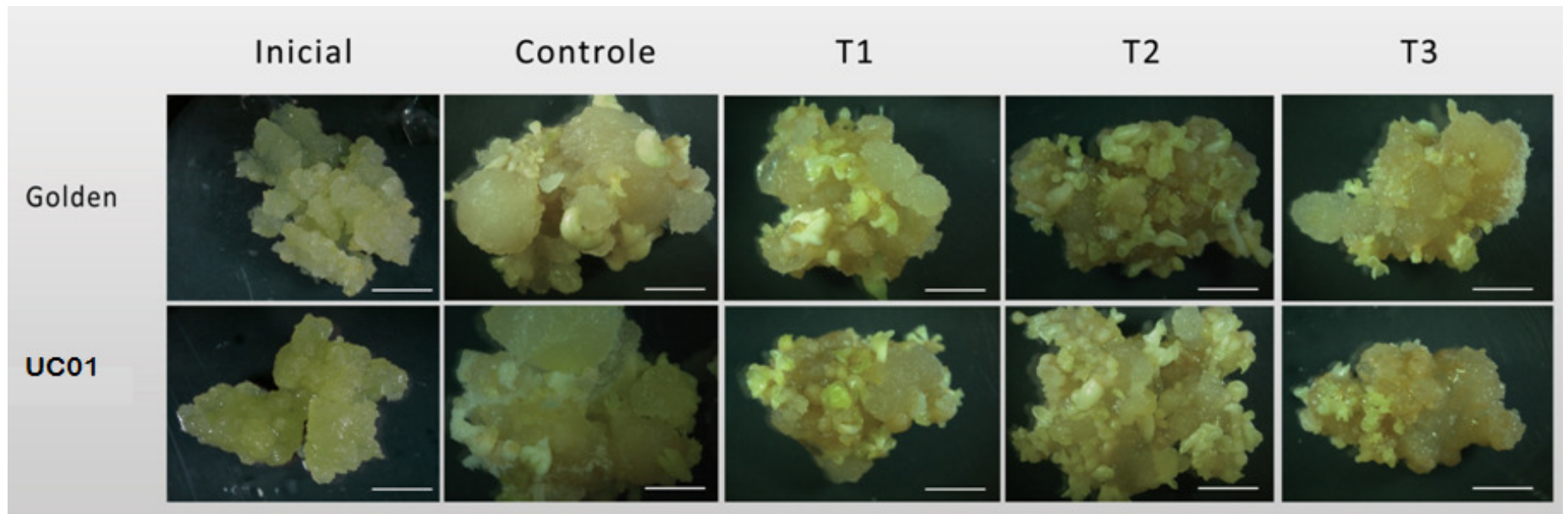


Figura 5. Culturas embriogênicas dos genótipos Golden e UC01 submetidas a diferentes tratamentos de maturação no período inicial e após 28 dias de cultivo. Barras: 0,5mm.

Como citado anteriormente, os resultados indicam que o PEG não foi determinante para a maturação dos calos de mamoeiro nos dois genótipos testados, uma vez que, para ambos, foi observada a formação de embriões somáticos no tratamento controle. Entretanto, afetou, significativamente, o número de embriões formados, sendo que o tratamento 6% de PEG atingiu as maiores médias, 150 e 120,3 embriões por placa, respectivamente.

Adicionalmente, a progressão dos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos das culturas foi avaliada durante o experimento de maturação para os dois genótipos testados. Por meio dessa análise, foi possível observar embriões somáticos nos estádios de desenvolvimento globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar e, também, de embriões anormais. Na quantificação do número de embriões somáticos nos diferentes estádios de desenvolvimento, foi observado que o número de embriões somáticos, no estágio globular, foi superior em todos os tratamentos para os dois genótipos (Figuras 6 e 7).

Para o genótipo Golden, os tratamentos T1 e T2 promoveram as maiores taxas de diferenciação em embriões globulares; no tratamento T1, houve um aumento no número de embriões globulares até o 21^o dia com uma drástica queda aos 28 dias (Figura 6A); no tratamento T2, o número de embriões globulares permaneceu alto até o 28^o dia, quando alcançou a maior média de 52,4 embriões por colônia.

O tratamento controle e T3 apresentaram menor número de embriões globulares em todos os tempos avaliados. Embriões, no estágio cordiforme, foram identificados em baixas frequências quando comparados aos embriões globulares, maior número foi identificado nos tratamentos T1 e T3 entre os 21 e 28 dias (Figura 6B).

Foi identificado maior número de embriões no estágio torpedo por calo nos tratamentos T1 e T2, que obtiveram maior incremento aos 14 dias, em média, 16,2 e 17,0 embriões por colônia (Figura 6C). O maior número de embriões no estágio cotiledonar foi alcançado em T1 aos 21 e 28 dias, 27,6 e 23,8, respectivamente, e, em T2 aos 28 dias, em média 27 embriões por colônia (Figura 6D).

Para o genótipo UC01, foi observado um maior número de embriões no estágio globular entre 7 e 14 dias, 63,4 e 62,4, respectivamente, no tratamento T2, e, aos 7 dias, para o tratamento T1, 52,6 embriões por colônia (Figura 7A).

Embrões no estágio cordiforme, também, foram encontrados em baixo número nessas culturas, não alcançando, em média, mais que 12 por calo, e, em todos os tratamentos, não houve um padrão de desenvolvimento regular para embriões nesse estágio (Figura 7B). Para o desenvolvimento de embriões no estágio torpedo, o tratamento T1 apresentou maior número de embriões por calo em todos os tempos, havendo, aos 28 dias, uma queda, equiparando-o ao tratamento controle (Figura 7C). Maior conversão em embriões cotiledonares foi observada no tratamento T2, que teve um aumento crescente até o 28º dia, onde atingiu maior número, 35,4 embriões por colônia (Figura 7D). Para os demais tratamentos, nesse mesmo período, não houve número superior a 21 embriões cotiledonares por colônia.

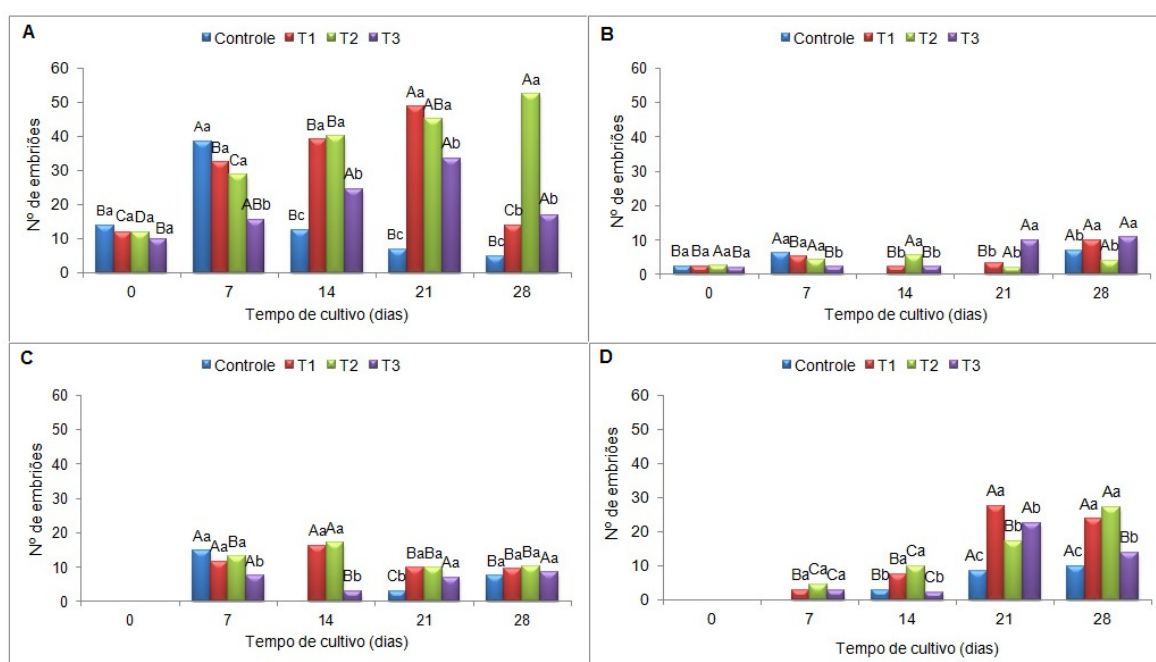


Figura 6. Número de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento por calo de mamoeiro genótipo Golden quando submetidos a diferentes tratamentos de maturação. A: estágio globular, B: cordiforme, C: torpedo e D: cotiledonar. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, efeito dos tratamentos e minúscula, efeito do tempo, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de SNK ($P < 0,05$).

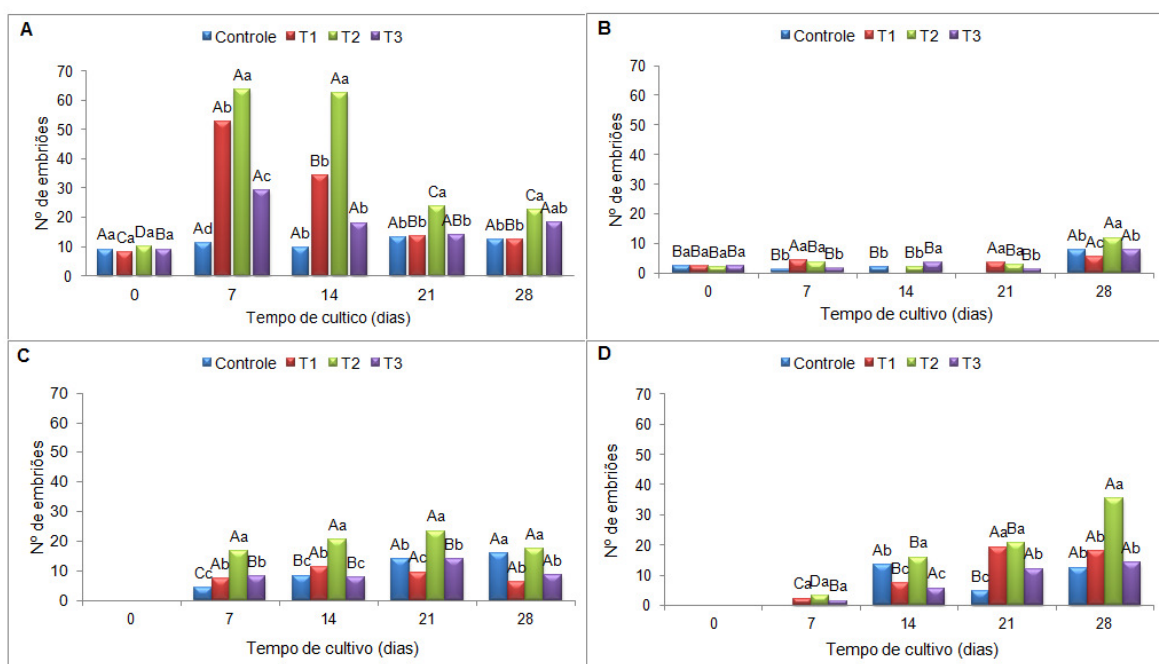


Figura 7. Número de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento por calo de mamoeiro genótipo UC01 quando submetidos a diferentes tratamentos de maturação. A: Estádio globular, B: cordiforme, C: torpedo e D: cotiledonar. Médias na mesma letra maiúscula, efeito dos tratamentos e minúscula, efeito do tempo, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de SNK ($P < 0,05$).

Em aspecto geral, para o genótipo Golden, o tratamento T2 obteve maior desenvolvimento de embriões no estágio globular, entretanto os tratamentos T1 e T2 desenvolveram, em média, um número praticamente igual de embriões por colônia no estágio cotiledonar (15,5 e 14,6), respectivamente. Embora o tratamento T2 tenha favorecido o desenvolvimento de embriões no estágio globular, ao final dos 28 dias, houve uma menor progressão desses em embriões cotiledonares quando comparado ao encontrado para o Híbrido (Figura 8).

Para o Híbrido, os embriões no estágio globular apresentaram maior taxa de conversão em embriões cotiledonares, quando submetidos ao tratamento T2, mostrando a eficiência do mesmo na conversão dos embriões globulares em cotiledonares (Figura 8B). Em geral, a formação de embriões somáticos anormais foi observada em todos os tratamentos, sendo identificado, aos 28 dias de cultivo, maior número de embriões anormais no tratamento controle para os dois genótipos (Figura 9A e B). Anormalidades morfológicas observadas nos embriões

somáticos foram monocotilédones, multi-cotilédones, cotilédones fundidos (Figura 10).

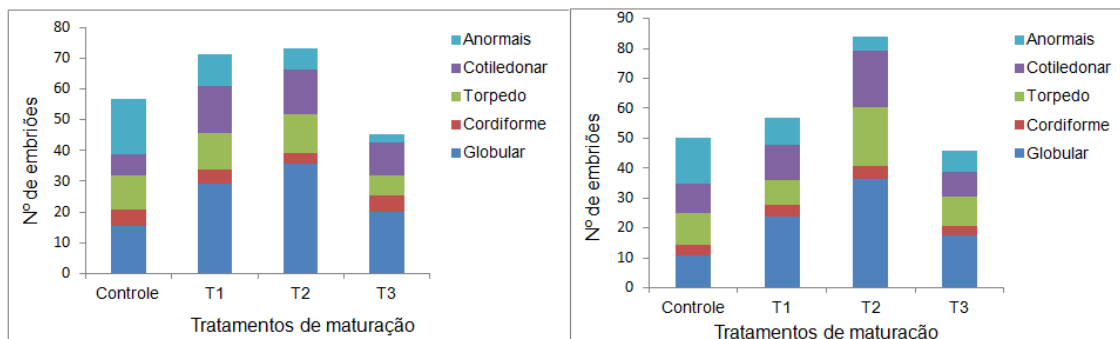


Figura 8. Número médio de embriões somáticos por tratamento de maturação de acordo com estágio de desenvolvimento embrionário, aos 28 dias de cultivo. A) Genótipo Golden, B) Genótipo UC01.

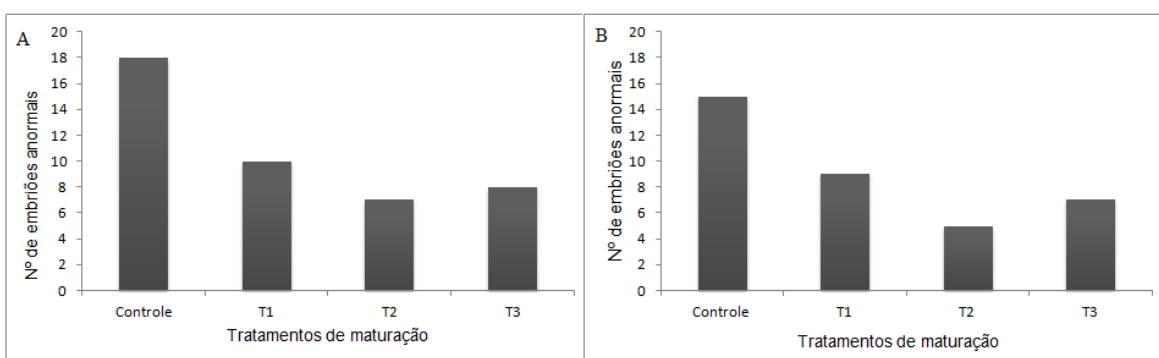


Figura 9. Número de embriões somáticos anormais de acordo com o tratamento. A) Genótipo Golden, B) Genótipo UC01.

Após a fase de maturação, os embriões somáticos foram transferidos para meio de germinação a fim de verificar a viabilidade de regeneração de plântulas. Foi possível o desenvolvimento de plântulas normais ao final de 30 dias de cultivo para os dois genótipos testados (Figura 11).

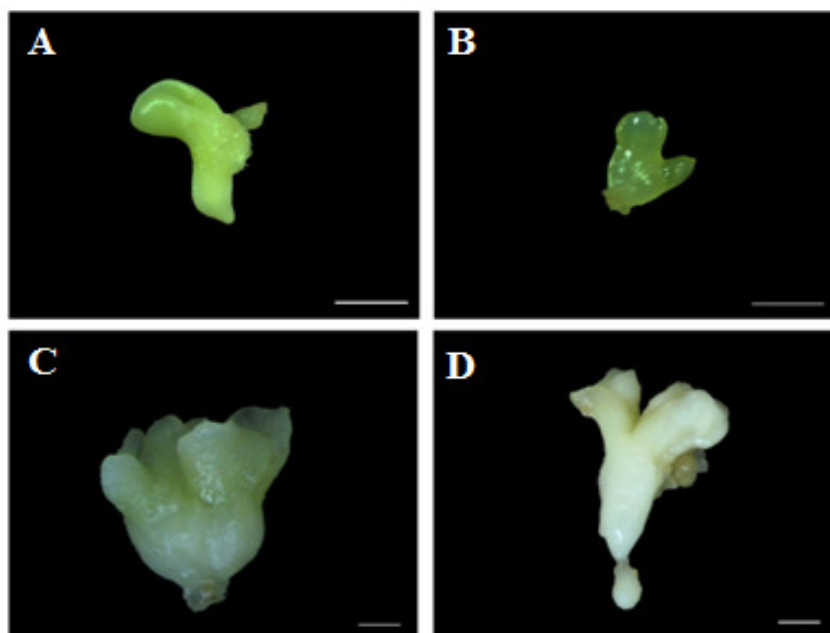


Figura 10. Embriões somáticos apresentando anomalia. A: Embrião monocotiledonar, B: Embrião fundido, C: Embrião multicotiledonar, D: Embrião vitrificado. Barra: 0,2mm.

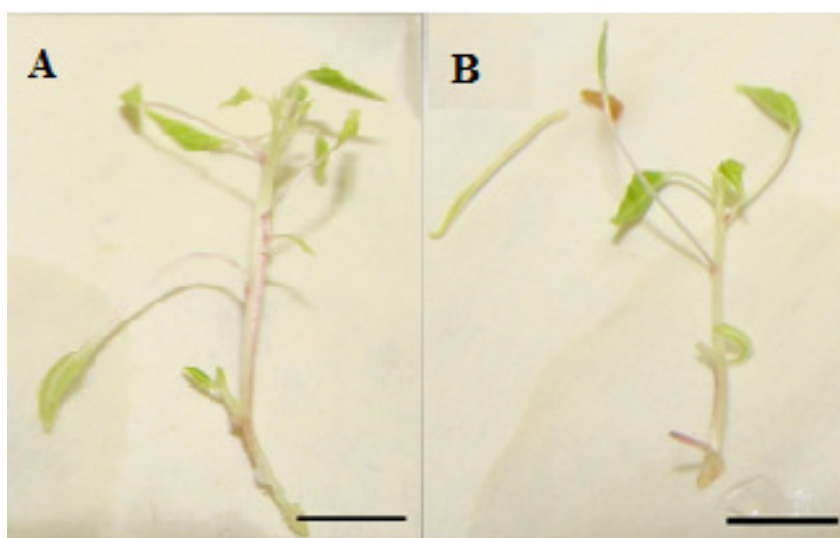


Figura 11. Regeneração dos embriões somáticos de mamoeiro. A) Golden. B) UC01. Barra: 15 mm.

4.3. Análises histomorfológicas durante a morfogênese in vitro

Com o objetivo de observar o efeito do PEG na evolução morfológica e histodiferenciação dos embriões somáticos, foi realizado o estudo histomorfológico para os tratamentos Controle, sem PEG, e T2, com 6% de PEG,

que resultou no melhor desempenho para o desenvolvimento dos embriões somáticos, para os dois genótipos testados.

Em geral, para os genótipos estudados, verificou-se que as culturas continham, ao mesmo tempo, células embriogênicas e não embriogênicas. As primeiras são caracterizadas por regiões meristemáticas com células pequenas e isodiamétricas, citoplasma denso e núcleo evidente, enquanto as não embriogênicas são mais alongadas e dispersas, com grandes vacúolos. Células com características não embriogênicas eram mais evidentes em colônias provenientes do tratamento controle (Figura 12).

Várias células apresentaram dois núcleos num mesmo citoplasma, evidenciando a citocinese ainda não concluída no processo de divisão celular. Em algumas regiões, constatou-se o início da polarização das células, o que sugere a organização celular envolvida no processo de formação de embriões (Figuras 12). Segundo Canhoto (2005), formato isodiamétrico é característico de células meristemáticas, o que caracteriza calos embriogênicos.

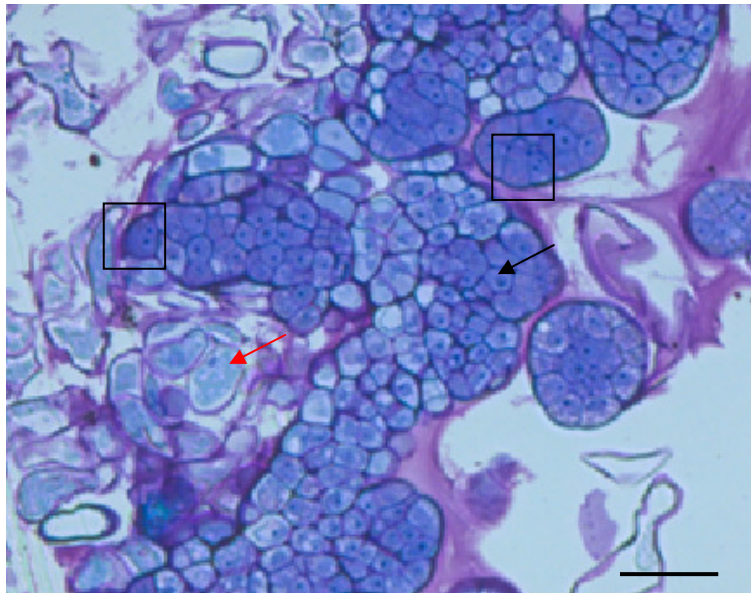


Figura 12. Aspectos histomorfológicos das culturas do genótipo UC01. Quadrado indica dois núcleos no mesmo citoplasma; seta vermelha indica célula com grande vacúolo; seta preta indica célula isodiamétrica. Barra: 25 μ m.

Através das análises histológicas, pôde-se observar diferenças entre as estruturas das culturas quando submetidas ao tratamento controle, sem a adição de PEG e o tratamento T2, com adição de 6% de PEG. Essas culturas, de ambos

os genótipos, mesmo antes de serem submetidas aos tratamentos, já apresentavam estrutura organizada (Figura 13 e 14).

No tratamento controle, as culturas apresentavam porções de células com características não embriogênicas, principalmente as provenientes do genótipo Golden (Figura 13B e C), que demonstram menor velocidade na organização e conversão das células em embriões somáticos. Ambos os genótipos apresentaram diferenciação das células em embriões somáticos submetidos ao tratamento controle, sendo, principalmente, nesse tratamento que houve a maior ocorrência de formação de embriões anormais (Figura 16), demonstrando a importância do estresse hídrico gerado pela adição do PEG no desenvolvimento de embriões normais.

Pode ser mostrada, também, a diferença entre as estruturas observadas nos calos, no tempo inicial e, depois, mantidos no tratamento que induziu maior maturação (T2) para os dois genótipos, verificando-se uma evolução morfogenética a partir da indução da maturação. Nessas condições, no genótipo UC01, verificou-se uma organização mais rápida dos calos, que, já aos sete dias, demonstravam embriões em vários estádios com células justapostas, lembrando células da protoderme, envolvendo os embriões (Figura 14B). No genótipo Golden, novamente, observou-se um desenvolvimento mais lento dos embriões somáticos, juntamente com uma maior quantidade de células com características não embriogênicas, que demonstravam tentar organizar-se (Figura 13 A, B, seta).

Durante esse período, os embriões somáticos de mamoeiro nos dois genótipos desenvolveram-se, dando origem a vários embriões em diferentes estádios de maturação: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Figura 15). Esses embriões eram facilmente destacáveis do calo, característica importante para um procedimento automatizado efetivo na encapsulação dos embriões somáticos (Garrett, 1993).

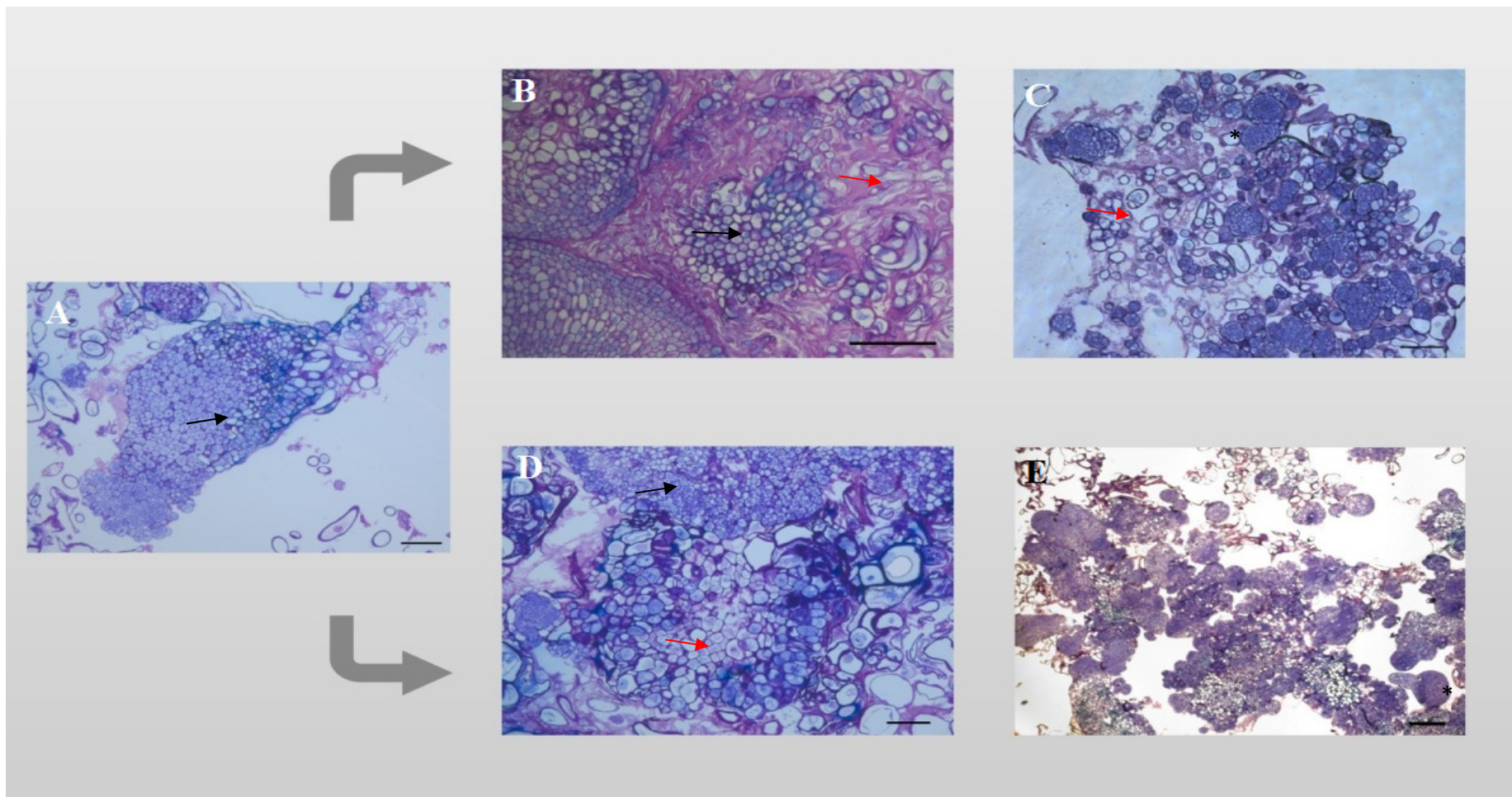


Figura 13. Aspectos histomorfológicos das culturas do genótipo Golden. A) cultura inicial (início do cultivo). B) cultura submetida ao tratamento controle aos 7 dias. C) cultura submetida ao tratamento controle aos 28 dias. D) tratamento T2 aos 7 dias. E) tratamento T2 aos 28 dias. Asteriscos indicam desenvolvimento de embriões. Setas vermelhas indicam regiões de tecidos desorganizados. Setas pretas indicam organização celular. Barra: 25 μ m.

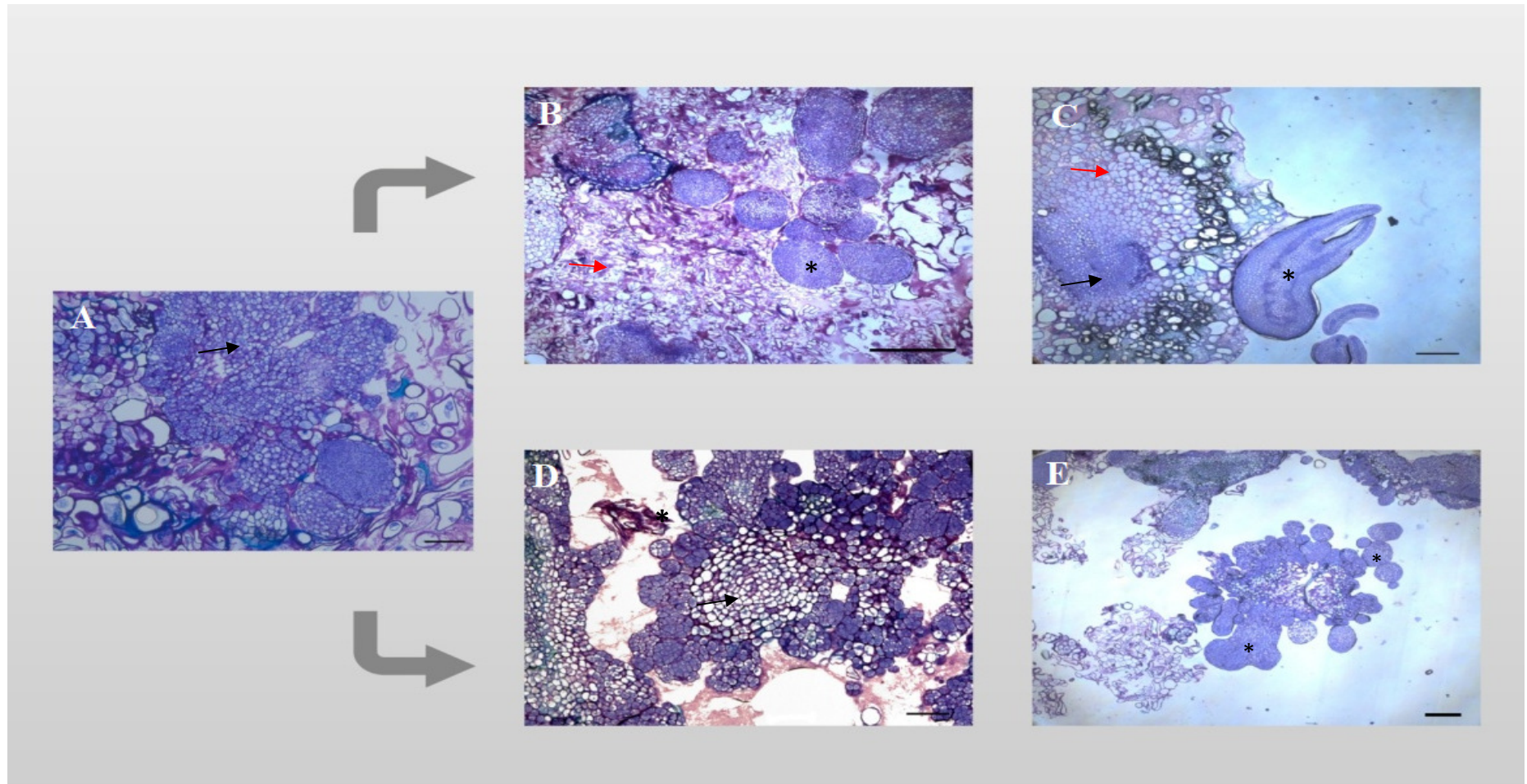


Figura 14. Aspectos histomorfológicos das culturas do genótipo Híbrido. A) cultura inicial (início do cultivo). B) cultura submetida ao tratamento controle aos 7 dias. C) cultura submetida ao tratamento controle aos 28 dias. D) tratamento T2 aos 7 dias. E) tratamento T2 aos 28 dias. Asteriscos indicam desenvolvimento de embriões. Setas vermelhas indicam regiões de tecidos desorganizados. Setas pretas indicam organização celular. Barra: 25 µm.

No início da diferenciação dos embriões somáticos do genótipo UC01, foi observada a formação de um pequeno grupo de células isoladas das demais, constituindo o pró-embrião (Figura 15A), que apresentava 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. O Embrião globular foi caracterizado por intensa divisão e a formação das células justapostas ao redor do embrião formando o procâmbio, grande suspensor e um grande aglomerado de células meristemáticas na porção axial (Figura 15B). Os embriões no estágio cordiforme apresentavam, também, intenso número de células meristemáticas no ápice do embrião, já caracterizando o início do desenvolvimento dos cotilédones (Figura 15C). Os embriões em estágio torpedo foram caracterizados pelo desenvolvimento completo dos cotilédones, durante estágio torpedo tardio e, também, no cotiledonar, vários tecidos meristemáticos foram desenvolvidos: protoderme, procâmbio, meristema fundamental, meristema apical do caule (Figura 15 D e E). Esse padrão de evolução morfogênética, também, foi observado no genótipo Golden.

Observou-se, também, a formação de embriões anormais nas culturas provenientes da cv. Golden e UC01. Diversas anormalidades morfológicas foram detectadas, a presença de embriões fundidos, fusão de cotilédones, embriões mono ou poli-cotilédonares e embriões com hiperhidricidade (Figura 16).

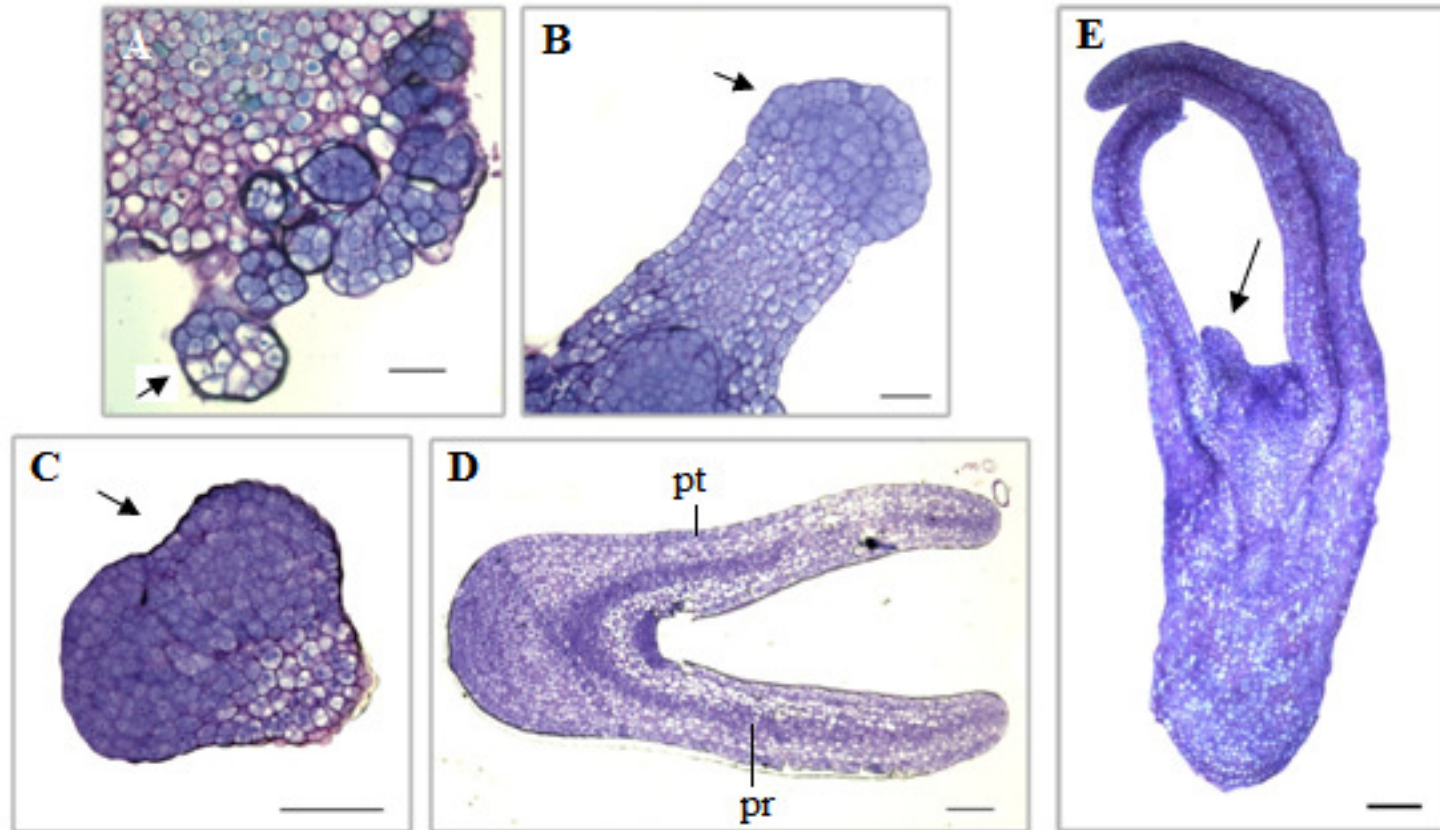


Figura 15. Evolução histomorfológica de ES de mamoeiro UC01. **A)** Corte transversal evidenciando um pro-embrião. **B)** Corte transversal mostrando um embrião globular e um suspensor. **C)** Corte transversal de um embrião cordiforme. **D)** Corte longitudinal de um embrião torpedo em fase tardio: pt = protoderme, PR= procâmbio. **E)** Corte longitudinal de um embrião cotiledonar: seta indica desenvolvimento do meristema apical do caule. Barras = 20 μ m.

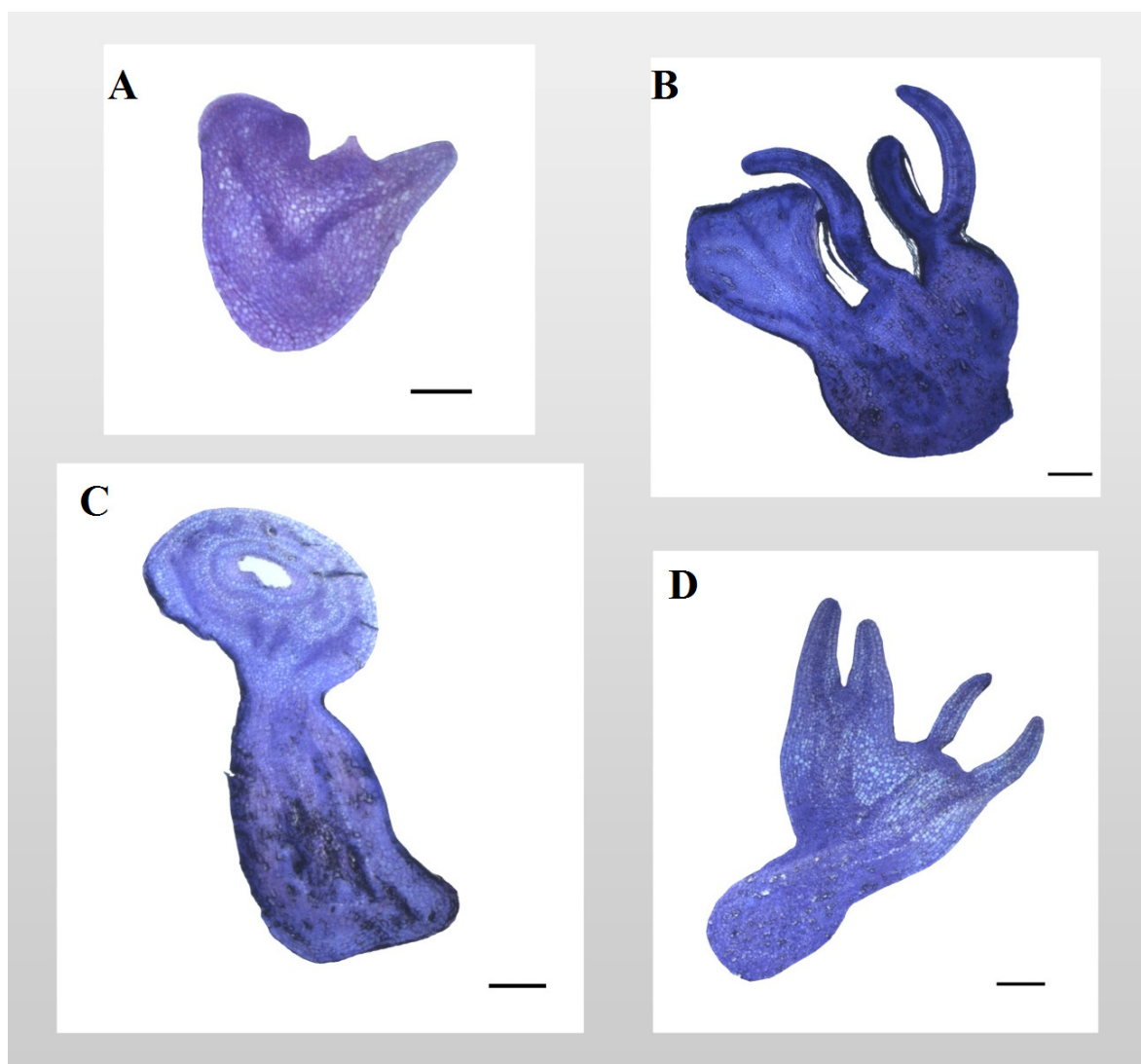


Figura 16. Histomorfologia de embriões morfologicamente anormais. Genótipo Golden: A) Embrião multicotiledonar; B) Embrião fusionado com cotilédone anormal; UC01: C) Embrião monocotiledonar; D) Embriões fusionados. Barras = 20 µm.

4.4. Concentração dos carboidratos durante a maturação

A análise do metabolismo dos carboidratos livres foi realizada em intervalos de 7 dias até o período total de 28 dias de cultivo, acompanhando, assim, toda a morfogênese dos calos nos quatro tratamentos de maturação para os dois genótipos.

Para o genótipo Golden, os níveis de frutose e glicose mantiveram-se semelhantes durante todo o cultivo. Para essas culturas, o tratamento controle

ocasionou maiores níveis desses açúcares aos 7 dias de cultivo, quando alcançaram $41,5 \text{ mg.g}^{-1}$ de frutose e $38,0 \text{ mg.g}^{-1}$ de glicose; nesse mesmo tratamento, a sacarose foi encontrada em menor quantidade quando comparada as hexoses, entretanto, também, teve um aumento aos 7 dias (16 mg.g^{-1}) (Figura 17 A-C).

A adição de 3% de PEG (tratamento T1) ao meio de cultura ocasionou um decréscimo nos níveis de sacarose, glicose e frutose em relação ao tratamento controle. Nesse tratamento, frutose e glicose, também, obtiveram um perfil semelhante de variação, e a sacarose esteve presente em baixas concentrações, durante todos os dias de análise, não ultrapassando $8,4 \text{ mg.g}^{-1}$.

Nas culturas do tratamento T2, os níveis de frutose e glicose foram semelhantes aos valores encontrados no tratamento T1. Esses açúcares apresentaram perfil semelhante nesse tratamento; entretanto, a glicose teve um incremento, estatisticamente, significativo, entre 7 e 14 dias ($23,6$ e $20,6 \text{ mg.g}^{-1}$), respectivamente, enquanto a frutose obteve um incremento, apenas, no tempo 7 ($26,7 \text{ mg.g}^{-1}$); ainda nesse tratamento, a sacarose apresentou um acréscimo aos 7 dias de cultivo ($14,4 \text{ mg.g}^{-1}$), permanecendo em concentrações mais baixas, durante os demais dias (Figura 17 A-C).

Para o tratamento T3, meio de cultura MS suplementado com 9% de PEG, em culturas desse genótipo, os níveis de frutose e glicose tiveram um aumento até o 14º dia, com posterior redução aos 21 dias de cultivo, com um novo acréscimo aos 28 dias, quando alcançaram as maiores concentrações. A sacarose apresentou um perfil de acréscimo até o 7º dia com posterior declínio até o 21º e, novamente, aumento no 28º dia (Figura 17 C). O perfil encontrado nesse tratamento difere do encontrado para os demais tratamentos e pode estar relacionado com a baixa competência dessas culturas quando submetidas a esse tratamento (Figura 17 A-C).

Em resumo, para os níveis de sacarose, a adição do PEG até a concentração de 6%, não demonstrou grandes modificações no perfil de variação desse carboidrato; no entanto, nas culturas tratadas sem adição de PEG (Tratamento Controle), houve um incremento considerável de glicose e frutose aos sete dias de cultivo, quando comparado aos demais dias de cultivo.

Na análise do perfil de carboidratos das culturas da geração UC01, os perfis de glicose e sacarose foram semelhantes durante todos os dias de

avaliação, em todos os tratamentos (Figura 18 A-C). Nessas culturas, diferente do que ocorreu no genótipo Golden, não houve aumentos consideráveis nas concentrações das hexoses, ao longo dos dias de cultivo, nos tratamentos Controle, T1 e T2, que foram mais baixas, apenas, no tempo zero ($19,3 \text{ mg.g}^{-1}$). Nesses tratamentos, as concentrações mantiveram-se semelhantes entre 7 e 28 dias de cultivo (Figura 18 A,B). Ao contrário, o tratamento T3 apresentou um perfil diferente, com crescimento ao longo dos dias até o 14 dia, quando alcançou maior concentração ($50,4 \text{ mg.g}^{-1}$); a partir daí, ele caiu no 21º dia, mas se mantém até o 28º dia.

O perfil de sacarose dessas culturas, da mesma forma que no genótipo Golden, teve um incremento aos 7 dias de cultivo, mas, nesse caso, apenas no tratamento T2, que alcançou $21,7 \text{ mg.g}^{-1}$ (Figuras 18 C).

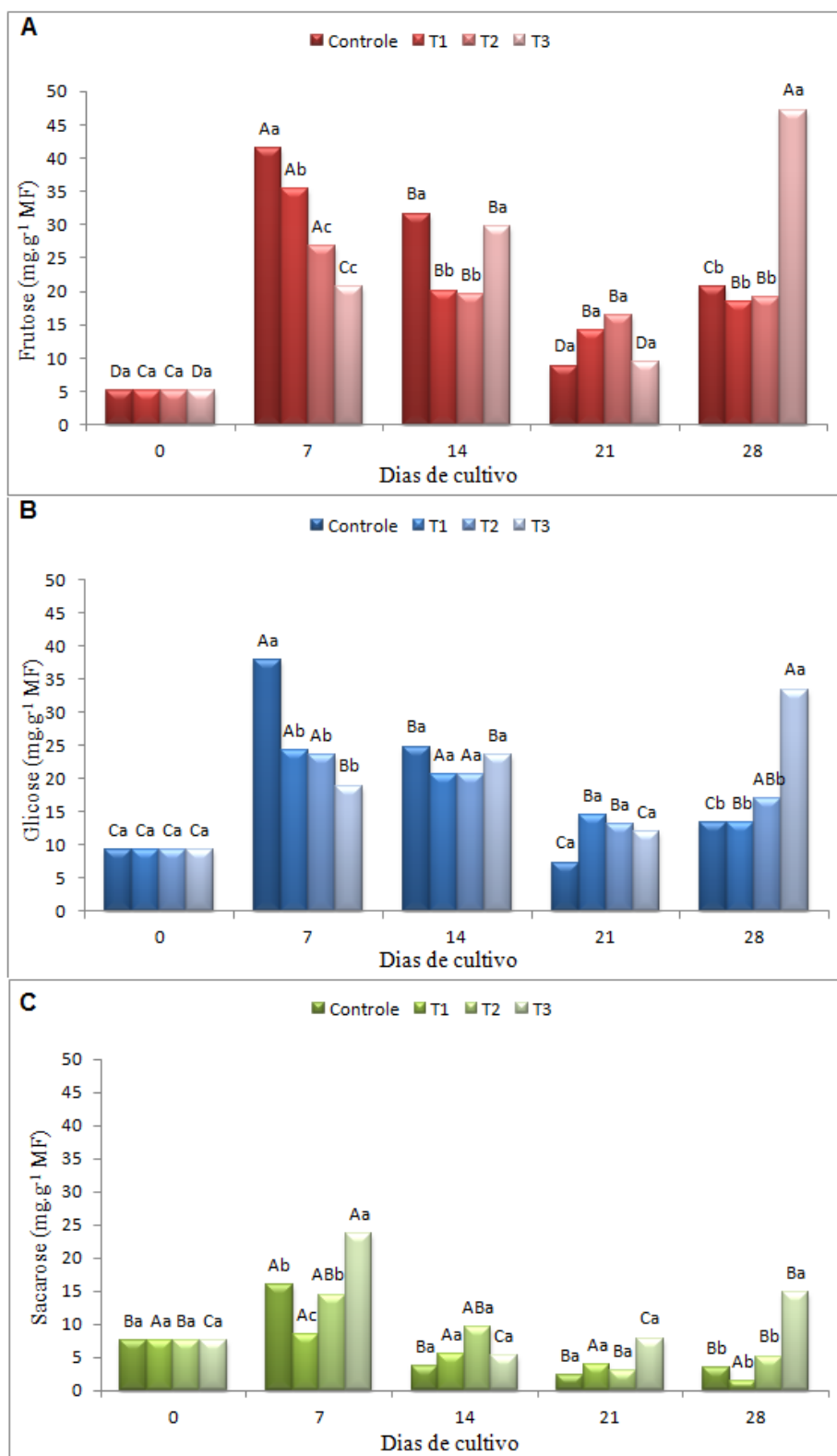


Figura 17. Concentração de frutose, glicose e sacarose nas culturas do genótipo Golden. A) frutose, B) glicose, C) sacarose. As médias acompanhadas das mesmas letras não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras minúsculas denotam diferenças entre as culturas; letras maiúsculas denotam diferenças entre os dias de cultivo na mesma cultura. Sacarose: CV = 39,3%, Glicose: CV = 21,1%, Frutose: CV = 18,4%, $n=3$.

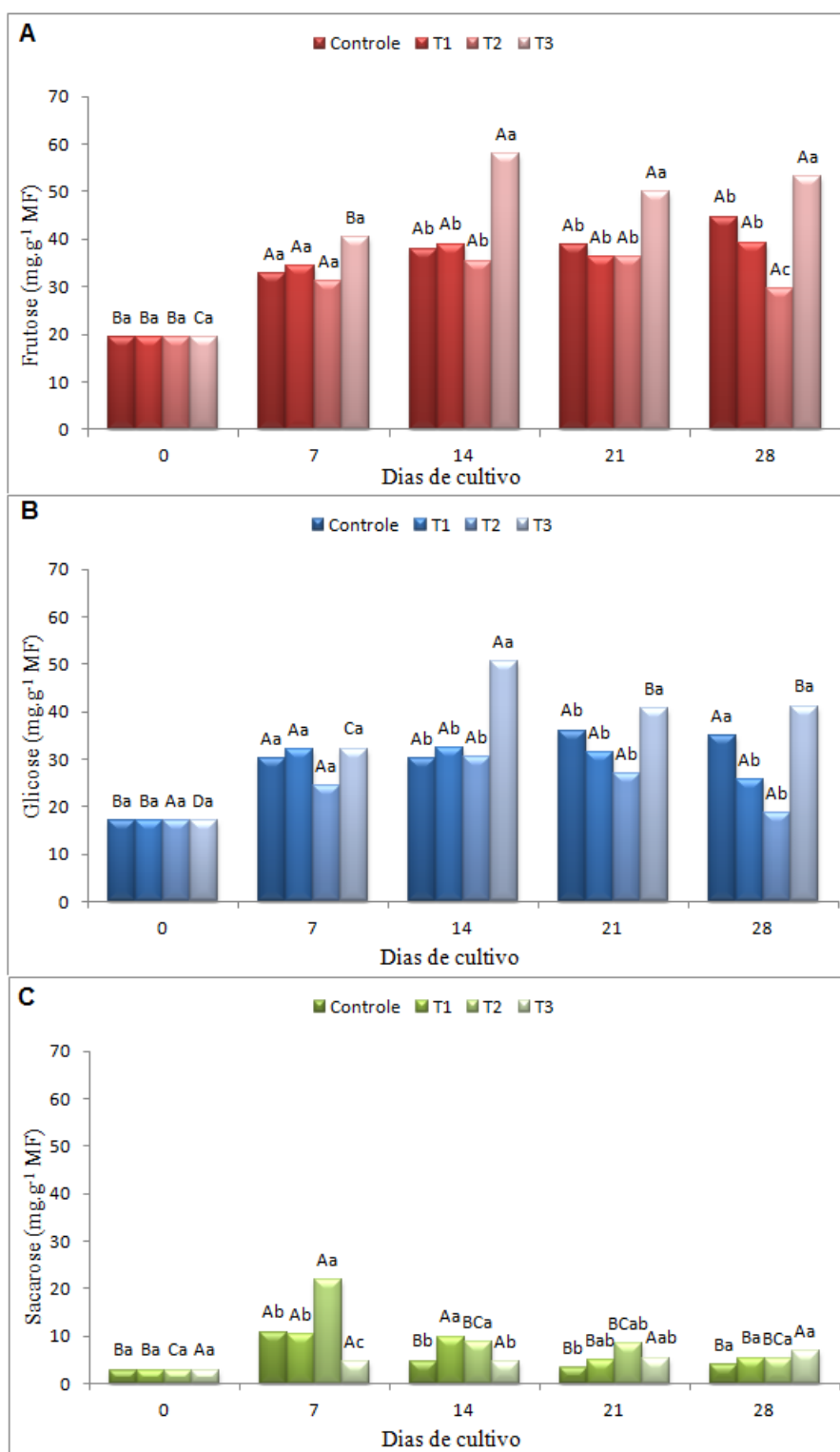


Figura 18. Concentração de frutose, glicose e sacarose nas culturas do genótipo UC01. A) frutose, B) glicose, C) sacarose. As médias acompanhadas das mesmas letras não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste SNK ($P < 0,05$). Letras minúsculas denotam diferenças entre as culturas; letras maiúsculas denotam diferenças entre os dias de cultivo na mesma cultura. Sacarose: CV = 34,5%, Glicose: CV = 14,4%, Frutose: CV = 11,1%, n=3.

4.5. Análise proteômica durante a maturação

Para a análise do perfil protéico de culturas embriogênicas de mamoeiro, utilizaram-se os tratamentos (controle, sem a adição de PEG e T2, com 6% de PEG) aplicados ao genótipo UC01. Com relação aos perfis 2-DE, foram observadas diferenças significativas nos calos submetidos aos dois tratamentos de maturação (Figura 19). Essas diferenças sugerem que o estresse hídrico gerado pela adição do PEG favoreceu a expressão de proteínas relacionadas com a maturação de calos de *Carica papaya*. Esses dados são importantes, já que, embora a ocorrência de embriões somáticos ocorra de forma precoce, também há a ocorrência de anomalias, o que diminui a eficiência da regeneração, evidenciando a importância de um protocolo de maturação eficiente.

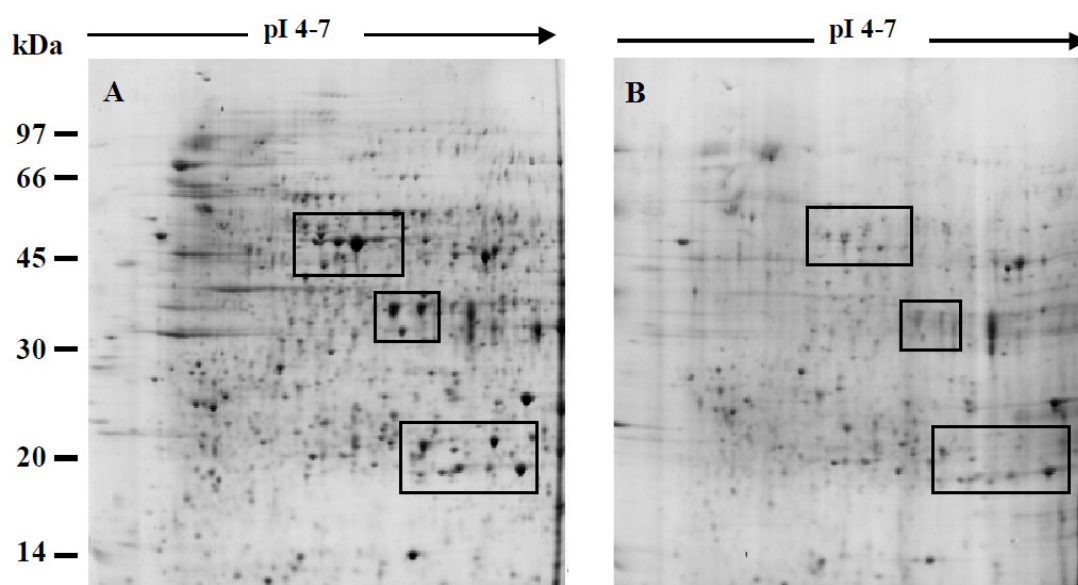


Figura 19. Perfis proteicos (2-DE) das culturas. A) Tratamento T2, com 6% de PEG; B) Tratamento Controle, sem a adição de PEG. Os retângulos destacam as regiões com maior variação na expressão.

A análise dos géis 2-DE permitiu a caracterização da dinâmica das proteínas envolvidas na maturação dos calos de mamoeiro, evidenciando as proteínas expressas nos dois tratamentos, Controle (31 polipeptídios) e T2 (70 polipeptídios), bem como as proteínas comuns aos dois tratamentos (79 polipeptídios), totalizando 180 polipeptídeos. Esses resultados confirmam a

importância do PEG na maturação, visto o maior incremento de proteínas nas culturas submetidas a esse tratamento. (Figura 20).

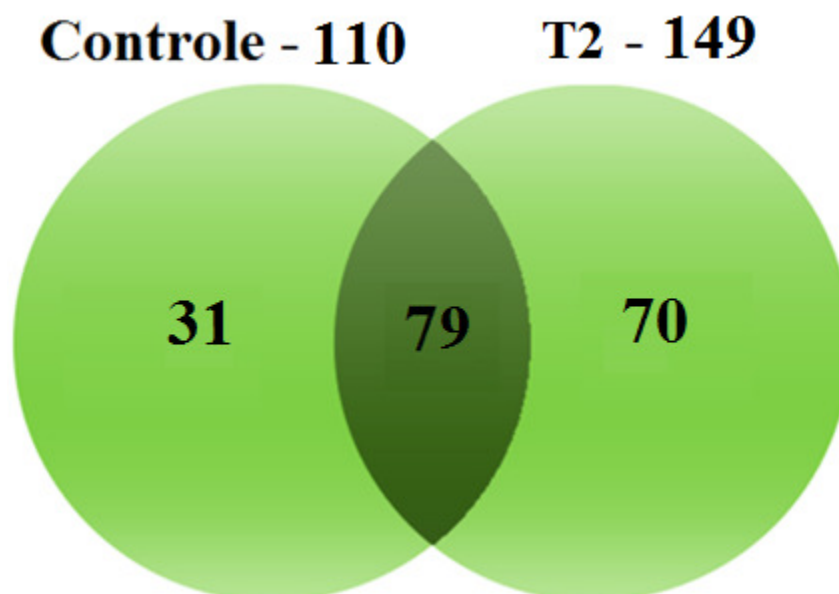


Figura 20. Diagrama de Venn. Número de proteínas específicas e comuns observadas nos tratamentos controle, sem a adição de PEG e T2, com 6% de PEG.

A partir dos géis oriundos dos tratamentos de maturação, Controle e T2, ao final de 42 dias de cultivo, as sequências dos peptídeos resultantes da tripsinização e processamento dos *spots* foram definidas via espectometria de massas e identificadas, de acordo com seu grau de similaridade com sequências de banco de dados. Após as identificadas, elas foram, então, agrupadas de acordo com o tratamento no qual foram expressas, resultando em três conjunto de dados, o primeiro é referente às proteínas expressas, exclusivamente, no tratamento Controle (Tabela 8), o segundo representa as proteínas expressas, apenas, no tratamento T2 (Tabela 9) e o terceiro as proteínas comuns aos dois tratamentos (tabela 10).

A análise das proteínas identificadas quanto à sua função biológica (BLAST2GO) resultou na classificação em 15 categorias para o tratamento Controle e 11 para o T2, com a adição de 6% de PEG (Figura 21).

Das proteínas encontradas, em, apenas, um dos tratamentos, 31 foram identificados, apenas, para o tratamento controle e 70 para o tratamento T2, sob

estresse hídrico. As duas maiores classes de proteínas encontradas, tanto para o tratamento controle e com estresse hídrico, estão relacionadas aos processos metabólicos (18%) e aos processos celulares primários (19%), para o tratamento controle e quando submetidos a estresse hídrico, havendo um grande aumento para as proteínas relacionadas a esses mesmos processos 26 e 28%, respectivamente. O nível de expressão das proteínas relacionadas a respostas a estímulos, também, foi contrastante entre os tratamentos, tendo o tratamento T2 proporcionado maior expressão dessas proteínas, 11%, enquanto no tratamento controle, apenas, 8% foram identificadas, proteínas relacionadas à proliferação celular, adesão biológica, processos multi-organismo e morte celular só foram encontradas no tratamento controle.

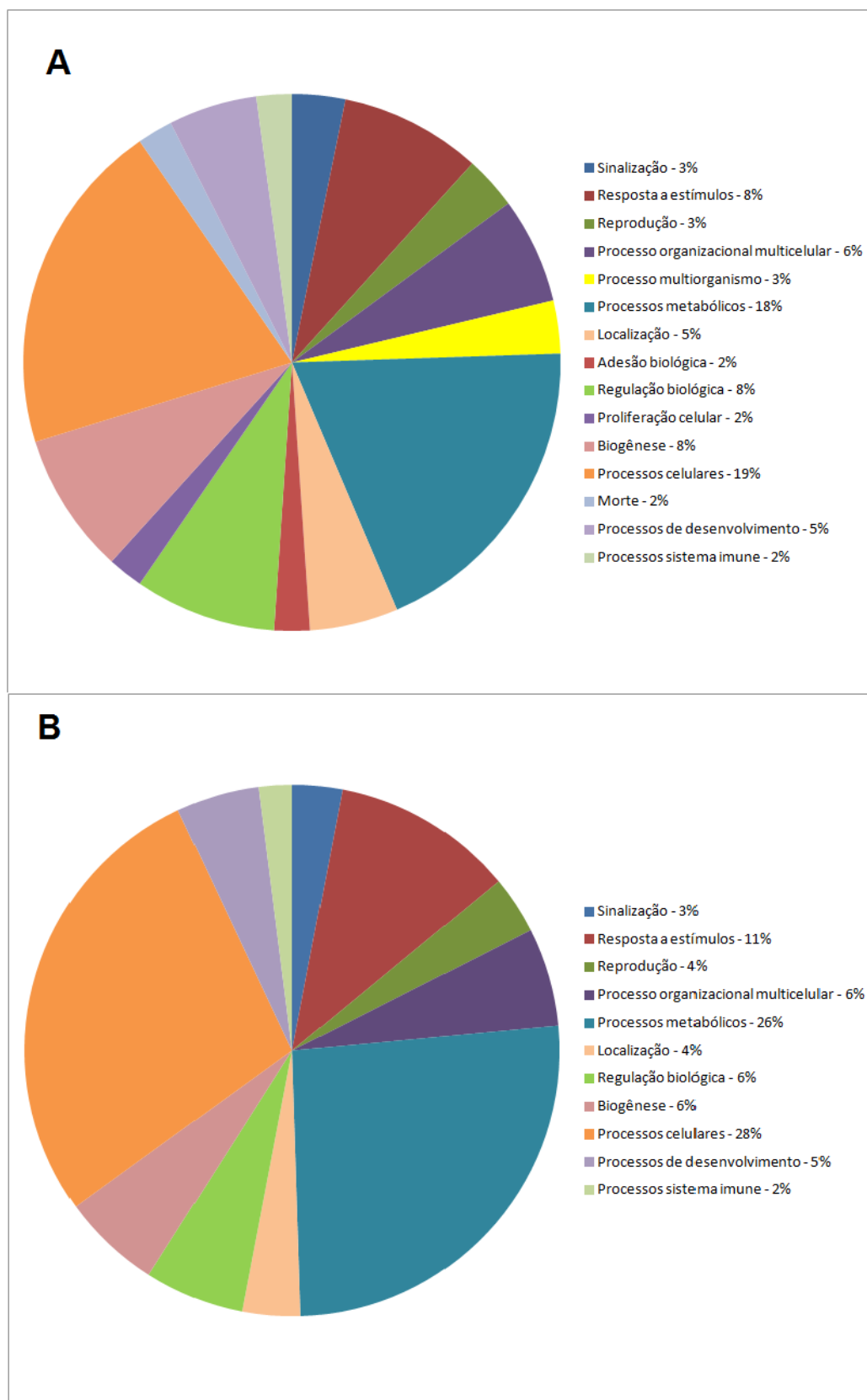


Figura 21. Classificação funcional das proteínas identificadas durante a maturação de embriões somáticos de *C. papaya*. A: Tratamento Controle, sem estresse hídrico e B: Tratamento T2, sob estresse hídrico.

Devido à classificação abrangente gerada pelo Blast2go, que forneceu uma visão muito geral da função das proteínas, visto que se procura uma correlação das mesmas com o processo de desenvolvimento da planta, buscou-se, além dos bancos de dados, a literatura especializada que tratasse do desenvolvimento vegetal, para fornecer uma classificação mais específica, demonstrada nas tabelas 6, 7 e 8 e que permitisse uma discussão mais aprofundada da importância dessas proteínas no desenvolvimento de embriões somáticos de *C. papaya* e como elas modularam o desenvolvimento desses embriões nos dois tratamentos estudados.

Dentre as 180 proteínas analisadas, foi possível identificar proteínas com papéis relevantes na morfogênese vegetal, que serão discutidas de acordo com a sua função biológica. Foram identificadas 27 proteínas com funções relacionadas ao metabolismo energético; dentre essas, 13 foram comuns aos dois tratamentos, 10 exclusivas ao tratamento T2 e, apenas, quatro exclusivas do tratamento Controle; 36 proteínas relacionadas ao processamento de DNA/RNA, sendo, dessas, 20 proteínas comuns aos dois tratamentos; oito exclusivas do tratamento T2 e controle; 13 proteínas com funções relacionadas a respostas a estresses e a doenças, dessas, cinco estavam presentes nos dois tratamentos, seis no tratamento T2 e, apenas, duas no tratamento controle; 10 proteínas com função relacionada ao metabolismo de proteínas, duas estavam presentes nos dois tratamentos, quatro ao tratamento T2 e quatro no tratamento Controle, oito proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídios, dessas, quatro foram comuns aos dois tratamentos e oito foram expressas, apenas, no tratamento T2, não foram identificadas proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídios exclusivas do tratamento controle; três proteínas exclusivas ao tratamento T2 e quatro comuns aos dois tratamentos. Foram identificadas, apenas, duas proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, ambas comuns aos dois tratamentos, proteínas relacionadas à proliferação celular foram identificadas nos dois tratamentos, enquanto proteínas relacionadas ao desenvolvimento do citoesqueleto, biogênese da parede celular e a via pentose-fosfato foram identificadas, apenas, no tratamento T2.

Dos 180 *spots* analisados, 39 não apresentaram funções conhecidas.

Tabela 8. Lista de proteínas identificadas na maturação de embriões somáticos de mamoeiro, no tratamento controle, sem estresse hídrico.

Nº Spot	Gi	Score	Nº de pepetideos	pl teorico/exp.	MwkDa Teorico/exp.	Coverage	Proteína	Espécie
Metabolismo Energético								
C318	gi 60280217	29	1	4.94/4,99	53,45/55,00	0,01	UDP-glucose:flavonoid 7-O-glucosyltransferase	Malus x domestica
C344	gi 356569328	17	1	5.79/5,53	45,48/45,00	0,04	UDP-glycosyltransferase 76F1-like	Glycine Max
D346	gi 297381400	18	1	9.62/4,82	13,16/94,00	0,81	ATP synthase beta subunit	Cryptochila grandiflora
C336	gi 357129131	25	1	6.80/5,93	56,66/97,00	0,02	Cytochrome P450 71C2-like	Brachypodium distachyon
Processamento DNA/RNA								
C330	gi 12330474	28	1	10.46/6,37	21,6/18,00	0,05	Ribosomal protein 4	Entosthodon drummondii
C333	gi 153012177	20	2	9.74/5,13	13,54/20,00	0,19	Ribosomal protein L14	Medicago truncatula
C345	gi 159480652	25	1	9.56/5,66	76,74/50,00	0,02	Nucleolar GTP-binding protein	Chlamydomonas reinhardtii
D317	gi 186524259	22	1	5.08/5,40	29,54/44,00	0,06	Histone 2A domain-containing protein	Arabidopsis thaliana
C317	gi 297830802	27	1	5.62/5,37	66,81/45,00	0,02	RNA recognition motif-containing protein	Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata
D317	gi 186524259	22	1	5.08/5,40	29,54/44,00	0,06	Histone 2A domain-containing protein	Arabidopsis thaliana
D348	gi 302847371	43	1	5.24/7,02	68,68/15,00	0,01	Hypothetical protein VOLCADRAFT_96051	Volvox carteri f. nagariensis
D340	gi 1673366	20	1	5.62/5,37	10,51/35,00	0,01	Cytosolic trna-Ala synthetase	Arabidopsis thaliana
Resposta a estresse/ doenças								
C329	gi 37806183	27	1	7.41/5,86	146,51/17,00	0,01	Putative disease resistance protein	Oryza sativa Japonica Group
C327	gi 240254346	30	1	9.13/4,94	26,26/21,00	0,02	Protein TIFY 7	Arabidopsis thaliana
Transporte								
D337	gi 67937767	19	1	9.34	11,61	0,17	Non-specific lipid transfer protein precursor	Fragaria x ananassa
Metabolismo de proteínas								
D325	gi 20559	65	1	5.07/4,60	70,73/28,00	0,03	Hsp70 (AA 6 - 651)	Petunia x hybrida
C342	gi 357154068	30	1	9.05/5,22	82,09/40,00	0,01	Subtilisin-like protease-like	Brachypodium distachyon
C315	gi 356504569	21	1	6.21/6,48	83,47/49,00	0,01	Protein kinase G11A-like	Glycine Max
C331	gi 357157532	25	1	6.60/6,00	99,91/19,00	0,02	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1-like 1-like	Brachypodium distachyon

Cont. Tabela 8

Nº Spot	Gi	Score	Nº de pepetideos	pl teorico/exp.	MwkDa Teorico/exp.	Coverage	Proteína	Espécie
Regulação hormonal/sinais								
C339	gi 30686846	26	1	8.54/5,13	16,56/37,00	0,1	SAUR-like auxin-responsive protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>
C346	gi 253750642	26	1	6.44/4,82	16,00/64,00	0	Phytochrome 3	<i>Coniogramme intermedia</i> <i>var. glabra</i>
Diversos								
D349	gi 357113122	28	1	5.36/5,24	197,94/13,00	0,01	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1	<i>Brachypodium distachyon</i>
D349	gi 357113122	28	1	5.36/5,24	197,94/13,00	0,01	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1	<i>Brachypodium distachyon</i>
C332	gi 356527634	28	1	6.94/5,62	119,05/20,00	0	Kinesin-4-like	<i>Glycine Max</i>
D349	gi 357113122	21	1	5.36/5,66	19,79/64,00	0,01	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1	<i>Brachypodium distachyon</i>
Desconhecido								
C337	gi 242092290	28	1	6.74/4,47	38,19/28,00	0,04	Hypothetical protein SORBIDRAFT_10g006300	<i>Sorghum bicolor</i>
D330	gi 356546270	28	1	6.01/6,51	90,33/17,00	0,01	Katanin p80 WD40 repeat-containing subunit B1 homolog 1-like	<i>Glycine Max</i>
D354	gi 115468068	36	1	6.32/4,82	22,59/24,00	0,04	Os06g0474800	<i>Oryza sativa Japonica</i> <i>Group</i>
D324	gi 108712009	22	1	5.16/4,51	72,76/28,00	0,03	Hypothetical protein LOC_Os03g62388	<i>Oryza sativa Japonica</i> <i>Group</i>
D355	gi 147857802	25	1	9.00/4,78	16,49/20,00	0,01	Hypothetical protein VITISV_019902	<i>Vitis vinifera</i>
C338	gi 384248955	24	1	6.71/4,47	36,89/29,00	0,05	Hypothetical protein COCSUDRAFT_37061	<i>Coccomyxa</i> <i>subellipsoidea C-169</i>
C320	gi 361067029	23	3	10.96/4,63	11,36/77,00	0,22	Anonymous locus 0_12329_02 genomic	<i>Pinus taeda</i>

Tabela 9. Lista de proteínas identificadas na maturação de embriões somáticos de mamoeiro sob estresse hídrico.

Nº Spot	Gi	Score	Nº de pepetideos	pl teorico/exp.	MwkDa Teorico/exp.	Coverage	Proteína	Espécie
Metabolismo energetic								
F138	gi 221255555	76	1	6.18/6,97	11,55/19,00	0,12	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>Populus balsamifera</i>
E139	gi 3738257	70	1	5.83/6,66	42,46/48,00	0,04	Cytosolic phosphoglycerate kinase 1	<i>Populus nigra</i>
F244	gi 533474	66	1	5.62/5,40	48,3/56,00	0,04	2-phospho-D-glycerate hydrolase	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>
E135	gi 356500825	64	1	6.62/6,88	38,37/37,00	0,07	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme-like	<i>Glycine Max</i>
E255	gi 116582785	39	1	7.06/6,64	63,96/59,00	0,02	Cytosolic glucose-6-phosphate	<i>Mesostigma viride</i>
E244	gi 73918015	26	1	5.22/5,39	49,71/54,00	0,03	Hexokinase 7	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
F167	gi 359483879	23	1	6.57/5,66	43,58/18,00	0,02	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-like	<i>Vitis vinifera</i>
F227	gi 98985844	24	1	6.37/5,46	55,07/50,00	0,03	Methylthioalkylmalate synthase b	<i>Arabidopsis lyrata subsp. Petraea</i>
F197	gi 145353726	24	1	5.66/5,29	82,93/36,00	0,01	Pentatrichopeptide repeat (PPR) protein	<i>Ostreococcus lucimarinus CCE9901</i>
F211	gi 19885	23	1	9.04/6,85	57,68/43,00	0,02	Monosaccharid transporter	<i>Nicotiana tabacum</i>
F168	gi 226499566	30	1	6.41/6,06	74,17/18,00	0,01	ATP binding protein precursor	<i>Zea Mays</i>
Regulação hormonal								
F155	gi 7920700	25	1	6.05/4,62	17,44/29,00	0,15	Gibberellin 20-oxidase	<i>Sorghum bicolor</i>
E166	gi 295885749	46	1	5.65/4,65	58,7/18,00	0,01	Cytokinin oxidase 2	<i>Triticum aestivum</i>
E166	gi 295885749	46	1	5.65/4,65	58,7/18,00	0,01	Cytokinin oxidase 2	<i>Triticum aestivum</i>
Metabolismo de lipídios								
F194	gi 461461	63	1	8.78/5,51	40,45/34,00	0,07	NADH-dependent enoyl-ACP reductase	<i>Brassica napus</i>
E194	gi 210110932	68	1	8.64/5,47	41,42/33,00	0,04	Enoyl-ACP reductase 1-1	<i>Arachis hypogaea</i>
A31	gi 67937767	15	1	9.37/5,57	11,61/57,00	0,17	Non-specific lipid transfer protein precursor	<i>Fragaria x ananassa</i>

Cont. Tabela 9

Nº Spot	Gi	Score	Nº de pepetideos	pl teorico/exp.	MwkDa Teorico/exp.	Coverage	Proteína	Espécie
E167	gi 351721657	30	1	8.63/5,61	76,87/18,00	0,02	Alfa-carboxyltransferase precursor	<i>Glycine max</i>
Metabolismo de proteínas								
F188	gi 1673365	23	1	6.05/4,63	11,04/31,00	0,01	Mitochondrial trna-Ala synthetase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
F128	gi 356504139	28	1	8.57/6,87	64,04/85,00	0,01	Serine/threonine-protein kinase	<i>Glycine Max</i>
E142	gi 357140460	22	1	6.32/6,66	11,13/48,00	0,01	At3g07070-like	<i>Brachypodium distachyon</i>
F 140	gi 15223656	19	1	8.44/6,50	88,35/39,00	0,01	Aminotransferase-like, plant mobile domain family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Resposta a estresse/ defesa								
E146	gi 255570424	51	1	6.25/5,93	41,23/40,00	0,02	Alcohol dehydrogenase, putative	<i>Ricinus communis</i>
F146	gi 296248074	40	1	5.91/5,93	41,29/41,00	0,02	Adh1	<i>Oryza sativa indica group</i>
F241	gi 226502290	36	1	9.19/6,15	34,05/56,00	0,05	Glycine-rich RNA-binding protein 7	<i>Zea Mays</i>
E182	gi 148888544	31	1	6.79/5,88	33,79/23,00	0,03	Catalase	<i>Litchi chinensis</i>
F175	gi 242057383	25	1	7.66/6,63	15,37/21,00	0	Hypothetical protein SORBIDRAFT_03g014866	<i>Sorghum bicolor</i>
A69	gi 356514972	29	1	6.05/6,36	133,55/18,00	0	TMV resistance protein N-like	<i>Glycine Max</i>
Processamento RNA/DNA								
E248	gi 308814340	40	1	5.31/5,99	100,75/57,00	0,01	OJ1458_B07.103 gene product (ISS)	<i>Ostreococcus tauri</i>
F148	gi 45504723	39	1	9.27/5,28	41,41/55,00	0,02	Phantastica	<i>Nicotiana tabacum</i>
E164	gi 77555406	37	1	11.58/5,18	22,71/12,00	0,05	Retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
E215	gi 15227629	33	1	5.85/6,12	39,97/42,00	0,02	MO25-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>
F147	gi 218192151	29	1	7.86/5,48	110,19/45,00	0,01	Hypothetical protein osi_10148	<i>Oryza sativa Indica Group</i>
E279	gi 357453385	26	1	5.04/6,04	51,70/92,00	0,04	Transcription factor	<i>Medicago truncatula</i>
F139	gi 359488367	26	1	9.33/6,67	43,98/41,00	0,04	Abhydrolase domain-containing protein	<i>Vitis vinifera</i>
F158	gi 8216957	19	3	9.87/4,63	23,02/17,00	0,13	FAM108B1-like isoform 2 Putative transcription factor	<i>Cucumis sativus</i>

Cont. Tabela 9

Nº Spot	Gi	Score	Nº de pepetideos	pl teorico/exp.	MwkDa Teorico/exp.	Coverage	Proteína	Espécie
F222	gi 38564733	131	2	5.29/5,33	46,58/48,00	0,1	Initiation factor eif4a-15	<i>Helianthus annuus</i>
	Citoesqueleto							
F200	gi 295885	132	2	5.29/5,66	41,88/37,00	0,09	Actin	<i>Oryza sativa</i> Indica Group
	Via pentose-fosfato							
E141	gi 14009640	46	1	6.04/6,54	53,21/48,00	0,03	Cytosolic 6-phosphogluconate dehydrogenase	<i>Spinacia oleracea</i>
E186	gi 160689998	31	1	8.37/4,27	27,75/32,00	0,04	Xanthine dehydrogenase	<i>Laurus nobilis</i>
	Biogênese da parede celular							
E184	gi 302814778	30	1	7.92/6,60	58,08/25,00	0,01	Fucosyltransferase cazy family GT37-like protein	<i>Selaginella moellendorffii</i>
E259	gi 1549333	30	1	5.79/6,48	28,43/62,00	0,07	Class IV chitinase EP3-3/E7	<i>Daucus carota</i>
E241	gi 297826475	42	1	8.56/6,13	69,67/54,00	0,02	Gaut5/lgt5	<i>Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata</i>
	Transporte							
F215	gi 147857929	27	1	9.22/6,14	19,31/44,00	0	Hypothetical protein VITISV_039771	<i>Vitis vinifera</i>
F203	gi 357466787	27	1	6.01/5,74	14,53/39,00	0,12	Hypothetical protein MTR_3g111040	<i>Medicago truncatula</i>
F142	gi 16905192	26	1	5.68/6,68	76,88/50,00	0,02	Putative ARE1 protein	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
F19	gi 357501483	23	1	9.58	14,32	0,07	Vesicle transport protein GOT1B	<i>Medicago truncatula</i>
F140	gi 15223656	19	1	8.44/6,50	88,35/39,00	0,01	Aminotransferase-like, plant mobile domain family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	Desconhecida							
E197	gi 7228160	29	1	4.88/5,27	25,44/35,00	0,03	Putative Rho GDP dissociation inhibitor	<i>Nicotiana tabacum</i>
F159	gi 307105774	26	1	6.41/4,95	58,15/16,00	0,03	Hypothetical protein CHLNCDRAFT_25383	<i>Chlorella variabilis</i>
F152	gi 356553911	25	1	8.65/4,96	81,92/32,00	0,02	Uncharacterized protein LOC100813141	<i>Glycine Max</i>
A33	gi 307103076	32	1	8.64/5,46	87,79/53,00	0,01	Hypothetical protein CHLNCDRAFT_141139	<i>Chlorella variabilis</i>
F135	gi 255072243	56	2	4.70/6,88	77,05/37,00	0,01	Rad21-like protein	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
E243	gi 159477134	43	1	8.39/5,55	14,04/54,00	0	Cytosine-C5 specific DNA methyltransferase	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

Cont. Tabela 9

Nº Spot	Gi	Score	Nº de pepetideos	pl teorico/exp.	MwkDa Teorico/exp.	Coverage	Proteína	Espécie
F186	gi 125537177	25	1	11.59/4,30	16,42/30,00	0,14	Hypothetical protein osi_38890	<i>Oryza sativa</i> Indica Group
F165	gi 20279450	25	1	9.93/4,53	79,91/15,00	0,01	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
F141	gi 358347871	22	1	9.51/6,56	87,84/50,00	0,22	Hypothetical protein MTR_115s0013	<i>Medicago truncatula</i>
F156	gi 242094026	22	1	8.51/4,70	42,9/19,00	0,04	Hypothetical protein SORBIDRAFT_10g028256	<i>Sorghum bicolor</i>
B25	gi 108712009	22	1	5.16/4,34	72,76/13,00	0,03	Hypothetical protein LOC_Os03g62388	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
E211	gi 222631968	21	1	5.46/6,83	92,16/42,00	0,01	Hypothetical protein osj_18931	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
F881	gi 218191889	21	1	8.77	12,73	0,16	Hypothetical protein osi_09589	<i>Oryza sativa</i> Indica Group
F205	gi 321172942	20	2	11.79/5,24	83,76/39,00	0,19	CLE01 protein	<i>Glycine Max</i>
F130	gi 20161629	20	1	10.03/6,49	66,47/58,00	0,03	B1065g12.31	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
F162	gi 57282316	23	1	7.03/4,49	66,85/83,00	0,02	Bromodomain-containing RNA-binding protein	<i>Nicotiana benthamiana</i>
F184	gi 255540597	23	1	8.99/6,64	15,38/25,00	0,01	Hypothetical protein RCOM_1509910	<i>Ricinus communis</i>
E254	gi 356511269	23	1	9.08/5,61	53,13/66,00	0,02	Uncharacterized glycosyltransferase AGO61-like	<i>Glycine Max</i>
F132	gi 30840956	22	1	6.38/6,67	38,2/61,00	0,03	Beta-cyanoalanine synthase	<i>Betula pendula</i>
F131	gi 356501014	19	1	8.57/6,97	48,5/55,00	0,03	U-box domain-containing protein 20-like	<i>Glycine Max</i>
E188	gi 15230186	18	1	5.50/4,57	42,64/32,00	0,05	F-box/kelch-repeat protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Tabela 10. Proteínas identificadas nos dois tratamentos, Controle e T2.

Nº Spot	Gi	Score	Nº de pepetideos	pl teorico/exp.	MwkDa Teorico/exp.	Coverage	Proteína	Espécie
Metabolismo energético								
A21	gi 8919731	138	1	5.49/5,70	48,13/51,00	5%	Enolase	<i>Spinacia oleracea</i>
A17	gi 374255952	62	1	5.21/5,97	27,31/58,00	11%	Putative phosphoglycerate mutase protein, partial	<i>Elaeis guineensis</i>
B8	gi 255564832	23	1	5.10/4,99	89,64/26,00	1%	Serine-threonine protein kinase, plant-type, putative	<i>Ricinus communis</i>
B8	gi 255564832	23	1	5.10/6,33	89,64/24,00	1%	Serine-threonine protein kinase, plant-type, putative	<i>Ricinus communis</i>
B8	gi 255564832	25	1	5.10/6,28	89,64/25,00	1%	Serine-threonine protein kinase, plant-type, putative	<i>Ricinus communis</i>
A126	gi 255581663	29	1	6.21/6,39	103,33/84,00	1%	Alpha-glucosidase, putative	<i>Ricinus communis</i>
B33	gi 225450368	40	1	5.27/5,53	57,45/61,00	1%	Beta-glucosidase 13	<i>Vitis vinifera</i>
B33	gi 225450368	43	1	5.27/5,43	57,45/59,00	1%	Beta-glucosidase 13	<i>Vitis vinifera</i>
A32	gi 147860633	52	1	9.52/5,59	62,00/55,00	17%	Hypothetical protein VITISV_034963	<i>Vitis vinifera</i>
B33	gi 225450368	52	1	5.27/5,33	57,45/37,00	0,01	Beta-glucosidase 13	<i>Vitis vinifera</i>
B126	gi 356528240	29	1	6.47/6,31	37,39/90,00	5%	Inositol oxygenase 2-like	<i>Glycine Max</i>
B126	gi 356528240	20	1	6.47/4,51	37,39/31,00	0,05	Inositol oxygenase 2-like	<i>Glycine Max</i>
A7	gi 55956968	28	1	8.25/6,36	56,73/26,00	1%	Beta-2-xylosyltransferase	<i>Saccharum officinarum</i>
Processamento DNA/RNA								
B55	gi 18401305	38	1	9.05/5,28	102,77/12,00	1%	Argonaute 4	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A2	gi 334182222	37	1	7.98/6,49	67,15/11,00	1%	5'-3' exonuclease-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A3	gi 357498189	40	1	5.22/6,97	86,00/14,00	2%	DNA repair and recombination protein PIF1	<i>Medicago truncatula</i>
B9	gi 38347668	32	1	8.05/6,25	37,23/27,00	2%	Osjnba0054d14.3	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
B49	gi 255078218	38	1	7.44/4,53	113,55/14,00	1%	Set domain protein	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
B10	gi 147792799	29	1	9.34/6,26	202,89/36,00	0%	Hypothetical protein VITISV_010992	<i>Vitis vinifera</i>

Cont. Tabela 10

Nº Spot	Gi	Score	Nº de pepetideos	pl teorico/exp.	MwkDa Teorico/exp.	Coverage	Proteína	Espécie
B52	gi 147818457	29	1	8.85/6,10	47,42/62,00	4%	Hypothetical protein VITISV_019884	<i>Vitis vinifera</i>
A56	gi 31432300	28	1	9.17/6,08	222,95/11,00	0%	Transposon protein, putative, unclassified	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
B12	gi 147858312	27	1	5.61/6,38	37,91/17,00	4%	Hypothetical protein VITISV_019805	<i>Vitis vinifera</i>
B4	gi 357475219	27	1	4.75/6,49	35,35/17,00	3%	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3-A	<i>Medicago truncatula</i>
B91	gi 68300821	26	1	7.93/5,80	12,67/26,00	1%	RNA polymerase IV largest subunit	<i>Chara hispida</i>
B44	gi 312232989	26	1	5.17/5,03	31,98/18,00	4%	Embryo defective 2765	<i>Croton myricifolius</i>
B51	gi 357453385	25	1	5.04/4,35	51,70/58,00	4%	Transcription factor	<i>Medicago truncatula</i>
A59	gi 194033318	24	1	10.10/6,13	33,39/16,00	0%	Ribosomal protein S4	<i>Oedogonium cardiacum</i>
B18	gi 15221135	20	1	6.08/6,09	48,59/51,00	2%	Translation initiation factor eif-5	<i>Arabidopsis thaliana</i>
B51	gi 357453385	21	1	5.04/5,33	51,7/17,00	4%	Transcription factor	<i>Medicago truncatula</i>
B51	gi 357453385	21	1	5.04/6,09	51,7/18,00	0,04	Transcription factor	<i>Medicago truncatula</i>
B51	gi 357453385	21	1	5.04/5,25	51,7/38,00	0,04	Transcription factor	<i>Medicago truncatula</i>
E237	gi 31432338	32	1	5.41/6,32	113,87/53,00	0,01	Transposon protein, putative, unclassified	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
E279	gi 357453385	21	1	5.04/6,35	51,70/55,00	0,04	Transcription factor	<i>Medicago truncatula</i>
A3	gi 357498189	40	1	5.22/6,97	86,00/14,00	2%	DNA repair and recombination protein PIF1	<i>Medicago truncatula</i>
Metabolismo de Lipídios								
A111	gi 257096376	77	1	5.85/6,46	37,96/37,00	6%	GDSL esterase/lípase	<i>Carica papaya</i>
A24	gi 18141281	29	1	5.49/5,86	48,38/19,00	2%	Senescence-associated cysteine protease	<i>Brassica oleracea</i>

Cont. Tabela 10

Nº Spot	Gi	Score	Nº de pepetideos	pl teorico/exp.	MwkDa Teorico/exp.	Coverage	Proteína	Espécie
A41	gi 166235557	24	1	5.8/4,69	53,78/26,00	1%	acetyl-CoA carboxylase beta subunit	<i>Silene samia</i>
A42	gi 50253239	22	1	7.92/5,02	56,65/26,00	4%	pr1-like protein	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
Resposta a estresse/ defesa								
A95	gi 79321655	40	1	5.73/6,21	10,42/27,00	9%	defensin-like protein 294	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A115	gi 323370547	29	1	5.68/6,65	95,14/49,00	2%	ADR1	<i>Solanum tuberosum</i>
A67	gi 125527990	27	1	5.56/5,42	103,21/18,00	2%	hypothetical protein Osl_04030	<i>Oryza sativa Indica Group</i>
A54	gi 227438191	23	1	5.77/5,31	14,84/25,00	0%	Disease resistance protein	<i>Brassica rapa subsp. Pekinensis</i>
B99	gi 9828630	55	1	6.97/5,15	39,99/32,00	1%	F1N21.10	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Metabolismo aminoácidos								
A52	gi 288063	43	1	6.55/6,17	63,88/58,00	4%	ketol-acid reductoisomerase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
B69	gi 356529074	27	1	8.47/6,27	48,43/19,00	1%	Tryptophan synthase beta chain 2	<i>Glycine Max</i>
Regulação Hormonal								
A87	gi 359483269	49	1	6.36/4,69	88,11/23,00	1%	beta-amyrin synthase	<i>Vitis vinifera</i>
A45	gi 270313547	47	1	4.94/4,63	39,19/20,00	2%	S-adenosylmethionine decarboxylase	<i>Olea europaea</i>
B114	gi 225440165	23	1	9.20/6,49	43,49/52,00	3%	auxin-induced protein 5NG4 isoform 1	<i>Vitis vinifera</i>
B15	gi 357506099	19	1	7.42/6,29	66,98/53,00	1%	DELLA protein GAI	<i>Medicago truncatula</i>
Metabolismo proteínas								
A51	gi 233955399	43	1	4.48/4,34	48,21/53,00	5%	calreticulin	<i>Carica papaya</i>

Cont. Tabela 10

Nº Spot	Gi	Score	Nº de pepetideos	pl teorico/exp.	MwkDa Teorico/exp.	Coverage	Proteína	Espécie
B48	gi 15004415	17	1	9.79/4,92	53,86/16,00	3%	Maturase	<i>Erycina echinata</i>
Proliferação celular								
A69	gi 308812448	39	2	6.72/6,36	86,94/18,00	1%	Cell division protein (ISS)	<i>Ostreococcus tauri</i>
A1	gi 121489775	29	1	9.05/6,86	25,57/24,00	8%	Putative RING-H2 finger protein precursor	<i>Phillyrea latifolia</i>
B60	gi 255550431	32	1	8.93/6,26	81,25/17,00	1%	Xylem serine proteinase 1 precursor, putative	<i>Ricinus communis</i>
Diversas								
A99	gi 421855	26	1	5.94/5,18	10,89/28,00	1%	Alanine-trna ligase (EC 6.1.1.7)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A26	gi 242075130	24	1	5.63/5,72	10,76/12,00	1%	Hypothetical protein SORBIDRAFT_06g002040	<i>Sorghum bicolor</i>
A11	gi 86361432	45	1	5.62/6,45	49,34/38,00	0,02	UDP-glycosyltransferase-like protein	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>
A127	gi 147863011	29	1	5.03/4,66	141,62/137,00	0%	Hypothetical protein VITISV_009585	<i>Vitis vinifera</i>
A60	gi 99014551	27	1	5.22/6,34	27,9/17,00	8%	Putative aminotransferase, class V family protein	<i>Chenopodium rubrum</i>
B54	gi 357150848	34	1	4.86/5,28	42,97/12,00	3%	Sulfotransferase 17-like	<i>Brachypodium distachyon</i>
B62	gi 303283114	34	1	6.43/6,73	18,1/17,00	7%	Ferredoxin thioredoxin reductase	<i>Micromonas pusilla CCMP1545</i>
A8	gi 226506874	33	1	5.29/6,27	58,62/27,00	1%	Uncharacterized protein LOC100274454	<i>Zea Mays</i>
A15	gi 242077090	32	1	6.87/6,37	118,54/49,00	1%	Hypothetical protein SORBIDRAFT_06g027770	<i>Sorghum bicolor</i>
A61	gi 33521626	65	1	7.20/6,27	26,89/16,00	8%	Mn-superoxide dismutase	<i>Lotus japonicus</i>
A11	gi 86361432	31	1	5.62/6,46	49,34/33,00	2%	UDP-glycosyltransferase-like protein	<i>Oryza sativa Indica Group</i>
A62	gi 147815860	31	1	7.22/6,82	53,83/17,00	2%	Hypothetical protein VITISV_003873	<i>Vitis vinifera</i>

Cont. Tabela 10

Nº Spot	Gi	Score	Nº de pepetideos	pl teorico/exp.	MwkDa Teorico/exp.	Coverage	Proteína	Espécie
B26	gi 7141306	31	1	7.05/5,58	79,15/12,00	1%	RSH2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
B1	gi 222631968	30	1	5.46/6,79	92,16/26,00	1%	Hypothetical protein osj_18931	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
	Desconhecido							
B56	gi 225461989	30	1	4.99/5,96	62,14/13,00	1%	Coiled-coil domain-containing protein 22	<i>Vitis vinifera</i>
B111	gi 14029022	30	1	11.89/6,38	22,27/40,00	7%	Unknown protein	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
B67	gi 224090013	29	1	6.85/5,38	68,31/19,00	1%	Predicted protein	<i>Populus trichocarpa</i>
B127	gi 226505408	23	1	7.31/4,63	65,82/133,00	3%	Loc100281166	<i>Zea Mays</i>
B24	gi 357487265	23	1	9.11/5,74	42,89/20,00	3%	Hypothetical protein MTR_5g042630	<i>Medicago truncatula</i>
A50	gi 212722714	22	1	6.76/4,43	54,66/42,00	1%	Uncharacterized protein LOC100193076	<i>Zea Mays</i>
B36	gi 147788042	22	1	5.63/4,73	90,99/78,00	24%	Hypothetical protein VITISV_036148	<i>Vitis vinifera</i>
B25	gi 108712009	21	1	5.16/5,86	72,76/18,00	3%	Hypothetical protein LOC_Os03g62388	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group
B36	gi 147788042	19	1	5.63/5,88	90,99/65,00	24%	Hypothetical protein VITISV_036148	<i>Vitis vinifera</i>
D352	gi 255075951	30	1	4.82/4,71	41,00/66,00	0,05	Predicted protein	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
D352	gi 255075951	25	1	4.82/4,53	41,00/18,00	0,05	Predicted protein	<i>Micromonas sp. RCC299</i>

5. DISCUSSÃO

5.1. Indução das culturas embriogênicas

Fatores como o genótipo, meio de cultura e tipo de explante, podem influenciar, de forma significativa, no tipo e potencial de regeneração dos calos (Luciani et al., 2006). Com base nisso, dois ensaios foram instalados no intuito de identificar as melhores condições para a indução de calos embriogênicos de mamoeiro, conforme descrito na metodologia.

A escolha do regulador de crescimento e a adequação da concentração é fundamental para otimização dos resultados obtidos na indução das culturas, sendo as auxinas os reguladores mais utilizados para esse fim (Duditis et al., 1991). Em mamoeiro, as principais auxinas empregadas na indução de calos são o 2,4-D (Anandan et al., 2012; Correia, 2012; Farzana et al., 2008; Malabadi et al., 2011) e ANA (Farzana et al., 2008), dependendo do genótipo empregado.

Conforme citado anteriormente, os calos de mamoeiro foram induzidos a partir de embriões zigóticos, inoculados em meio de cultura suplementada com diferentes concentrações de auxina, na ausência de luz. Resultando em altos percentuais de indução para os genótipos testados, esses resultados demonstram a importância do uso de auxinas na indução de culturas de mamoeiro, conforme observado em outros estudos com a espécie (Fitch e Manshardt, 1990; Almeida et al., 2000; Anandan et al., 2012), como também em outras espécies como o

cupuaçuzeiro (Ledo et al., 2002), o maracujazeiro (Pinto et al., 2011) e a cana-de-açúcar (Shiromani et al., 2011; Burrieza et al., 2012).

Os tratamentos de indução clássicos, utilizados para muitas espécies, aumentam a auxina endógena em explantes responsivos (Pasternak et al., 2002), sendo este um sinal crucial que determina o destino embriogênico das células cultivadas (Thomas et al., 2002). No presente trabalho, a utilização de 20 μM de 2,4-D promoveu altas taxas de indução de calos para os genótipos Golden e UC01 (Tabela 3), resultados similares foram encontrados por Anandan et al. (2012), que conseguiram uma taxa de indução de 75,12%, utilizando uma concentração de 9,0 μM de 2,4-D, e Almeida et al. (2000), também utilizando 2,4-D, alcançaram 100% de indução, utilizando 45 μM em diferentes explantes, hipocótilo; hipocótilo com folha cotiledonar e folha cotiledonar de mamoeiro cv. Baixinho de Santa Amália.

Nossos dados também corroboram com o trabalho de Suksa-Ard et al. (1999), que testaram a exigência de 2,4-D em diferentes tipos de explante para a indução de calos de mamoeiro, concluindo que esse regulador foi essencial no desenvolvimento de calos de mamoeiro a partir de embriões zigóticos maduros, afirmando, também, que essa necessidade está, diretamente, relacionada ao tipo de explante utilizado.

A utilização de ANA na indução de calos de mamoeiro dos dois genótipos estudados não foi satisfatória, visto que, embora tenha proporcionado altas taxas de indução, apresentou características não embriogênicas durante seu desenvolvimento e a formação de estruturas anormais. Farzana et al. (2008), utilizando ANA na indução de calos de mamoeiro cv. Rathna, obtiveram baixa taxa de indução de calos de boa qualidade, não ultrapassando 20%, e Ledo et al. (2002), testando concentrações similares de ANA em cupuaçuzeiro, obtiveram a formação de calos com aspecto não embriogênico, obtendo 100% de indução de calos embriogênicos em meio acrescido de 9,04 μM de 2,4-D.

A utilização de auxinas na indução da desdiferenciação de tecidos vegetais tem sido associada a mudanças no padrão de metilação de DNA das células (Smulders et al. 2011). Essas mudanças podem ser consideradas componentes do mecanismo epigenético, as quais regulam a expressão dos genes que estão associados com a aquisição da capacidade embriogênica durante a cultura de tecidos (Wang e Wang, 2012).

Variações epigenéticas, baseadas tanto na metilação do DNA, quanto na modificação de histonas, são capazes de regular a regeneração através da modulação de fatores de transcrição Wuschel (WUS) e da sinalização de auxinas (Li et al., 2011). Esses autores fizeram um aprofundado estudo da influência desses fatores epigenéticos na modulação e sinalização de auxinas em *Arabidopsis*, verificando que alguns genes envolvidos na sinalização de auxinas e desenvolvimento do meristema foram metilados nos calos, mas foram demetilados após o tratamento de indução, demonstrando sua atuação na aquisição da competência celular, que necessita de intenso processo de desprogramação e reprogramação da informação genética.

No presente trabalho, a indução de calos provenientes de genótipos diferentes resultou em respostas distintas, mesmo quando submetidos às mesmas condições de cultivo, demonstrando seu caráter genótipo dependente. O mesmo foi observado por Malabadi et al. (2011), que testaram a influência do 2,4-D e TDZ na indução de calos, em 13 cultivares comerciais de mamoeiro.

Segundo Guerra et al. (2001), o genótipo da planta mãe doadora dos explantes juntamente com o tipo de auxina exercem papel fundamental na competência embriogênica, sendo que a escolha do tipo de explante pode afetar, significativamente, uma regeneração eficiente (Gubišová et al., 2012).

O uso de embriões imaturos como fonte de explante para embriogênese somática tem sido utilizado para indução de calos embriogênicos em diversas espécies. No entanto, a determinação do estágio de desenvolvimento dos embriões imaturos é sazonal, por se tratar de uma característica tempo-dependente. Sendo assim, a relação do estágio de desenvolvimento com os resultados obtidos é de grande importância para a obtenção de um protocolo não só eficiente, mas com boa reprodutibilidade (Zhang et al., 2011).

Nesse intuito, diversos trabalhos foram realizados, procurando otimizar a utilização desses explantes na cultura de espécies de interesse como trigo (Murín et al., 2012), grama (Bai e Qu, 2001), magnolia (Park et al., 2012), maracujá (Silva et al., 2009) amendoim, (Ali et al., 2011), entre outros. Da mesma forma que esses autores, o presente trabalho viabilizou um protocolo com alta taxa de indução, utilizando embriões maduros.

5.2. Maturação

A maturação é uma fase crítica no desenvolvimento do embrião somático. Essa etapa é marcada pela expansão, diferenciação e acúmulo de substância de reserva, sendo, portanto, determinante na germinação e regeneração bem sucedida dos embriões somáticos (Mishra et al., 2012).

Desde os trabalhos de Fischer et al. (1987) e Finkelstien e Crouch (1986), o estresse hídrico foi proposto como um fator importante na maturação de embriões somáticos, já que, desde então, esses processos vêm sendo associados ao baixo potencial osmótico do meio de cultura onde o embrião está inserido.

Como já citado, o PEG é um agente osmótico não plasmolizante que provoca déficit hídrico; essa dessecação induzida por ele no meio de cultura pode estimular a produção endógena de ácido abscísico (ABA), que é responsável pela síntese de substâncias de reserva importantes para as demais fases do desenvolvimento do embrião, como as proteínas LEA (Stasolla et al., 2003). Ainda, segundo esses autores, o PEG também pode atuar no controle da expressão de diversos genes responsáveis pelo controle da divisão, diferenciação e desenvolvimento do meristema apical do caule. Recentemente, Smulders et al. (2011) propuseram que esse tipo de estresses também pode provocar modificações na metilação do DNA.

Pelos efeitos positivos na maturação, o PEG tem sido utilizado como agente de maturação em diferentes espécies, incluindo seringueira (Linossier et al., 1997), *Glycine max* (Walker e Parrott, 2001), *Aesculus hippocastanum* (Troch, 2009) e mamoeiro (Mishra et al., 2010). Suas moléculas de alto peso molecular não são capazes de passar através da parede celular, que conduz a uma restrição da absorção de água, uma reduzida pressão de turgescência e à redução no potencial osmótico intracelular (Misra et al., 1993), levando à dessecação.

De acordo com Rance et al. (1994), os tratamentos de dessecação do embrião, como o produzido pelo PEG, podem resultar em rápidas mudanças bioquímicas, desencadeando a atividade de proteínas específicas. Essas alterações podem ser identificadas nesse trabalho, através das mudanças no desenvolvimento das culturas de mamoeiro dos genótipos estudados

(percentagem de maturação, número de embriões produzidos, morfologia e incremento de proteínas dos calos), sendo o último estudado, apenas, no genótipo híbrido.

No presente trabalho, embora o meio de cultura acrescido de PEG tenha resultado em maior porcentagem e qualidade dos embriões somáticos formados, o tratamento controle, sem a adição de PEG, foi capaz de desenvolver embriões somáticos maduros. Esses resultados indicam que o PEG não possui ação determinante para a formação dos embriões somáticos de mamoeiro, mas sua utilização pontencializa a produção de embriões somáticos normais.

Mishra et al. (2010), trabalhando na maturação de embriões somáticos de mamoeiro cv. Pusa Delicious, submetidos à transformação genética, obtiveram máximo de conversão de embriões somáticos do estágio globular para o estágio cotiledonar quando utilizaram 4,2% de PEG, aumentando, assim, as taxas de regeneração das plantas.

Em algumas espécies como grama verde (SivaKumar et al., 2010) e *Prosopis laevigata* (Buendía-González et al., 2012), a presença de PEG foi essencial para a conversão dos embriões somáticos em plântulas, que só teve início com a indução do estresse hídrico induzido pelo PEG. Em contra partida, Márquez-Martín et al. (2011) não obtiveram bons resultados, utilizando PEG no desenvolvimento de embriões somáticos de *Persea americana*; no entanto, tiveram resposta positiva, utilizando outros agentes osmóticos.

Rai et al. (2009), trabalhando com diferentes concentrações de PEG na maturação de calos de goiaba, obtiveram uma taxa de maturação inferior a 50%; da mesma forma, Körbes e Droste (2005), trabalhando com soja, obtiveram a maior percentagem de maturação de, apenas, 20%, ambos trabalhando com baixas concentrações de PEG.

O incremento de matéria fresca, durante a maturação das culturas, também foi afetado pelo PEG, já que, tanto para o genótipo Golden quanto para o UC01, esse incremento foi maior nas culturas sem acréscimo de PEG. Esse incremento de matéria fresca, obtido no tratamento controle, sem a indução do estresse hídrico, pode estar relacionado ao número inferior de embriões somáticos desenvolvidos nesse tratamento, já que a redução do crescimento celular pela inibição da divisão celular é fundamental na maturação das culturas de diversas espécies (Attree e Fowke, 1993).

Stasolla et al. (2003) constataram que os níveis de transcrição de várias enzimas antioxidantes são mais elevados em algumas etapas do desenvolvimento de embriões somáticos de abeto branco (*Abies alba*), quando tratados com PEG e também verificaram que as aplicações do PEG no meio de maturação de calos embriogênicos de coníferas induziram duas grandes mudanças na expressão gênica, a primeira em embriões imaturos e a segunda em embriões completamente desenvolvidos.

Observou-se o desenvolvimento de embriões anormais no desenvolvimento das culturas dos genótipos estudados. Essas anomalias também foram relatadas no desenvolvimento de embriões sômaticos de mamoeiro (Koehler, 2004) como em outras espécies, como *Glycine max* (Korbes e Droste, 2005; Santos et al., 2006; Hiraga et al., 2007), *Cassia angustifolia* (Agrawal e Sardar, 2007), *Gossypium hirsutum* (Hussain et al., 2009) e *Desmodium motorium* (Devi e Narmathabai, 2011).

El Dawayati et al. (2012), realizando um trabalho com embriões anormais de *Phoenix dactylifera*, observaram que o PEG influenciou, também, no desenvolvimento de embriões somáticos secundários normais a partir desses embriões anormais, sugerindo a sua participação na ativação dos processos de morfogênese dessas culturas

Com o objetivo de caracterizar o efeito do PEG no desenvolvimento dos embriões somáticos de mamoeiro, foram realizados os estudos histomorfológicos durante a resposta morfogenética de culturas submetidas aos tratamentos Controle, sem adição de PEG e Tratamento T2 (6% PEG), que obteve melhor desempenho no desenvolvimento dos embriões.

5.3. Análises histomorfológicas durante morfogênese *in vitro*

A observação histológica é um procedimento importante para a confirmação da técnica morfogenética adotada, bem como para a determinação do tipo celular dos embriões somáticos originados (Matsumoto et al., 1996).

Diversos estudos sobre a histodiferenciação de embriões somáticos de dicotiledôneas vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos, em diversas espécies, como em *Passiflora edulis* (Pinto et al., 2011), *Feijoa sellowiana*

(Correia e Canhoto, 2010; Cangahuala-Inocente et al., 2004), *Coffea arabica* (Feria et al., 2003) e; *Panax ginseng* (Langhansová et al., 2004), *Vitis vinifera* (Li et al., 2008) e *Tília cordata* (Kärkönen, 2000).

Nas dicotiledôneas, o desenvolvimento do embrião zigótico passa por quatro estágios principais, globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Zimmerman, 1993). Da mesma forma que o embrião zigótico, o embrião somático também passa por esses quatro estágios, diferindo deles no estágio cotiledonar, onde o embrião, ao invés de desenvolver a inibição ao desenvolvimento, inicia o crescimento das plântulas (Yang e Zhang, 2010).

O tipo e o tempo de exposição à auxina são fundamentais para o desenvolvimento de embriões somáticos, já que a auxina é um regulador chave no controle da simetria bilateral e estabelecimento do embrião durante a embriogênese (Cooke et al., 1993), como também para o estabelecimento do meristema apical, pois seu metabolismo está relacionado à atividade do gene *Wuschel* (*Wus*), que tem papel crucial no desenvolvimento desse meristema, atuando no transporte de auxina, que caracteriza um dos fatores mais relevantes no desenvolvimento de embriões normais (Santa-Catarina et al., 2012). Esse transporte desempenha um papel importante na formação dos cotilédones durante o desenvolvimento do embrião, a interferência, nesse tipo de transporte, faz com que uma falha na transição da simetria axial para bilateral e podem resultar na formação de embriões com cotilédones fundidos (Hadfi et al., 1998).

No presente trabalho, o desenvolvimento do embrião somático, que tem início ainda em presença da auxina, pode ter sido fundamental para o posterior desenvolvimento do embrião, pois, de acordo com Liu et al. (1993), a organização estrutural e funcional do meristema apical já está determinada no estágio globular.

Segundo Liu (1993), o desenvolvimento dos cotilédones ocorre a partir da divisão celular predominantemente nas partes cotiledonares e a diminuição dela nas células, na fenda dos cotilédones. No presente trabalho, isso foi visível logo no início do desenvolvimento de embriões, no estágio cordiforme.

A retirada da auxina e a introdução de promotores de maturação têm demonstrado grande importância no desenvolvimento de embriões somáticos; da mesma forma, o estresse hídrico tem sido relatado como importante no desenvolvimento de embriões somáticos de várias espécies (Troch et al., 2009).

No presente trabalho, identificou-se um maior e mais rápido desenvolvimento de embriões somáticos nas culturas tratadas com PEG; resultados semelhantes também foram encontrados por Langhansov et al. (2004), trabalhando com *Panax ginseng*.

Além disso, a adição de PEG aos meios de cultura MS, durante o tratamento de maturação, apesar de não ter sido essencial no desenvolvimento de embriões somáticos de mamoeiro, como citado anteriormente, demonstrou relevância no número de embriões normais desenvolvidos, já que as culturas tratadas com esse promotor resultaram em maior e melhor desenvolvimento de regiões meristemáticas em ambos os genótipos testados. Foi possível verificar que a sua utilização provocou progressiva diminuição do número de embriões anormais, à medida que sua concentração aumentava até 6% (tratamento T2). Esse incremento pode ser devido à ação morfo-ontogénica do PEG descrita por El Dawayati et al. (2012).

O desenvolvimento de embriões somáticos anormais também tem sido relatado em mamoeiro por outros autores, Fernando et al. (2001), trabalhando com 2mg/l de 2,4-D na indução e sem a utilização de promotores de maturação, e Koehler (2004), trabalhando com a indução em meio acrescido de 2mg/L de 2,4-D e maturação das culturas em meio acrescido de 0,5 µM de ABA; entretanto, esses autores não quantificaram o número de embriões anormais encontrados. No presente estudo, a quantificação desses embriões foi importante, já que demonstrou a eficiência do promotor de maturação, utilizado, principalmente, na concentração 6%, no desenvolvimento normal desses embriões.

5.4. Concentração dos carboidratos durante a maturação

O perfil de carboidratos encontrado nas culturas foi diferenciado nos genótipos estudados, esses resultados indicam uma resposta genótipo dependente quanto à ação dos carboidratos, na morfogênese das culturas. Esse tipo de resposta tem sido relatada no desenvolvimento de calos de várias espécies como em *Triticum vulgare* (Filippov et al., 2006), *Zea mays* (Binott et al., 2008), *Oryza sativa* (Moghaieb et al., 2009) e *Phragmites australis* (Máthé et al., 2012).

Os mecanismos envolvidos na transdução de sinais e regulação dos genes envolvidos no metabolismo dos carboidratos nas diferentes espécies de plantas não estão completamente esclarecidos (Padilla-Chacón et al., 2010).

Entretanto, os carboidratos, como sacarose e glicose, têm sua função reconhecida na expressão de genes que desempenham as mais diversas funções, percepção da luz, controle do ciclo celular, resposta ao estresse, armazenamento de reservas e na diferenciação e desenvolvimento celular (Sturm e Tang, 1999). Ainda, segundo esses autores, a clivagem da sacarose é um processo fundamental para o crescimento das plantas.

Embora, na literatura, níveis altos de sacarose e baixos de frutose e glicose estejam associados à maturação e ao desenvolvimento normal dos embriões somáticos, no presente estudo, as culturas submetidas a todos os tratamentos testados, em especial o T2, meio de cultura MS suplementado com 6% de PEG, que obteve as maiores taxas de conversão em embriões cotiledonares, apresentaram um perfil diferente com concentrações maiores de glicose e menores de sacarose.

No presente trabalho, diferente do encontrado para outras espécies como o abacate (Sánchez-Romero et al., 2002) e *Acca sellowiana* (Pescador et al., 2008), os níveis de sacarose tiveram um aumento logo no início do desenvolvimento embrionário, aos 7 dias de cultivo, com posterior declínio até o 28º dia para todos os tratamentos, com exceção do tratamento T3, enquanto os níveis de glicose e frutose mantiveram-se, relativamente, altos durante os 28 dias, principalmente para as culturas do genótipo híbrido. Esses níveis, relativamente, elevados de hexoses, encontrados durante a embriogênese somática de *Carica papaya*, poderiam estar associados à manutenção da divisão celular e desenvolvimento dos embriões somáticos, como sugerido por Hill et al. (2003) para sementes de *Brassica napus*.

Nossas análises demonstraram, também, que os conteúdos de glicose e frutose foram semelhantes, apontando a ligação estreita entre seus metabolismos. No entanto, não foi possível correlacionar os níveis das hexoses aos níveis de sacarose nas culturas, já que os níveis das hexoses, em geral, não demonstraram queda quando ocorreu aumento de sacarose nas culturas e foram mais altos durante todos os tempos avaliados. Nieves et al., 2003, associam os

altos níveis de hexoses a uma maior atividade das enzimas invertase ácida e neutra, que suportam a hidrólise de sacarose na mobilização de reservas.

Em *Medicago arborea*, Martin et al. (2000) também encontraram maiores conteúdos de frutose e glicose e menores conteúdos de sacarose em culturas embriogênicas. Os autores, porém, relacionaram a quantidade de sacarose à utilização desta para a formação de embriões somáticos *in vitro*.

Dangou et al. (2002), estudando o perfil de carboidratos no desenvolvimento do endosperma de sementes de cacau, também identificou concentração de frutose e glicose superiores à sacarose em todos os estádios de desenvolvimento.

Em geral, as hexoses favorecem a divisão e expansão celular, ao passo que a sacarose favorece a diferenciação e maturação (Weschke et al., 2003). Nesse sentido, os níveis mais altos de sacarose, aos sete dias, podem estar relacionados ao início da diferenciação dos embriões globulares nos demais estádios, que teve início a partir do sétimo dia de incubação, assim como os elevados níveis de hexose podem ser devido, segundo análise histomorfológica feita nesse estudo, à constante divisão celular que ocorre de forma acentuada até o 28º dia de cultivo.

5.5. Proteômica

A compreensão dos mecanismos bioquímicos é essencial para o entendimento da embriogênese somática; dentre esses mecanismos, o perfil protéico pode fornecer informações importantes, já que as proteínas têm papel fundamental na histodiferenciação do embrião somático (Cangahuala-Inocente, 2009), além de ser a principal substância de reserva acumulada durante o desenvolvimento embrionário (Bewley e Black, 1994).

De acordo com os resultados obtidos, o PEG teve grande influência na maturação das culturas, já que essas, quando submetidas a esse tratamento, obtiveram melhores taxas de maturação e uma maior formação de embriões somáticos. Esse aumento pode estar relacionado com a síntese de proteínas de reserva, induzidas pelo estresse hídrico (dessecação) provocado pelo PEG (Wise e Tunnacliffe, 2004).

No desenvolvimento do embrião zigótico, a dessecação e o acúmulo de substâncias de reserva estão diretamente relacionados à expressão diferencial de genes e vias metabólicas, processos fundamentais para o sucesso do desenvolvimento e germinação da mesma (Mishra et al., 2012). Para a embriogênese somática, que imita o desenvolvimento zigótico, esses processos, também, são essenciais na morfogênese dos embriões somáticos, servindo, inclusive, como eficiente modelo de estudo para a embriogênese zigótica. Devido a isso, diversos estudos têm sido elaborados com o intuito de compreender o desenvolvimento embrionário de diversas espécies como *Citrus sinensis* (Pan, 2009), *Picea* sp (Iraqi e Tremblay, 2001; Rode, 2012), e *Cyclamen* sp (Winkelmann et al. 2006), entre outros.

Através do estudo comparativo dos perfis dos géis bidimensionais gerados, analisando as proteínas expressas, diferencialmente, durante a maturação dos embriões somáticos, percebeu-se que, da mesma forma que o perfil de proteínas totais, onde o tratamento T2 (com indução do estresse hídrico) obteve maior concentração de proteínas, houve um acréscimo no número de *spots* para esse tratamento. Esse aumento de proteínas, nesse tratamento, pode ser ocasionado pelo aumento de proteínas específicas do estágio de maturação e desidratação do embrião (Sheoram et al., 2005). Resultados semelhantes foram encontrados por Klimaszewska et al. (2004), trabalhando com sementes de *Pinus strobes* e Winkelmann et al. (2006) em *Cyclamen persicum*, onde obtiveram maior classe de proteínas no tratamento com 60 g.L⁻¹ sacarose em detrimento do meio de cultura MS com 30 g.L⁻¹ sacarose.

Trinta e um *spots* foram identificados, apenas, no tratamento Controle, podendo-se destacar proteínas com papel importante no desenvolvimento de embriões somáticos (Tabela 6).

Nesse tratamento, identificaram-se os *spots* C318, C344, D346, C336 como envolvidos no metabolismo energético; essas proteínas, além da função energética, podem estar envolvidas na regulação da expressão de vários genes envolvidos no desenvolvimento embrionário (Businge et al., 2013). Entretanto, maior número de proteínas relacionadas a essa função foram identificadas no tratamento T2. Essa diferença pode estar relacionada à menor manifestação de competência morfogenética observada nos calos submetidos ao tratamento controle.

Dentre as proteínas classificadas nas demais funções, destaca-se a proteína HSP70 (*spot* D325), que é uma chaperona que se liga em sequências hidrofóbicas expostas e mantém a cadeia peptídica desenovelada até que ela possa assumir a conformação tridimensional correta (Wang et al., 2004). Elas são citadas como responsáveis pela translocação e processamento de proteínas, associadas à síntese e mobilização de reservas (Forward et al., 2002), estresse abiótico (Kosova et al., 2010) e defesa celular (Imin et al., 2005). Elas têm sido associadas ao desenvolvimento de sementes, como observado em *Dimocarpus longana* (Wang et al., 2010), e embriões somáticos de várias espécies, como *Vitis vinifera* (Zhang et al., 2009), *Picea abies* (Businge et al., 2013), entre outros.

Também foram identificados *spots* relacionados à degradação de proteínas como a *subtilisin-like protease-like* (*spot* C342), a expressão dessa proteína pode ser inibida pela presença de estresse hídrico (Dramé et al., 2007), ainda, segundo esses autores, ela pode atuar na degradação de substâncias de reserva.

Proteínas motoras, como kinesin-4-like (C332), relacionadas ao movimento dos microtúbulos têm papel único na morfogênese da planta e podem influenciar tanto na morfologia da célula como de toda a planta. Essa influência é atribuída ao seu envolvimento no estabelecimento de planos de divisão celular, em determinar os eixos de alongamento celular e na regulação a deposição de microfibrilas de celulose na parede celular (Zhang et al., 2010; Li et al., 2012).

Apenas duas proteínas com função de regulação hormonal foram identificadas no tratamento Controle, SAUR-like auxin (*spot* C339) e phytochrome 3 (*spot* C346). As proteínas SAUR são proteínas reguladoras de auxina, e o phytochrome pode regular o metabolismo do ácido abscísico (ABA) e ácido giberélico (GA), sendo importante no desenvolvimento e germinação de sementes de *Arabidopsis* (Seo et al., 2006).

Os calos submetidos ao meio acrescido de 6% de PEG obtiveram maior número de proteínas relacionadas a diversos processos celulares quando comparadas ao tratamento Controle (Tabela 7).

Maior atividade de proteínas relacionadas ao metabolismo energético foi identificada nessas células, demonstrando que esse tratamento contribuiu para o desenvolvimento da planta, já que, além de fornecer energia, essas moléculas podem atuar como cofatores de regeneração, construção, interconversão e

síntese de metabólitos, agindo como sinalizadores para a regulação de diversos processos (Xu et al., 2008). Entretanto, de acordo com Kermode (1995), a redução no metabolismo dos carboidratos está relacionada à maturação da semente, o mesmo foi verificado por Stasolla et al. (2003), estudando a influência de PEG na maturação de embriões somáticos de *Picea glauca*.

Proteínas com conhecida atividade de regulação hormonal foram identificadas nesse tratamento, a proteína gibberellin 20-oxidase (*spot* F155), já bem caracterizada por promover o desenvolvimento e germinação das sementes. Uma variedade de resultados, a partir de plantas de diferentes espécies, sugere que GA3 estimula genes que estão envolvidos, principalmente, no alongamento celular e na divisão celular (Zimmerman et al., 2010). Sua importância já foi descrita para o desenvolvimento de embriões somáticos de diversas espécies como *Daucus carota* (Mitsubishi, 2003), *Zea Mays* (Joshi et al., 2010) e *Cocos nucifera* (Montero-Córtés et al., 2010), que tiveram um incremento no desenvolvimento de embriões somáticos, quando se adicionou ácido giberélico ao meio de cultura MS. A cytokinin oxidase 2 (*spot* E155), também realizaram papel importante na regulação dos níveis de citocininas nas plantas (Bilyeu et al., 2001).

Spots A31, F194, E194, E167, F188, F128 e E142 foram identificados como relacionados à síntese e fosforilação de proteínas e, também, de lipídios; uma delas, as proteínas de transferência de lipídios inespecíficos, que são caracterizados pela sua capacidade de transferência de fosfolípidos entre as membranas e por se ligarem ácidos graxos *in vitro*, apresentam várias funções atribuídas a elas *in vivo*, incluindo transporte de compostos cuticulares (Sterk et al., 1991) e inibição do crescimento de agentes patogênicos bacterianos e fúngicos (García-Olmedo et al., 1995). Esses resultados indicam que o estresse hídrico pode ter sido favorável à reserva de proteínas e lipídeos. Durante a embriogênese, a proteína enoyl acp reductase (*spot* E194), também detectada, apenas, nesse tratamento, é sintetizada durante a biossíntese e deposição dos lipídios (Poghosyan et al., 2005).

Seis *spots* (E146, F146, F241, E182, F175, A69) têm função relacionada a respostas a estresse e defesa. A atividade de espécies reativas de oxigênio (ROS) é, muitas vezes, a primeira resposta detectável ao estresse biótico ou abiótico em plantas. Proteínas, como a catalase (*spot* E182), têm papel chave na modulação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Zhang et al.,

2009). Em estudos realizados com *Nicotiana tabaco*, a expressão de catalase foi correlacionada ao aumento na tolerância para ROS (Barna et al., 2008).

Alterações no estado da cromatina do gene, através da transcrição de processamento do DNA, a tradução do mRNA e modificações pós-traducionais, são responsáveis por regular o nível de expressão protéica para vários genes (Pierrat et al., 2007). Segundo esses autores, fatores de iniciação (eIF4A-15), *spot* F222, atuam na fosforilação de proteínas envolvidas na tradução, permitindo o acoplamento de proteínas de tradução e de outras funções celulares essenciais como a resposta ao estresse, crescimento e divisão celular.

A actina, proteína relacionada ao desenvolvimento do citoesqueleto, foi identificada no *spot* F200; de acordo com Ketelaar et al (2004), a organização, a divisão celular e o crescimento requerem o funcionamento normal dessa proteína.

Também foram identificadas proteínas relacionadas à via de pentose fosfato, que é conhecida por proporcionar nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), utilizado como doador de elétrons em reações biossintéticas redutivas, síntese de lípidos, aminoácidos aromáticos e coenzimas (Witzel et al., 2010). A síntese dessa proteína tem sido relacionada a estresse oxidativo e salino em várias espécies como arroz (Hou et al., 2007) e cevada (Witzel et al., 2010).

A maior parte das proteínas encontradas comuns aos dois tratamentos está relacionada ao metabolismo de carboidratos e processos relacionados à transcrição e tradução (Tabela 8), denotando grande atividade metabólica e organizacional dessas culturas. Proteínas como Argonauta 4 (*spot* B55) podem ter papel relevante na morfogênese das plantas já que atuam no silenciamento de genes. Da mesma forma, as enolases (*spot* A21), enzimas da via glicolítica, estariam desempenhando um papel importante na embriogênese somática de *Cyclamen persicum*, atuando, nesse caso, como proteínas de reserva (Rode et al., 2011).

Além desses processos, observaram-se proteínas relacionadas a funções importantes na morfogênese da planta, na síntese de lipídios, proteínas, aminoácidos e regulação hormonal; dentre essas, as proteínas DELLA (*spot* B15) têm função reconhecida na sinalização de giberelina; a degradação dessa proteína exerce papel importante na fase germinação e alongamento do embrião (Zhang et al., 2008).

Em suma, é possível observar que, em ambos os tratamentos, foi possível identificar a presença de proteínas importantes na morfogênese dos embriões somáticos; entretanto, o tratamento T2 apresentou uma gama maior de proteínas, que podem estar relacionadas à melhor resposta dessas células no desenvolvimento do embrião.

6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos em nosso trabalho, foi possível analisar a indução e maturação dos calos, quantificar carboidratos solúveis (frutose, glicose e sacarose), caracterizar o desenvolvimento anatômico de embriões somáticos de mamoeiro dos genótipos Golden e UC01, sendo este último utilizado na identificação e classificação das proteínas expressas durante a maturação dos calos, permitindo as seguintes conclusões:

- a. A adição de 20 μM de 2,4-D e a utilização de embriões zigóticos de frutos nos estádios 3 e 5 de maturação como fontes de explante proporcionaram uma melhor resposta no desenvolvimento de calos embriogênicos;
- b. Todos os tratamentos testados promoveram a maturação dos calos; entretanto, meio de cultura MS suplementado com 6% de PEG foi mais eficiente na maturação de culturas embriogênicas de mamoeiro, já que promoveu maior número de embriões/plântulas somáticas nos genótipos testados;
- c. Através da análise histomorfológica, identificou-se o desenvolvimento de células com características embriogênicas, regiões meristemáticas com células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso e núcleo evidente em processo de diferenciação, desde o estágio pró-embriogênico até o estágio cotiledonar; esse processo ocorreu em ambos os tratamentos, porém de forma mais rápida no tratamento T2.

- d. Com a quantificação de carboidratos durante a maturação, um maior conteúdo das hexoses foi encontrado nas culturas em todos os tratamentos, sendo as hexoses, frequentemente, relacionadas à divisão e à diferenciação celular. A sacarose, embora tenha sido encontrada em níveis menores, apresentou um aumento considerável aos sete dias de cultivo, indicando que esse pode ser um ponto chave na diferenciação de embriões somáticos de mamoeiro, já que, nesse ponto, houve grande aumento na transição de embriões globulares para os demais estádios. A sacarose tem sido relacionada ao alongamento celular e ao armazenamento de proteínas de reserva.
- e. Nas análises proteômicas, foi possível associar um padrão na expressão diferencial de proteínas com a capacidade de maturação de embriões somáticos em mamão (UC01). O tratamento T2 promoveu maior expressão de proteínas quando comparado às culturas mantidas no tratamento controle, apresentando maior expressão de proteínas relacionadas às vias metabólicas, processamento do material genético e regulação hormonal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, V.; Sardar, P.R. (2007) In vitro regeneration through somatic embryogenesis and organogenesis using cotyledons of *Cassia angustifolia* Vahl. *In Vitro Cell Developmental Biology-Plant*, 43: 585–592.
- Agriannual (2011) *Anuário da agricultura brasileira*, São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2011. p. 285-290.
- Ali, D.J.; Sharma, M.M.; Batra, A. (2011) Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Arachis hypogaea* L. (Leguminosae) Through Mature Embryo Derived Leaflet Culture *International Journal of Biotechnology*, 4(8): 637-643.
- Almeida, P.A. de.; Oliveira, R.P. de.; Dantas, J.L.L. (2000) Protocolo para a embriogênese somática do mamoeiro. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 35(10): 2017-2024.
- Almeida, J.A.S. (2007) Da folha à obtenção de embriões somáticos de *Coffea*. *O Agrônomo*, Campinas, 59(1): 63-64.
- Alves, F.L.; Pavoca, B.E.V.; Galveas, P.A.O. (2003) Seleção de plantas matrizes de mamão, grupo Solo, para produção de sementes. IN: Martins, D. S.; Costa, A. F. S. (Ed.). *A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção*. Vitória, p.105-114.

- Anandan, R.; Sudhakara, D.; Balasubramaniana, P.; Gutiérrez-Morab, A. (2012) *In vitro* somatic embryogenesis from suspension cultures of *Carica papaya* L. *Scientia Horticulturae*, 136: 43-49.
- Ashmore, S.E.; Drew, R.A. (2006) The Application of Biotechnology in an Integrated Project of Conservation and Utilization of Papaya and its Wild Relatives. *Acta Horticulturae*, 725: 89-94.
- Attree, S.M.; Fowke, L.C. (1993) Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 35: 1-35.
- Azad, M.A.K.; Rabani, R.G.; Amin, L. (2012) Plant Regeneration and Somatic Embryogenesis from Immature Embryos Derived through Interspecific Hybridization among Different *Carica* Species. *International Journal of Molecular Science*, 13: 17065-17076.
- Bai, Y.; Qu, R. (2001) Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue. *Plant Breeding*, 120: 239-242.
- Barna, B.; Smigocki, A.C.; Baker, J.C. (2008) Transgenic production of cytokinin suppresses bacterially induced hypersensitive response symptoms and increases antioxidative enzyme levels in *Nicotiana* spp. *Phytopathology*, 98: 1242–1247.
- Bewley, J.D.; Black, M. (1994) *Seeds: physiology of development and germination*. 2ed. New York: Plenum Press, 445p.
- Bhattacharya, J.; Khuspe, S. S.; Renukdas, N.N.; Rawal, S. K. (2003) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo explants of papaya cv. Washington and Honey Dew. *Indian Journal Experimental Biology* 40: 624-627.
- Bilyeu, K.D.; Cole, J.L.; Laskey, J.G.; Riekrof, W.R.; Esparza, T.J.; Kramer, M.D.; Morris, R.O. (2001) Molecular and Biochemical Characterization of a Cytokinin Oxidase from *Maize*. *Plant Physiology*, 125(1): 378-386.

- Binott, J.J.; Songa, J.M.; Ininda, J.; Njagi, E.M.; Machuka, J (2008) Plant regeneration from immature embryos of Kenyan maize inbred lines and their respective single cross hybrids through somatic embryogenesis. *African Journal of Biotechnology*, 7 (8): 981-987.
- Buendía-González, L.; Estrada-Zúñiga, M.E.; Orozco-Villafuerte, J.; Cruz-Sosa, F.; Vernon-Carter, E.J. (2012) Somatic embryogenesis of the heavy metal accumulator *Prosopis laevigata*. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 108: 287–296.
- Businge, E.; Bygdell, J.; Wingle, G.; Mortiz, T.; Egertsdotter, U. (2013) The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiologia Plantarum*, doi: 10.1111/ppl.12040.
- Cabral, A. A.; Pulido, H. G.; Garay, B. R.; Mora A. G. (2008) Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. *Scientia Horticulturae*, 118: 155-160.
- Campalans, A.; Pagès M.; Messeguer R. (2000) Protein analysis during almond embryo development. Identification and characterization of a late embryogenesis abundant protein. *Plant Physiology*, 38: 449-457.
- Cangahuala-Inocente, G.C.; Steiner, N.; Santos, M.; Guerra, M.P. (2004) Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 224: 33-40.
- Cangahuala-Inocente, G.C.; Steiner, N.; Maldonado, S.B.; Guerra, M.P. (2009) Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *Pesq. agropec. bras.*; 44(3): 217-224.
- Canhoto, J.M.; Lopes, M.L.; Cruz, G.S. (2005) Protocol of Somatic Embryogenesis: Tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.). *Forestry Sciences*, 77: 379-389.

- Canovas, F.M.; Dumas-Gaudot, E.; Recobert, G.; Jorin, J.; Mock, H.P.; Rossignol, M. (2004) Plant Proteome analysis. *Proteomics*, 4:285-298.
- Carmo, L.S.T.; Souza Jr, M.T. (2003) *Transformação Genética de Mamoeiro – 15 anos de sucesso*. 1 ed. Brasília, Embrapa-SPI / Embrapa-Cenargen, 23p.
- Carpentier, S.C.; Witter, E.; Laukens, K.; Deckers, P.; Swennen, R.; Panis, B. (2005) Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 5: 2497-2507.
- Castro, L.M.; Mourão Filho, F.A.A.; Mendes, B.M.J.; Miyata, L.Y. (2010) Embriogênese somática a partir de calos de cultivares de laranja doce. *Ciência Rural*, Santa Maria, 40(8):1831-1834.
- Cattaneo, L.F. (2003) Melhoramento Genético do Mamoeiro Assistido por Marcadores Moleculares. *Papaya Brasil*, Linhares – ES, p. 191-208.
- Chalupa, V. (1999) Somatic embryogenesis in linden (*Tilia* spp.). In Somatic embryogenesis in woody plants. In: S.M. Jain, P.K. Gupta & R.J. Newton, (eds.) *Kluwer Academic Publishers*. Dordrecht, p. 31-43.
- Chanprame, S.; KUO, T.M.; Widholm, J.M. (1998) Soluble carbohydrate content of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.: somatic and zygotic embryos during development. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 34:64-68.
- Chen, C.C., Wang, P. J.; 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.
- Clarindo, W.R.; Carvalho, C.R.; Araújo, F.S.; Abreu, I.S.; Otoni, W.C. (2008) Recovering polyploid papaya in vitro regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 92: 207-214.

- Cônsoli, L.; Gaziola, S.A.; Vieira, M.L.C. (1995) Plant transformation mediated by *Agrobacterium rhizogenes*: optimization of the infection process. *Revista Brasileira de Genética*, 18(1): 115-119.
- Cooke, T.J.; Racusen, R.H.; Cohen, J.D. (1993) The role of auxin in plant embryogenesis. *Plant Cell*, 5:1494–1499.
- Correia, S.; Canhoto, J.M. (2010) Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). *Protoplasma* 242:95–107
- Correia, S.; Cunha A.E.; Salgueiro, L.; Canhoto, J.M. (2012) Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): approaches to increase efficiency of embryo formation and plant development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109(1): 143-152.
- Costa, A.F.S.; Pavoca, B.E.V.; (2003) Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas de melhoramento genético do mameiro. In: MARTINS, D. S.; COSTA, A. F. S. (Ed.) *A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção*. Vitória, ES: Incaper, p. 58-102.
- Custódio, L.; Martins-Loução, M.A.; Romano, A. (2004) Influence of sugars on *in vitro* rooting and acclimatization of carob tree. *Biologia Plantarum*, 48: 469-472.
- Dangou, J.S.; Hocher, V.; Fèrriere, N.; Fulchere, C.; Morard, P.; Alemanno, L. (2002), Histological and biochemical characterization of *Theobroma cacao* L. endosperm during seed development. *Seed Science Research*, 12(2): 91-100.
- Devi, B.C.; Narmathabai, V. (2011) Somatic embryogenesis in the medicinal legume *Desmodium motorium* (Houtt.) Merr. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 106: 409–418.
- Dias, L.L.; Santa-Catarina, C.; Floh, E.I.S.; Silveira, V. (2007) Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 13: 2002-2008.

- Dias, N.L.P.; Oliveira, E.J.; Dantas, J.L.L. (2011) Avaliação de genótipos de mamoeiro com uso de descritores agronômicos e estimação de parâmetros genéticos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46:1471-1479.
- Donato, V.M.T.S.; Andrade, A.G. de.; Cabral, J.B.; Alves, G.D. (2000) Embriogênese somática in vitro em couve-comum. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 35(4):711-718.
- Drame, K.N.; Clavel, D.; Repelli, A.; Passaquet, C. (2007) Water deficit induces variation in expression of stress-responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars with different tolerance to drought. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 236-243.
- Drew, R.A.; Vogler, J.N.; Magdalita, P.M.; Mahon, R.E.; Persley, D.M. (1995) Application of biotechnology to *Carica papaya* and related species. In: M. Terzi, R. Cella and A. Falavigna (eds.) *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 321-326.
- Drew, R.A. (1997) The application of biotechnology to the conservation and improvement of tropical and subtropical fruit species. FAO, Rome p. 1–77
- Duditis, D.; Boogre, L.; Gyorgyey, J.C. (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro. *J Cell Sci*, 99: 475–484.
- El-Dawayati, M.M.; Abd EL Bar, O.H.; Zaid, Z.E.; Zein El Din, A.F.M. (2012) *In vitro* morpho-histological studies of newly developed embryos from abnormal malformed embryos of date palm cv. Gundila under desiccation effect of polyethylene glycol treatments, *Annals of Agricultural Science*, 57(2): 117–128.
- Fabi, J.P.; Cordenunsi, B.R.; Barreto, G.P.M.; Mercadante, A.Z.; Lajolo, F.M.; Nascimento, J.R.O. (2007) Papaya Fruit Ripening: Response to Ethylene and 1-Methylcyclopropene (1-MCP). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 6118-6123.

FAO, 2012. FAOEST. Suplemento disponível em <http://www.faostat.org.br>. Acesso em 03 mar 2012.

Feria, M.de, Jimenéz, E.; Barbón, R.; Capote, A.; Chávez, M.; Quiala, E. (2003) Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(1): 1-6.

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.

Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, p. 220.

Filippov, M.; Miroshnichenko, D.; Vernikovskaya, D.; Dolgov, S. (2006) The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84: 213–222.

Filson, P.B.; Dawson-Andoh, B.E. (2009) Characterization of sugar from model and enzyme-mediated pulp hydrolyzates using high-performance liquid chromatography coupled to evaporative light scattering detection. *Bioresource Technology*, 100: 6661-6664.

Finkelstien, R.; Crouch, M. (1986) Rapeseed development in culture on high osmoticum is similar to that in seed. *Plant Physiology*. 81: 907–912.

Fischer, W.; Bergfled, R.; Schopfer, P. (1987) Induction of storage protein synthesis in embryos of mature plant seeds. *Naturwissenschaften*, 74: 86–88.

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

- Fitch, M.M.M. (1993) High-frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32: 205-212.
- Foster, L.J.; Hoog, C.L. de.; Zhang, Y.L.; Zhang, Y.; Xie, X.; Mootha, V.; Mann, M. (2006) A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell*, Philadelphia, 125(1):187-199.
- Francisco, M.G.S.; Maruyama, W.I.; Mendonça, V.; Silva, E.A.; et al. (2010) Substratos e recipientes na produção de mudas de mamoeiro 'Sunrise Solo'. *Agrarian*, Dourados, 3(9): 267-274.
- Farzana, A.R.F.; Palkadapala, P.G.V.N.; Meddegoda, K.M.M.N.; Samarajeewa, P.K.; Eeswara, J.P.; (2008) Somatic embryogenesis in papaya (*Carica papaya* L. cv. Rathna). *Jornal National Scienc Foundation Sri Lanka*, 36(1): 41:50.
- Gaj, M.D.; Trojanowska, A.; Ujezac, A.; Medrek, M.; Koziol, A.; Garbaciak, B. (2006) Hormone-response mutants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Impaired in somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* 49:183-197.
- García-Olmedo, F.; Molina, A.; Segura, A.; Moreno, M. (1995) The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology*, 3(2): 72–74
- Garello, G.; Barthe, P.; Bonelli, M.; Bianco-Trinchant, J.; Bianco, J. (2000) Page-Degivry ML. Abscisic acid-regulated responses of dormant and non-dormant embryos of *Helianthus annuus*: role of ABA-inducible proteins. *Plant Physiol. Bioch.* 38:473-482.
- Garret, R. E. (1993) Encapsulation machinery. In: REDENBAUGH K. (Ed.). *Synseeds: applications of synthetic seeds to crop improvement*. Boca Raton: CRC Press, p. 203-214.
- Godoy, L.M.F. de.; Olsen, J.V.; Souza, G.A. de.; Li, G. Q. (2006) Mortensen, P.; Mann, M. Status of complete proteome analysis by mass spectrometry: SILAC labeled yeast as a model system. *Genome Biology*, London, 7(6):50.

- Gubišová, M.; Mihálik, D.; Gubiš, J. (2012) Optimization of Barley Mature Embryo Regeneration and Comparison with Immature Embryos of Local Cultivars. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 11(1): 57–62, 2012.
- Guerra, M.P.; Torres, A.C.; Teixeira, J.B. (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. 2. ed. Brasília: Embrapa, p. 533-568.
- Guerra, M.P.; Silveira, V.; Santos, A.L. W.; Astarita, L.V.; Nodari, R.O. (2000) Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. *In-Somatic embryogenesis in woody plants*, eds. S. Jain, P. Gupta & R. Newton. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 6: 457-478.
- Guerra, M.P.; Dal Vesco, L.L.; Ducroquet, J.P.H.J.; Nodari, R.O.; Reis, M.S. dos. (2001) Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13: 117-128.
- Gupta, R. B.; Khan, K.; MacRitchie, F. (1993) Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein. *Journal of Cereal Science*. 18:23-41.
- Gutiérrez-Miceli, F.A.; Rodríguez-Mendiola, M.A.; Ochoa-Alejo, N.; Méndez-Salas, R.; Arias-Castro, C.; Dendooven, L. (2005) Sucrose accumulation and enzyme activities in callus culture of sugarcane. *Biologia Plantarum*, 49:475-479.
- Hadfi, K.; Speth, V.; Neuhaus, G. (1998) Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Germany Development*, 125: 879-887.
- Hill, L.M.; Morley-Smith, E.R.; Rawsthorne, S. (2003) Metabolism of sugars in the endosperm of developing seeds of oilseed rape. *Plant Physiology*, 131: 228–236.
- Hinojosa, R.L.; Montgomery, M.W. (1988) Industrialização do mamão. Aspectos bioquímicos e tecnológicos da produção de purê asséptico. In: Ruggiero, C. (ed.) *Mamão*, Jaboticabal, p. 89-110.

- Hiraga, S.; Minakawa, H.; Takahashi, K.; Takahashi, R.; Hajika, M.; Harada, K.; Ohtsubo, N. (2007) Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of Japanese soybean cultivars. *Plant Biotechnology*, 24: 435–440.
- Hoekstra, F.A.; Golovina, E.A. (1999) Membrane behavior during dehydration: implication for desiccation tolerance. *Russian Journal of Plant Physiology*, 46:295-306.
- Hou, F.Y.; Huang J.; Yu, S.L. & Zhang, H.S. (2007) The 6-phosphogluconate dehydrogenase genes are responsive to abiotic stresses in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49: 655–663.
- Hussain, S.S.; Rao, A.Q.; Husnain, T.; Riazuddin, S. (2009) Cotton somatic embryo morphology affects its conversion to plant. *Biologia Plantarum*, 53 (2): 307-311.
- IBGE, suplemento disponível em <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em 06 fev. 2012.
- Ikeda, Y.; Banno, H.; Niu, Q-W.; Howell, S.H.; Chua, N-H. (2006) The enhancer of shoot regeneration 2 gene in *arabidopsis* regulates cup-shaped cotyledon 1 at the transcriptional level and controls cotyledon development. *Plant Cell Physiology*, 47(11): 1443–1456.
- Imin, N.; Nizamidin, M.; Daniher, D.; Nolan, K.E.; Rose, R.J.; Rolfe, B.G. (2005) Proteomic Analysis of Somatic Embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant Cultures Grown under 6-Benzylaminopurine and 1-Naphthaleneacetic Acid Treatments. *Plant Physiology*, 137: 1250–1260.
- Incapér. Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Assistência Rural. Disponível em: www.incapér.es.gov.br Acessado em: 06/03/2012.
- Iraqi, D.; Tremblay, F.M. (2001) The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Physiologia Plantarum*, 111(3): 381–388.

- Jorrín, J.V.; Rubiales, D.; Dumas-Gaudot, E.; Recobert, G.; et al. (2006) Proteomics: a promising approach to study biotic interaction in legumes. *A review. Euphytica*, 147: 37–47
- Jorrín-Novo, J.; Maldonado, A.; Echevarría-Zomeño, S.; Valledor, L.; Castillejo, M.; Curto, M. (2009) Plant proteomics update (2007-2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *Proteomics Journal*, 72:285-314.
- Joshi, R.; Shukla, A.; Kumar, P. (2010) Interactive effect of GA3 and polyamines on in vitro somatic embryogenesis from immature embryos in maize (*Zea mays* L.). *Maydica*, 55: 111-119.
- Kärkönen, A. (2000) Anatomical study of zygotic and somatic embryos of *Tilia ordata*. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 61: 205–214
- Kermode, A.R. (1995) Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interaction between the embryo and seed environment. In G Galili, J Kigel, eds, *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker Inc, New York, pp 273–332.
- Ketelaar, T.; Allwood, E.G.; Anthony, R.; Voigt, B. (2004) The Actin-Interacting Protein AIP1 Is Essential for Actin Organization and Plant Development. *Current Biology*, 14: 145-14.
- Klimaszewska, K.; Smith, D. (1997) Maturation of somatic embryos of *Pinus strobes* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiologia Plant*, 100:949-957.
- Klimaszewska, K.; Morency, F.; Jones-Overton, C.; Cooke, J. (2004) Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobes* and in somatic embryos from different maturation treatments. *Physiologia Plant*, 121: 682-690.

- Koehler, A.D. (2004) Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC, AVG e STS e de pulsos de 2,4-D. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa.
- Korbes, A.P.; Droste, A. (2005) Carbon sources and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 211–216.
- Kosova, K.; Vítámvás, P.; Prášil, I.T.; Renaut, J. (2011) Planta mudanças proteoma sob estresse abiótico - Contribuição dos estudos de proteômica para a compreensão de resposta ao estresse de plantas. *Saúde e Ambiente em Revista*, 2(2): 01-10.
- Lai, C. C.; Yeh, S. D.; Yang, J. S. (2000) Enhancement of papaya axillary shoot proliferation *in vitro* by controlling the available ethylene. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 41: 203-212.
- Lakshmanan, P.; Geijskes, R.J.; Aitken, K.S.; Grof, C.L.P.; Bonnett, G.D. (2005) Smith, G.R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, 41: 345–363.
- Lameira, A.O.; Pinto, J.E.B.P.; Arrigoni-Blank, M.F.; Cardoso, M.G. (1997) Efeito de compostos fenólicos, carvão ativado e do meio físico no desenvolvimento de segmento nodal de *Cordia verbenacea* L. *Ciência Rural*, 27(2):189-192.
- Langhansová, L.; Konrádová, H.; Vaněk, T. (2004) Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 22(10): 725-730.
- Ledo, A.S.; Lameira, O.A.; Benbadis, A.K. (2002) Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24(3): 604-607.

- Li, W.; Liu, H.; Cheng, Z.J.; et al (2011) DNA Methylation and Histone Modifications Regulate De Novo Shoot Regeneration in Arabidopsis by Modulating WUSCHEL Expression and Auxin Signaling. *PLoS Genetics*, 7:e1002243.
- Li, J.; Jiang, J.; Quian, Q.; Xu, Y.; Xiao, J.; Du, C.; Zou, G. (2011) Mutation of Rice BC12/GDD1, Which Encodes a Kinesin-Like Protein That Binds to a GA Biosynthesis Gene Promoter, Leads to Dwarfism with Impaired Cell Elongation. *The Plant Cell*, 23(2): 628-640.
- Li, J.; Xu, Y.; Chong, K. (2012) The novel functions of kinesin motor proteins in plants. *Protoplasma*, 249(2): 95-100.
- Linossier, L.; Veisseire, P.; Vailloux, F.; Coudret, A. (1997) Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. *Plant Science*, 124: 183-191.
- Litz, R.E.; Conover, R.A. (1980) Somatic embryogenesis in cell cultures of *Carica stipulata*. *Horticulturae Science*, 15:733-734.
- Litz, R.E.; Conover, R.A. (1981) Effect of sex type, season and other factors on *in vitro* establishment and culture of *Carica papaya* L. explants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106: 792-794.
- Litz, R. E.; Conover, R. A. (1982) *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carica papaya* L. ovular callus. *Plant Science. Letters*, 26: 153-158.
- Litz, R.E.; Conover, R.A. (1983) High-frequency somatic embryogenesis from *Carica* suspension cultures. *Annals of Botany*, 51: 683-686.
- Liu, C.-M.; Xu, Z.-H.; Chua, N.-H. (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell*, 5: 621-630.

- Lou, H.; Obaraokeyo, P.; Tamaki, M.; Kako, S. (1996) Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explants. *Journal of Horticultural Science*, 71:497-502.
- Luciani, G.F.; Mary, A.K.; Pellegrini, C.; Curvetto, N.R. (2006) Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, 87: 39-143.
- Márquez-Martín, B.; Sesmero, R.; Quesada, M.A.; Pliego-Alfaro, F.; Sánchez-Romero, C. (2011) Water relations in culture media influence maturation of avocado somatic embryos. *Journal of Plant Physiology*, 168: 2028–2034.
- Martin, A.B.; Cuadrado, Y.; Guerra, H.; Gallego, P.; Hita, O.; Martin, L.; Dorado, A.; Villalobos, N. (2000) Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Science*, 154: 143-151.
- Martin, K.P.; Beegum, A.S.; Zhang, C.-L.; Slater, A.; Madhusoodanan, P.V. (2007) *In vitro* propagation of *Ophiorrhiza prostrata* through somatic embryogenesis. *Biologia Plantarum*, 51:769-772.
- Martins, D.S. (2003) Situação atual da produção integrada de mamão no Brasil. In: Martins, D. dos. S. *Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno*. Vitória, ES: Incaper, cap. 7, p. 95-128.
- Matsumoto, T.; Webb, D.; Kuehnle, A. (1996) Histology and origin of somatic embryos derived from *Anthurium andreaeanum* Linden ex Andre lamina. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121:404-407.
- Máthé, C.; Mosolygó, Á, Surány, G.; Beke, A. (2012) Genotype and explant-type dependent morphogenesis and silicon response of common reed (*Phragmites australis*) tissue cultures. *Aquatic Botany*, 97: 57-63.

- Mengarda, L.H.G.; Pescador, R.; Chu, E.P.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. (2009) Efeito do frio sobre os carboidratos solúveis em culturas embriogênicas de *Acca sellowiana* O. Berg (Myrtaceae). *Revista Brasil. Bot.* 32(2): 307-317.
- Ming, R.; Hou, S.; Feng, Y.; Yu, Q.; Dionne-Laporte, A.; et al. (2008) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya *Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452: 991-996.
- Mishra, M.; Shukla, N.; Chandra, R. (2010) Role of Polyethylene Glycol in Maturation and Germination of Transformed Somatic Embryos of Papaya (*Carica papaya* L.). *Acta Horticulturae*, 851.
- Mishra, S.; Sanyal, I.; Amla, D.V.; (2012) Changes in protein pattern during different developmental stages of somatic embryos in chickpea. *Biologia Plantarum*, 56(4): 613-619.
- Mitsuhashi, W.; Toyomasu, T.; Masui, H.; Katho, T.; Nakaminami, K.; Kashiwagi, Y. (2003) Gibberellin is Essentially Required for Carrot (*Daucus carota* L.) Somatic Embryogenesis: Dynamic Regulation of Gibberellin 3-Oxidase Gene Expressions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(11): 2438-2447.
- Moghaieb, R.E.A.; Youssef, S.S.; Mohammed, E.H.K.; Draz, A.El-S.E. (2009) Genotype Dependent Somatic Embryogenesis from Egyptian Rice Mature Zygotic Embryos, *Australian Journal of Basic & Applied Sciences*, 3(3): 2570.
- Montero-Córtés, M.; Sáenz, L.; Córdova, I.; Quiroz, A.; Verdeil, J.L.; Oropeza, C. (2010) GA3 stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.) *Plant Cell Reports*, (2010) 29: 1049–1059.
- Moose, S.P.; Mumm, R.H. (2008) Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. *Plant Physiology*, 147: 969–977.

- Mortiz, A.; Degenhardt, J.; Dutra, L.F.; Hansel, F.A.; Lima, B.H. de.; Franceschi, C.R.B.; Franciscon, L. (2009). Estabelecimento de *Ocotea odorifera*, *O. Catharinensis* e *O. porosa*. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 59:37-44.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Murín, R.; Mészáros, K.; Nemeček, P.; Kuna, R.; Faragó, J. (2012) Regeneration of immature and mature embryos from diverse sets of wheat genotypes using media containing different auxins. *Acta Agronomica Hungarica*, 60(2): 97-108.
- Nieves, N.; Segura-Nieto, M.; Blanco, M.A.; Sanchez, M.; González, A.; González, J.L.; Castillo, R. (2003) Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*, 39:343-345.
- OGTR (2003). Risk Assessment and Risk Management Plan: DIR 026/2002: Field Trial for Evaluation of GM Papaya to Delay Fruit Ripening and to Test the Expression of the Introduced Genes. Document produced by the Office of the Gene Technology Regulator, Canberra, Australia, available online at <http://www.ogtr.gov.au/ir/dir026.htm>,
- Oliveira, A.M.G.; Farias, A.R.N.; Santos Filho, H.P.; et al. (1994) *Mamão para exportação: aspectos técnicos da produção*. Brasília: Embrapa, 52p. (Série Publicações Técnicas FRUTEX; 9).
- Oliveira, R.P.; Dantas, J.L.L.; Almeida, E.P.; Nickel, O.; Vilarinhos, A.D.; Morales, C.F.G. (1996) Uso da biotecnologia no melhoramento genético e propagação do mamoeiro. In: Mendes, L.G.; Dantas, J.L.L.; Morales, C.F.G. (Ed.). *Mamão no Brasil*. Cruz das Almas : UFBA/Embrapa-CNPMF. 179p.
- Padilla-Chacón, D.; Cordoba, E.; Oliveira, T.; Sánchez, S.; Coello, P.; León, P.; Tiessen, A.; Martínez-Baranjas, E. (2010) Heterologous expression of yeast Hxt2

- in *Arabidopsis thaliana* alters sugar uptake, carbon metabolism and gene expression leading to glucose tolerance of germinating seedlings. *Plant Molecular Biology*, 72: 631–641.
- Pan Z.; Guan R.; Zhu S.; Deng X. (2009) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck), *Plant Cell Rep.* 28: 281–289.
- Park, O.K. (2004) Proteomic Studies in Plants. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37(1): 133-138.
- Park, I.S.; Koiso, M.; Morimoto, S.; Kubo, T.; Jin, H.O, Funada, R. (2012) Plant regeneration by somatic embryogenesis from mature seeds of *Magnolia obovata*. *Journal of Wood Science*, 58(1): 64-68.
- Pasternak, T.P.; Prinsen, E.; Ayaydin F.; Miskolczi, P.; Potters, G.; Asard, H.; Van Onckelen, H.A.; Dudits, D.; Fehér, A. (2002). The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology*, 129: 1807-1819.
- Perreira, M.G.; Lee, M.; Bramel-Cox, P.; Woodman, W.; Doebley, W. (1994) Construction of an RFLP map in shorgum and comparative mapping in maize. *Genome*, 37: 236-243.
- Pereira, M.G.; Lee, M. (1995) Identification of genomic regions affecting plant height in *sorghum* and *maize*. *Theor. Appl. Genet.* 90: 380-388.
- Perera, P.I.P.; Hocher, V.; Verdeil, J.L.; Bandupriya, H.D.D.; Yakandawala, D.M.D.; Weerakoon, L.K. (2008) Androgenic potential in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 92:293–302.
- Pescador, R.; Kerbauy, G.B.; Kraus, J.E.; Ferreira, W.M.; Guerra, M.P.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.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): 289-299.
- Pierrat, O.; Mikitova, V.; Bush, M.S.; Browning, K.S.; Doonan, J.H. (2007) Control of protein translation by phosphorylation of the mRNA 5'-cap-binding complex. *Biochemical Society Transactions*, 35: 1634–1647.
- Pinto, D.L.P.; Almeida, A.M.R de, Rêgo, M.M.; Silva, M.L.S. da, Oliveira, E.J. de, Otoni, W.C. (2011) Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 107: 521–530.
- Poghosyan, Z.P.; Giannoulia, K.; Katinakis, P.; Murphy, D.J.; Hatzopoulos, P. (2005) Temporal and transient expression of olive enoyl-ACP reductase gene during flower and fruit development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(1): 37–44
- Pommer, C.V.; Barbosa, W. (2009) The impact of breeding on fruit production in warm climates of Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(2): 612-634.
- Rai, M.K.; Jaiswal, V.S.; Jaiswal, U.; (2009) Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Scientia Horticulturae*, 121(2): 233–236.
- Rajeevan, M.S.; Pandey, R.M. (1986) Economics of mass propagation of papaya through tissue culture. In: Withers, L.A.; Anderson, P.G. (Ed.). *Plant tissue culture and its agricultural applications*. London : Butterworths, p.211-215.
- Reuveni, O.; Shlesinger, D. R.; Lavi, U. (1990) In vitro clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*. 20: 41-46.
- Rode, C.; Gallien, S.; Heitz, D.; Dorsselaer, A.V.; Braun, H.P.; Winkelmann, T. (2011) Enolases: storage compounds in seeds? Evidence from a proteomic comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen Persicum* Mill. *Plant Mol Biol* (2011) 75: 305–319.

- Rode, C.; Lindhordt, K.; Brauns, H.P.; Winkelmann, T.; (2012) From callus to embryo: a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum*, 235(5): 995-1011.
- Salajova, T.; Salaj, J.; Kormutak, A.; (1999) Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. *Plant Science*. 145(1):34-40.
- Sallandrouze, A.; Faurobert, M.; Maâtaoui, M.E. (2002) Characterization of the development stages of cypress zygotic embryos by two-dimensional electrophoresis and by cytochemistry. *Physiologia Plantarum*, Edinburgh, 114: 608-618.
- Sánchez-Romero, C.; Perán-Quesada, R.; Barceló- Muñoz.; Pliego-Alfaro, F. (2002) Variations in storage protein and carbohydrate levels during development of avocado zygotic embryos. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(12): 1043-49.
- Santa-Catarina, C.; Maciel, S.C.; Pedrotti, E.L. (2001) Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.). *Revista Brasileira de Botânica*, 24(4): 501-510.
- Santa-Catarina, C.; Oliveira, R.R.; Cutri, L.; Floh, E.I.S.; Dornelas, M.C. (2012) WUSCHEL-related genes are expressed during somatic embryogenesis of the basal angiosperm *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). 26(2): 493-501.
- Santos, K.G.B.D.; Mariath, J.E.D.A.; Moco, M.C.C.; Zanettini, M.H.B. (2006) Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]: Ontogeny of somatic embryos. *Brasil Archives Biol Technol*, 49: 49–55.
- Schmidt, E.D.L.; Guzzo, F.; Toonen, M.A.J.; De Vries, S.C. (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 124: 2049–2062.

- Schmildt, E.R.; Teixeira, S.L.; Schmildt, (2005) O. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* do mamoeiro 'Sunrise Solo Line 72/12' e 'Tainung 01'. In: Martins, D. dos S. (ed.) *Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão*. Vitória, ES: INCAPER, p. 221-224.
- Seo, M.; Hanada, A.; Kuwahara, A.; Endo, A.; Okamoto, M.; Yamauchi, Y.; North, H.; Marion-Poll, A; Sun, T. (2006) Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *The Plant Journal*, 48, 354–366.
- Shoji, M.; Sato, H.; Nakagawa, R.; Funada, R.; Kubo, T.; Ogita, S. (2006) Influence of osmotic pressure on somatic embryo maturation in *Pinus densiflora*. *Journal of Forest Research*, 11: 449-453.
- Silva, M.L. da, Pinto, D.L.P.; Guerra, M.P.; Floh, E.I.S.; Bruckner, C.H.; Otoni, W.C. (2009) A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 99(1): 47-54.
- Silveira, V.; Santa-Catarina C.; Balbuena, T.S.; Moraes, F.M.S., Ricart, C.A.O., Sousa, M.V., Guerra, M.P., Handro, W., Floh, E.S.I.S. (2008) Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 52: 101-104.
- Silveira, V.; Dias, L.L.C.; Balbuena, T.S.; Chiquieri, T.B.; Santa-Catarina, C.; Floh, E.I.S. (2011) *Proteômica aplicada ao melhoramento de plantas*. In: Deisy Lúcia Cardoso; Lucas Nunes da Cruz; Telma Nair Santana Pereira. (Org.). Estratégias em melhoramento de plantas. Viçosa - MG: Arka Editora, p. 55-65.
- SivaKumar, P.; Gnanam, R.; Ramakrishnan, R.; Manickam, A. (2010) Somatic embryogenesis and regeneration of *Vigna radiata* L.; *Biologia Plantarum*. 54: 245-251.

- Souza, S.A.M. (2007) Mamão no Brasil: distribuição regional da produção e comportamento dos preços no período 1996-2005. *Informações Econômicas*, São Paulo; 37(9):24-32.
- Stasolla, C.; Yeung, E.C. (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tissue and Organ and Cultures*. 74:15–35.
- Stasolla, C.; Zil, L.; Egertsdotter, U.; Craig, D., Liu, W.; Sederoff, R.R. (2003) The Effects of Polyethylene Glycol on Gene Expression of Developing White Spruce Somatic Embryos. *Plant Physiology*, 131(1): 49-60.
- Steiner, N.; Santa-Catarina, C.; Andrade, J.B.R.; Balbuena, T.S.; Guerra, M.P.; Handro, W.; Floh, E.S.I.S.; Silveira, V. (2008) *Araucaria angustifolia* Biotechnology - Review. *Functional Plant Science*. Biotech. 2: 20-28.
- Sturm, A.; Tang, G.Q. (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning . *Trends in Plant Science*, 4(10): 401-407.
- Sun, D-Q.; Lu, X-H.; Liang, G-L.; Guo, Q-G.; Mo, Y-W.; Xie, J-H. (2011) Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(1): 23-29.
- Suksa-Ard, P.; Kataoka, I.; Fujime, Y.; Subhadrabadhu, S. (1999) Requirement of 2,4-D and Sucrose for Somatic Embryogenesis of Papaya. *Jpn J Trop Agr*, 43(1): 1-4.
- Sterk, P.; Booij, H.; Schellekens, G.A.; Van Kammen, A.; De Vries, S.C. (1991). Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3, 907-921.
- Tautorus, T.E.; Fowke, L.C.; Dunstan, D.I. (1991) Somatic embryogenesis in conifers, *Canadian Journal of Botany*, 69: 1873-1899.

- Thomas, C.; Bronner, R.; Molinier, J.; Prinsen, E.; van Onckelen, H.; Hahne, G. (2002) Immuno-cytochemical localization of indole-3-acetic acid during induction of somatic embryogenesis in cultured sunflower embryos. *Planta*, 215: 577-583.
- Troch, V.; Werbrouck, S.; Geelen, D.; Van Labeke, M.C. (2009) Optimization of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryo conversion. *Plant Cell Tissue and Organ and Cultures*. 98, 115–123.
- 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*, 98: 157-164.
- Wang, W.X.; Vinocur, B.; Shoseyov, O.; Altman, A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Science*, 9: 245–252.
- Wang, J.; Weng, Z.; Cheng, C.-L.; Liu, H.; Liang, W.; Jiang, J.; Chen, W. (2010) Identification and analysis of differentially expressed proteins during cotyledon embryo stage in longan. *Scientia Horticulturae*, 126(4): 426–433.
- Wang, Q-M.; Wang, L. (2012) An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant Cell Reports*, 31: 1535–1547.
- Weschke, W.; Panitz, R.; Gubatz, S.; Wang, Q.; Radchuk, R.; Weber, H.; Wobus, U. (2003) The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant Journal*, 33: 395-411.
- Winkelmann, T.; Heintz D.; Van Dorsselaer, A.; Serek, M.; Braun, H.P. (2006) Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta*, 224: 508–519.
- Wise, M.J.; Tunnacliffe, A. (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? *trends Plant Science*, 9: 13–17.

- Witzel, K.; Weidner, A.; Surabhi, G-H.; Varshney, G.K. (2010) Comparative analysis of the grain proteome fraction in barley genotypes with contrasting salinity tolerance during germination. *Plant, Cell and Environment*, 33: 211–222.
- Xu, S.B.; Li, T.; Deng, Z.Y.; Chong, K.; Xue, Y.; Wang, T. (2008) Dynamic Proteomic Analysis Reveals a Switch between Central Carbon Metabolism and Alcoholic Fermentation in Rice Filling Grains. *Plant Physiology*, 148(2): 908-925.
- Yang, X.; Zhang, X. (2010) Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29: 1, 36-57.
- Yu, T. A.; Yeh, S. D.; Yang, J. S. (2003) Comparison of effects of kanamycin and geneticin on regeneration of papaya from root tissue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 169-178.
- Zhang, Y.X.; Lespinasse, Y. (1991) Removal of embryonic dormancy in apple (*Malus domestica* Borkh.) by 6-benzylaminopurine. *Scientia Horticulturae, Amsterdam*, 46: 215-223.
- Zhang, X.; Wu, Z.; Huang, C. (2008) Effects of gibberellin mutations on in vitro shoot bud regeneration of *Arabidopsis*. *African Journal of Biotechnology*, 7(22):. 4159-4163.
- 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: 103–113.
- Zhang, M.; Zhang, B.; Quian, Q.; Yu, Y.; Li, R.; Zhang, J.; Liu, X.; Zeng, D. (2010) Brittle Culm 12, a dual-targeting kinesin-4 protein, controls cell-cycle progression and wall properties in rice. *The Plant Journal*, 63(2): 312–328.
- Zhang, Q.; Hu, H.; Lin, H.; Huang, Y.; Yuan, J.; Xu, H.; Han, K.; Huang, J.; Huang, L. (2011) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature Hickory

(*Carya Cathayensis Sarg.*) Embryos. *Propagation of Ornamental Plants*, 11(3): 137-143.

Zimmerman, J.L. (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, 5: 1411-1423.