

Efeitos da qualidade da luz na maturação de embriões somáticos de mamoeiro e na regulação diferencial de proteínas associadas à morfogênese *in vitro*.

FELIPE ASTOLPHO DE ALMEIDA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

– UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

NOVEMBRO/2016

Efeitos da qualidade da luz na maturação de embriões somáticos de mamoeiro e na regulação diferencial de proteínas associadas à morfogênese *in vitro*.

FELIPE ASTOLPHO DE ALMEIDA

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia”

ORIENTADOR: PROF. DR. VANILDO SILVEIRA

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

NOVEMBRO/2016

Efeitos da qualidade da luz na maturação de embriões somáticos de mamoeiro e na regulação diferencial de proteínas associadas à morfogênese *in vitro*.

FELIPE ASTOLPHO DE ALMEIDA

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia”

Aprovado em 29 de novembro de 2016.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Marco Antonio Lopes Cruz (UFRJ)

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

Prof^a. Dr^a. Clicia Grativol Gaspar de Matos – (UENF)

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

SUMÁRIO

1. RESUMO	3
2. ABSTRACT.....	4
3. INTRODUÇÃO.....	5
3.1. Aspectos gerais	5
3.2. Embriogênese somática	6
3.3. Lâmpadas LED (Light emitting diodes) na cultura in vitro	10
3.4. Proteômica na embriogênese somática	12
4. OBJETIVOS.....	15
4.1. Objetivo geral.....	15
4.2. Objetivos específicos	15
5. MATERIAIS E MÉTODOS	15
5.1. Material vegetal e indução das culturas.....	15
5.2. Maturação das culturas embriogênicas	16
5.3. Análises proteômicas	17
5.3.1. Extração de proteínas.....	17
5.3.2. Digestão proteica.....	17
5.3.3. Análises por espectrometria de massas	18
5.3.4. Análise dos dados	19
6. RESULTADOS	19
6.1. Qualidade da luz na produção de embriões cotiledonares.....	19
6.2. Análise proteômica durante a maturação dos embriões somáticos.....	23
7. DISCUSSÃO.....	30
7.1. Efeitos da qualidade da luz na maturação de embriões somáticos:	30
7.2 Análise proteômica comparativa	32
7.2.2 Proteínas atuantes nos processos de desenvolvimento:	32
7.2.3. Metabolismo energético:	43
7.2.4. Respostas à estresses:	46
7.2.5. Metabolismo de proteínas:	49
7.2.6. Metabolismo de carboidratos:.....	51

8. CONCLUSÕES.....	52
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
10. ANEXO 1.....	72

1. RESUMO

A embriogênese somática é uma ferramenta biotecnológica com alto potencial de aplicação na propagação clonal de genótipos elite de mamoeiro (*Carica papaya* L.). Neste contexto, o efeito de estímulos externos, como a qualidade da luz, vem sendo estudados como fatores de modulação nas respostas morfogênicas *in vitro* durante a embriogênese somática. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo analisar a influência da qualidade da luz, usando diferente tipos de lâmpadas LED, na maturação dos embriões somáticos e no perfil proteômico das culturas embriogênicas. Análises proteômicas *label-free* foram conduzidas visando a compreensão dos mecanismos associados a capacidade embriogênica e desenvolvimento dos embriões somáticos, assim como alterações bioquímicas, moleculares e a dinâmica das proteínas envolvidas na ativação das rotas fotomorfogênicas. Calos embriogênicos foram submetidos a maturação sob diferentes combinações de lâmpadas LED. Ao final de 28 dias de cultivo, o tratamento W_mB (luz branca e azul médio - 450/550 nm) foi o de melhor resposta durante a maturação, produzindo 82 embriões somáticos cotiledonares, enquanto o controle (fluorescente) 48 embriões. A análise proteômica comparativa entre os tratamentos W_mB e o controle permitiu a identificação de 50 proteínas diferencialmente abundantes, sendo 37 up-reguladas e 13 down-reguladas no tratamento W_mB. Dentre essas, destacam-se proteínas que vêm demonstrando ter papel crucial na progressão da embriogênese somática: responsivas à estresses (Endochitinase e Hevein-like), relacionadas a defesa (Peroxirredoxina), metabolismo energético (Triose-fosfato isomerase, Isocitrato desidrogenase e ATP-sintase), transdução de sinais (Ras e Rho GTPases), divisão celular (CDC48) e metabolismo hormonal (IAA-amido sintetase). Esses resultados demonstram que a qualidade da luz afeta significativamente a maturação de embriões somáticos do mamoeiro, assim como promovem uma regulação diferencial na abundância de proteínas associadas à morfogênese *in vitro*.

2. ABSTRACT

Somatic embryogenesis is a biotechnological tool with high potential for the clonal propagation of elite genotypes of papaya (*Carica papaya* L.). In this context, the effect of external stimuli, such as light quality, has been studied as factors in the modulation morphogenetic responses in vitro during somatic embryogenesis. Therefore, this study aimed to analyze the influence of light quality by using different combinations of LED lamps, in the maturation response and in proteomic profile of somatic embryos. Label-free proteomics were performed aiming at understand the mechanisms associated with the embryogenic capacity and development of somatic embryos, as well as biochemical alterations, molecular and dynamics of the proteins involved in the activation of the photomorphogenetic routes. Different light quality treatments were applied in embryogenic callus. After 28 days of cultivation, the combination of wavelengths W_mB (white plus medium blue - 450/550 nm) produced 82 viable cotyledonary somatic embryos, whereas the control (fluorescent) 48 embryos. Comparative proteomics were conducted to the W_mB treatment and control (fluorescent lamp) at 14 days of culture. It was observed a total of 37 proteins up-regulated in W_mB treatment. Among these, they highlight proteins that have shown to play a crucial role in the progression of somatic embryogenesis: responsive to stress (Endochitinase and Hevein-like), related to defense (Peroxiredoxin), energy metabolism (triosephosphate isomerase, isocitrate dehydrogenase and ATP synthase), signal transduction (Ras and Rho GTPases), cell division (CDC48) and hormonal metabolism (IAA synthetase starch). These results demonstrate that the quality of light affects significantly the maturation of somatic embryos of papaya, as well as promote a differential regulation in the abundance of proteins associated with in vitro morphogenesis.

3. INTRODUÇÃO

3.1. Aspectos gerais

O mamoeiro, é uma fruteira perene, pertencente à família Caricaceae (Bremer et al., 2009) encontrado em regiões tropicais e subtropicais no mundo (da Silva et al., 2007). O fruto é principalmente consumido in natura e possui alto valor nutricional, além de apresentar propriedades medicinais e aplicações industriais (Zhang et al., 2011). De acordo com dados da Organização das Nações Unidas dos Alimentos e Agricultura, o Brasil ocupa o segundo lugar como maior produtor de mamão no mundo, ficando atrás apenas da Índia (FAO, 2014). A fruta possui distribuição por todos os estados brasileiros (Lleras, 2016), podendo ser cultivada sem perda de produtividade em até 32° de latitude Norte ou Sul no Brasil (Serrano e Cattaneo, 2010).

Neste contexto, o plantio do mamão se destaca, como sendo uma das frutas mais consumidas e cultivadas no país, apresentando uma produção nacional de aproximadamente 1,6 milhões de t (FAO, 2014). Dentre os estados produtores, a Bahia e o Espírito Santo são os de maior destaque, responsáveis por 795 mil t e 400 mil t, respectivamente (Treichel et al., 2016). Portanto a cultura do mamoeiro é de grande importância para o mercado nacional, sendo responsável por arrecadar mais de US\$ 43.675 milhões em exportações no ano de 2015, majoritariamente para países europeus e os Estados Unidos (Treichel et al., 2016).

Comercialmente o plantio do mamoeiro ocorre por via semínifera (Pérez et al., 2016), porém esse método de propagação é limitado por alguns fatores, como a heterozigosidade oriunda da polinização cruzada (Bhattacharya e Khuspe, 2001). Além disso, o alto preço das sementes de genótipos elite, levam os agricultores a produzirem suas sementes de forma particular (Schmildt et al., 2016), contribuindo para a disseminação de genótipos com baixo padrão de qualidade (da Silva et al., 2007). Dessa maneira, as progênies poderão apresentar uma descaracterização do genótipo, exibindo consideráveis variações no tamanho, forma e gosto dos frutos, e maior susceptibilidade a doenças (Reuveni et al., 1990).

As plantas de mamoeiro são diploides ($x = 9$) (Kubitzki, 2003) com três diferentes tipos sexuais: macho, fêmea e hermafrodita (Fitch et al., 2005). Entretanto, o mercado consumidor tem interesse apenas no cultivo de indivíduos hermafroditas, por apresentarem frutos no formato piriforme e altas taxas de polpa/volume (Urasaki et al.,

2002; Schmildt et al., 2015). Porém não existem maneiras eficientes de sexagem em mudas, obrigando os produtores a plantar em média três sementes por cova e esperar de quatro a seis meses, para identificar os hermafroditas, implicando em prejuízo e custo de trabalho que são incorporados ao preço final do produto (Urasaki et al., 2002; Ma et al., 2004; Paterson et al., 2008).

Uma alternativa a este cenário seria a micropropagação de genótipos elite, as quais possuem características de interesse agrônomo, gerando cultivares mais uniformes e livres de doenças (Fitch et al., 2005). Neste contexto, a embriogênese somática emerge como uma ferramenta biotecnológica com potencial de aplicação. Por meio da embriogênese somática uma única célula isolada ou um grupo de células somáticas dão origem à embriões somáticos e conseqüentemente, a uma planta inteira (Tautorius et al., 1991).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo induzir a embriogênese somática do mamoeiro Golden e estudar a influência dos principais comprimentos de onda, através de lâmpadas LED, na fase de maturação dos embriões. Análises proteômicas *label-free* foram conduzidas visando a compreensão dos mecanismos associados a capacidade embriogênica e desenvolvimento dos embriões somáticos, assim como as alterações bioquímicas, moleculares e a dinâmica das proteínas envolvidas na ativação das rotas fotomorfogenéticas.

3.2. Embriogênese somática

Durante o processo evolutivo, as plantas vasculares desenvolveram diferentes estratégias de reprodução assexuada, como a embriogênese somática. Nesse método, não existe a necessidade da dupla fecundação, para que ocorra a formação do zigoto e posterior desenvolvimento do embrião (Sharma e Thorpe, 1995). Proporcionando, assim, uma alternativa quando a planta não consegue superar fatores genéticos, fisiológicos, ou ambientais que impedem a fertilização (George et al., 2008).

A embriogênese somática pode ocorrer naturalmente nas plantas, num processo denominado apomixia, em que embriões são formados a partir de células somáticas esporofíticas ou de células ovulares não fertilizadas (Koltunow, 1993; Elhiti et al., 2013). A indução da embriogênese somática *in vitro* é baseada no princípio da totipotência, em que uma célula diferenciada possui potencial genético para se reprogramar e dar origem a qualquer tipo celular (Verdeil et al., 2007). Esta técnica só pode ser alcançada se as

células forem competentes e capazes de responder a estímulos externos apropriados (Silveira et al., 2013).

De acordo com Jiménez (2001), a embriogênese somática *in vitro* pode ser dividida em duas fases independentes, indução e expressão. Durante a primeira etapa, as células somáticas diferenciadas adquirem a competência embriogênica e se proliferam, enquanto que na segunda, as células embriogênicas se diferenciam em embrião somático e posteriormente em uma planta por inteiro.

Para uma boa eficiência desse procedimento *in vitro*, devem ser aplicados uma série de tratamentos físicos e químicos em períodos determinados. A regeneração vegetal via embriogênese somática geralmente segue cinco passos básicos: (1) Início das culturas embriogênicas pelo cultivo do explante primário em meio suplementado por reguladores, geralmente auxina; (2) Proliferação das culturas em meio sólido, semi-sólido, ou líquido, com a mesma constituição do meio anterior; (3) Pré-maturação dos embriões somáticos em meio sem reguladores de crescimento, isso promoverá uma parada na proliferação e conseqüentemente será estimulada a formação dos embriões e começo dos desenvolvimentos iniciais; (4) Maturação dos embriões por cultura em meio suplementado com Ácido Abscísico (ABA) e/ou pela redução do potencial osmótico; (5) Desenvolvimento das plântulas em meio sem hormônios (von Arnold et al., 2002).

Apesar de partilharem semelhanças como possuem os mesmos estádios de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar) (Rocha e Dornelas, 2013), a embriogênese somática se diferencia da zigótica principalmente pelo fato do embrião zigótico iniciar seu desenvolvimento com a formação do zigoto após a fertilização, enquanto que as células somáticas ganham competência embriogênica através da exposição a estímulos físicos (estresses) e químicos (hormônios) (Elhiti et al., 2013). Para adquirir essa capacidade, é necessário que ocorra uma reprogramação no padrão da expressão gênica, que alteram cascatas de sinais genéticos, permitindo assim que ocorra a manifestação da totipotência (Verdeil et al., 2007).

Os reguladores de crescimento vegetais são os principais estímulos para a indução da embriogênese somática, e dentre estes, o 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), uma auxina sintética, é um dos mais utilizados (Leljak-Levanić et al., 2016). Na embriogênese somática o 2,4-D é responsável pelo estabelecimento da polaridade no embrião, controle do desenvolvimento e aumento no nível endógeno de ácido indolacético (AIA) (Fehér, 2015).

Muitos relatos já demonstraram que a presença de 2,4-D no meio de cultura promove regulações epigenéticas (Karami e Saidi, 2010). A indução da embriogênese somática é mediada principalmente pelo remodelamento da cromatina, metilações/desmetilações no DNA genômico e a ação de pequenos RNA's, regulando os processos de diferenciação, desdiferenciação e divisão celular (De-la-Peña et al., 2015). Esse controle é necessário para expor genes que antes estavam inativos pela heterocromatina e são necessários ativos para dar prosseguimento as rotas embriogênicas (Mahdavi-Darvari et al., 2015).

Gliwicka et al. (2013) analisaram o transcriptoma de culturas embriogênicas de *Arabidopsis* (Col-0) e mutantes não-embriogênicos (tanmei), identificando a expressão diferenciada de determinados fatores de transcrição nas culturas selvagens. Grande quantidade de membros das famílias ARF e AUX/IAA foram encontrados. Eles atuam como reguladores e sinalizadores modulando a expressão de genes responsivos à auxina. O regulador ARF5 por exemplo, atua na síntese do gene MP (MONOPTEROS), um fator chave no controle do padrão de desenvolvimento em embriões zigóticos. Ele controla o transporte polar de auxina pela ativação dos genes PIN1, que codificam proteínas responsáveis pelo efluxo de auxinas para fora das células. A relevante atividade desses compostos nas culturas embriogênicas, indica que o transporte polar de auxina está relacionado com a indução da embriogênese somática e manutenção do padrão de desenvolvimento.

Outro fator que vêm demonstrando ter fundamental importância na aquisição da competência nos embriões somáticos, é o estresse (Karami e Saidi, 2010). Nos últimos anos, estudos demonstraram que espécies reativas de oxigênio (ROS), em concentrações apropriadas, atuam como moléculas sinalizadoras, regulando diversos processos da embriogênese *in vitro*. A concentração e distribuição subcelular de ROS, são mediadas por enzimas como ascorbato peroxidase (APX) e glutathione transferase (GST). Em algodão, a supressão dos genes APX, assim como a aplicação exógena de agentes oxidantes, perturbam a homeostase do estado redox e a concentração de auxina, resultando na inibição da desdiferenciação dos explantes.

Para o mamoeiro, o estabelecimento da embriogênese somática foi descrito há mais de quarenta anos (Bruijne et al., 1974). Desde então, diversos tecidos já foram utilizados com sucesso para a obtenção de culturas embriogênicas: tecidos ovulares (Litz e Conover,

1982), raízes (Chen et al., 1987), hipocótilos (Fitch, 1993) e embriões imaturos (Anandan et al., 2012; Bukhori, 2013; Vale et al., 2014).

Como principal fator limitante da técnica no mamoeiro, são relatados principalmente o considerável número de anomalias nos embriões somáticos. Dentre as deformidades, pode-se destacar os embriões com ausência de cotilédones, em formato cilíndrico (com ou sem ápice) e fundidos (Fitch, 1993; Fernando et al., 2001; Bukhori, 2013). Heringer et al. (2013) constataram que a suplementação do meio de cultura com Polietilenoglicol (PEG) promoveu melhores resultados na formação de embriões cotiledonares no mamoeiro. De acordo com Vale et al. (2014), a adição de PEG na maturação do mamão induz proteínas relacionados ao metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, diminuindo o surgimento de anomalias.

Para o estabelecimento de protocolos mais eficientes na maturação e regeneração, é recomendável que se faça a distinção dos calos embriogênicos daqueles não embriogênicos, afim de conseguir estimar a viabilidade dessas culturas celulares (Pádua et al., 2014). Segundo Heringer et al. (2013), os calos do mamão conseguem ser separados de acordo com sua morfologia e coloração. Os embriogênicos são compostos por agregados de células granulares friáveis, de cor amarelada e menores, enquanto que os não embriogênicos são maiores, porém compactos, com aparência translúcida e coloração branca.

Portanto, a utilização de técnicas biotecnológicas para o estabelecimento de culturas embriogênicas a partir de células somáticas, representa atualmente um modelo experimental único, para a compreensão da flexibilidade do desenvolvimento em vegetais (Feher et al., 2003). As similaridades entre os estádios de desenvolvimento zigótico e somático, fazem com que a embriogênese somática se torne um atraente sistema para estudos genéticos, fisiológicos e morfológicos dos processos que envolvem a formação dos embriões nas plantas (Elhiti et al., 2013). Outra grande importância no emprego da embriogênese somática, é a aplicação prática na propagação vegetativa em larga escala. Essa vantagem é obtida muitas vezes pela possibilidade do aumento na produção através de biorreatores (Heringer et al., 2014) e pelas culturas poderem ser criopreservadas, tornando possível o estabelecimento de Bancos de Germoplasma (von Arnold et al., 2002). Além disso, na obtenção de plantas geneticamente modificadas, a embriogênese somática surge como uma das formas mais eficientes de regeneração, pois apresenta altas

taxas de multiplicação, facilita o processo de transformação e a planta gerada é geneticamente idêntica à planta mãe (Fitch et al., 1993).

3.3. Lâmpadas LED (*Light emitting diodes*) na cultura *in vitro*

O crescimento e desenvolvimento vegetal *in vitro* são altamente regulados por diversos fatores externos, como temperatura, luminosidade e troca gasosa (Hughes, 1981), assim como, por influências internas, por exemplo, padrões de expressão gênica e balanços hormonais (Thomas e Jiménez, 2005). Dentre os fatores influentes, a luz fornecida à cultura *in vitro* desempenha um papel de extrema importância no sucesso da regeneração. Pois ela é responsável por estimular o desenvolvimento da planta e participa como fator chave na morfogênese (Okamoto et al., 1997).

O sistema de iluminação artificial *in vitro* representa um fator determinante no sucesso da cultura e deve fornecer a luz no comprimento de onda ideal em que estão envolvidas as respostas fotomorfogênicas, fotossintéticas e fototrópicas, relacionadas à espécie em estudo. Para que ocorram esses processos de maneira eficiente, geralmente é necessária a exposição à luz nos espectros violeta próximo (300 – 380 nm), azul (430-490 nm), vermelho (640-700 nm) ou vermelho distante (700-760 nm) (Li, H. et al., 2010); (Gupta e Jatothu, 2013). A quantidade de luz (fluxo de fótons), a qualidade (comprimento de onda) e a duração (fotoperíodo) são essenciais para a morfogênese da planta, podendo afetar processos como maturação dos cloroplastos, anatomia e tamanho da folha, rizogênese e direção do crescimento (Reuveni e Evenor, 2007; Nhut e Nam, 2010).

A integração entre os três parâmetros citados (quantidade, qualidade e duração), com as rotas fotomorfogênicas atuam profundamente nas plantas, desencadeando alterações fisiológicas que regulam o crescimento e desenvolvimento vegetal (Li, H. et al., 2010). As radiações vermelha e azul são as maiores responsáveis por essas respostas, pois são as principais fontes de energia na assimilação fotossintética, visto que as clorofilas a e b possuem picos de absorbância nesses comprimentos. Outros pigmentos como carotenoides, xantofilas e riboflavinas também absorvem ambos espectros e são relatados como estimulantes da morfogênese em vegetais (Hughes, 1981; Lin et al., 2013).

Sabe-se que os fitocromos atuam no desenvolvimento da planta, absorvendo as radiações fornecidas. Essas moléculas são uma espécie de cromoproteína pigmentada ligada à um cromóforo que atua como captador de luz vermelha, convertendo e

transferindo posteriormente a energia luminosa em energia de excitação para os fotossistemas (Kerbaudy, 2004). Elas são interconvertidas de maneira reversível de acordo com o estímulo luminoso. Quando picos de absorção são aplicados na cor vermelha o fitocromo se torna inativo (P_r) ao passo que no vermelho-distante ele transforma-se na condição fisiologicamente ativa (P_{FR}), sendo um dos principais mecanismos responsáveis pela fotomorfogênese nas plantas (Torné et al., 2001).

Já para a radiação azul, existe outra cromoproteína denominada criptocromo. Quando irradiado com luz na cor adequada esse fotorreceptor consegue penetrar o núcleo e ligar-se ao fator de repressão da fotomorfogênese. Dessa maneira são liberados fatores transcricionais de genes responsivos à luz, promovendo a morfogênese (Kerbaudy, 2004). Além disso, sabe-se que as fototropinas 1 e 2 também são receptores relacionados com a luz azul. Essas proteínas quinases participam da transdução dos sinais luminosos desencadeando uma série de respostas como fototropismo, abertura estomática, movimento dos cloroplastos (ciclose), achatamento e posicionamento das folhas (Inoue et al., 2010). As moléculas de clorofila absorvem tanto os comprimentos de onda vermelho, quanto azul de forma eficiente (Yeh e Chung, 2009).

Combinações entre os espectros azul e vermelho estão demonstrando ser uma fonte de luz efetiva para a produção em ambientes controlados, de diversas espécies vegetais como Pimenta (Brown et al., 1995), Alface (Yorio et al., 2001), Ervilha (Wu et al., 2007), Morango (Nhut et al., 2003), Rabanete (Tamulaitis et al., 2005), Uva (Poudel et al., 2008), dentre outros. Essa interação entre os dois espectros pode levar a um metabolismo fotossintético mais eficiente, aumento na quantidade de matéria fresca/seca e ainda, no estímulo para o desenvolvimento e crescimento vegetal (Sabzalian et al., 2014).

Para que o fornecimento dessas condições ideais seja assegurado, as salas de crescimento devem possuir sistemas de iluminação artificiais adequados. As fontes luminosas mais comuns de serem utilizados na cultura *in vitro* são as fluorescentes (Bula et al., 1991; Heo et al., 2002; Kurilčik et al., 2008). Porém essas fontes não são capazes de prover um nível estável de energia radiante, com altos fluxos de fótons fotossintéticos (Sabzalian et al., 2014). Além disso, há dificuldade em controlar seu comprimento de onda, pois elas emitem uma ampla gama de espectros variando de 350 a 750 nm, com ausência da radiação no vermelho-distante (Seabrook, 2005; Wu e Lin, 2012).

A energia dissipada nas lâmpadas fluorescentes é convertida em calor na sua superfície, gerando um acréscimo de temperatura no sistema, podendo danificar ou

atrapalhar a viabilidade das culturas (Gupta e Jatothu, 2013). Essas limitações são evidentes na cultura de tecidos e influenciam diretamente na morfogênese e crescimento das plantas, especialmente quando cultivadas em pequenas casas de vegetação ou incubadoras (Wu e Lin, 2012; Sabzalian et al., 2014). Dessa maneira, faz-se necessária a implementação de sistemas luminosos específicos, que aumentem a qualidade e eficiência das regenerações e do crescimento das plantas micropropagadas nos laboratórios.

O avanço tecnológico permitiu o surgimento de uma nova fonte luminosa como alternativa às opções tradicionais. O LED vem sendo empregado em inúmeros estudos com diversas espécies vegetais, visando investigar os efeitos da iluminação aplicada singular ou em combinação, na morfogênese e cultura *in vitro* (Gupta e Jatothu, 2013). Dentre os vários vegetais já analisados, pode-se destacar o Algodão (Li, H. et al., 2010), Banana (Nhut et al., 2002), Pinheiro (Merkle et al., 2006), Orquídea (Wongnok et al., 2008), Antúrio, (Budiarto, 2010), Liliu (Lian et al., 2002) e Sálvia (Heo et al., 2002). Entretanto, ainda não existem estudos relacionando LEDs na embriogênese somática do mamoeiro, flagrando a necessidade de se abordar essas aplicações envolvendo o cultivo *in vitro* do mamão.

Quando comparado aos outros sistemas luminosos convencionais, o LED se destaca por ter um comprimento de onda específico, maior durabilidade, menor tamanho, sua superfície é relativamente fria, requer pouca quantidade de energia, apresenta a possibilidade de controlar sua composição espectral (Brown et al., 1995) e não contém mercúrio, sendo mais seguro de manusear (Yeh e Chung, 2009).

Assim sendo, os LEDs podem ser utilizados para regular os níveis de radiação supridos e que são necessários na fotomorfogênese para o crescimento e desenvolvimento da planta. Emitindo gamas espectrais e intensidade de luz específicas que estão envolvidas nas respostas vegetais (Folta et al., 2005). Portanto, essa fonte de radiação é ideal para estudos que visem avaliar respostas fisiológicas, influências na morfologia, metabolismo e nos diferentes níveis de expressão gênica e proteica, pelo fato de fornecer uma radiação homogênea e com os comprimentos de onda correspondentes aos fotorreceptores do organismo em estudo (Li, H. et al., 2010).

3.4. Proteômica na embriogênese somática

As proteínas são macromoléculas constituídas por cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas, sintetizadas a partir da informação contida nos genes e

posteriormente nos RNA-m. Entretanto, os RNAs possuem diferentes formas de regulações transcricionais e pós-transcricionais, que geram modificações e variações na sua estabilidade (Kuersten et al., 2013). Adicionalmente, a função e atividade proteica pode ser alterada de acordo com sua localização subcelular, interação com outras moléculas e modificações pós-traducionais, como fosforilação, glicosilação e ubiquitinação (Wu et al., 2016). Esses mecanismos de controle contribuem para diminuir a correlação entre os níveis de RNAm e a abundância de proteínas (Rose et al., 2004; Vogel et al., 2010).

Wasinger et al. (1995) define proteoma como o conjunto de proteínas expressas em um determinado momento e condição, permitindo avaliações quantitativas e qualitativas das proteínas atuantes no metabolismo. Dessa maneira a identificação proteica em diferentes níveis de abundância, permite associar essas moléculas com variados eventos fisiológicos ocorrentes nas células, tecidos ou órgão (Chen e Harmon, 2006). Neste cenário, a identificação e separação das proteínas surgiu como uma promissora maneira de se decifrar a ligação entre o genótipo e o fenótipo (Rose et al., 2004).

O recente avanço biotecnológico promoveu um aumento considerável na aplicação de ferramentas capazes de analisar a expressão gênica de todo genoma, ao nível proteico. A proteômica é um campo emergente que se desenvolveu juntamente com a separação de proteínas, espectrometria de massas, algoritmos que ajudam na busca pelas proteínas e no sequenciamento/anotação dos genomas (Thelen, 2007). A combinação desses avanços, permitiu o advento da proteômica “*label-free*”. Nessa abordagem, misturas complexas de proteínas são digeridas em peptídeos por proteases, separados por cromatografia líquida multidimensional, analisados e identificados através da espectrometria de massas em tandem. Por fim, algoritmos computacionais mapeiam os peptídeos e determinam o conteúdo de proteínas na amostra (Jorrín-Novo et al., 2015).

Diversos estudos proteômicos vêm sendo empregados com sucesso na determinação de biomarcadores da embriogênese nas plantas. De uma maneira geral pode-se destacar as proteínas responsivas à estresses como peroxidases e glutathione-S-transferase (Noah et al., 2013), as atuantes na divisão/alongamento celular como actina (Zhao et al., 2015), tubulina (Pan et al., 2009) e anexina (Baba et al., 2008) e na mobilização energética como triose-fosfato isomerase (Nogueira et al., 2007) e gliceraldeído-3-fosfato (Tonietto et al., 2012). Esses resultados indicam que um complexo sistema molecular é necessário durante a progressão da embriogênese

somática. No entanto, os vegetais demonstram relevante plasticidade fenotípica em resposta às condições ambientais. A variação nos espectros luminosos, por exemplo, pode promover estresse fotooxidativo, que induz o acúmulo de ROS. O estresse oxidativo causado por essas moléculas nas células e a perturbação do equilíbrio entre a produção e degradação dos ROS vem sendo estritamente associados com a ativação de vias morfogênicas específicas da embriogênese e ao desenvolvimento fisiológico vegetal (Gupta e Sahoo, 2015).

Análises conduzidas na embriogênese do arroz, identificaram uma ativa regulação de proteínas responsivas à estresses, evidenciando sua importância no desenvolvimento vegetal. Os autores encontraram proteínas do choque térmico (HSP) reguladas durante o curso da embriogênese. Essas são responsáveis por estabilizar as conformações de outras proteínas, prevenir aglomerações e mediar os remodelamentos, ajudando assim a manter o estado ativo das proteínas responsivas às condições estressantes. Além dessas, foram identificadas proteínas relacionadas a proteção contra danos causados por ROS como as peroxidases, peroxirredoxinas e superóxido dismutase (Zi et al., 2013). Para o mamoeiro, estudos realizados por Vale et al. (2014), também constataram a presença de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo na maturação dos embriões somáticos. Podendo-se destacar a ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e glutathione transferase.

Em embriões somáticos já foram descritas proteínas relacionadas ao metabolismo proteico como as ribossomais (Sharifi et al., 2012; Noah et al., 2013), fatores de transcrição (Sun et al., 2013) e histonas (Rode et al., 2012), promovendo a biossíntese de novas moléculas essenciais aos posteriores estádios de desenvolvimento. Calos embriogênicos de *Cyclamen persicum* (Rode et al., 2012), *Zea mays* (Sun et al., 2013), *Liriodendron* (Zhen et al., 2015) e *Araucaria angustifolia* (dos Santos et al., 2016) apresentaram de forma up-regulada proteínas constituintes do complexo proteassoma 26S, indicando que essa maquinaria pode auxiliar na transição entre os estádios da embriogênese somática, ubiquitinando as proteínas que não serão mais utilizadas e por consequência fornecendo aminoácidos para a síntese de novos peptídeos. Portanto, para a correta reprogramação celular e aquisição da competência embriogênica, é necessário um fino balanço entre a síntese de novas proteínas e a degradação daquelas não mais necessárias (Zhen et al., 2015).

Neste sentido, a proteômica como ferramenta para o estudo e compreensão da embriogênese somática, vem permitindo a identificação de proteínas que podem ser

utilizadas como biomarcadoras moleculares, contribuindo na determinação dos estádios de desenvolvimento do embrião, assim como linhagens embriogênicas e não-embriogênicas, auxiliando na elaboração de protocolos de regeneração *in vitro* mais eficientes (Tchorbadjieva, 2016).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes espectros luminosos fornecidos por lâmpadas LED na morfogênese de embriões somáticos e nos perfis proteômicos de calos embriogênicos durante a embriogênese somática do mamoeiro Golden.

4.2. Objetivos específicos

- Selecionar o melhor conjunto de lâmpadas LED para otimização da fase de maturação de embriões somáticos.
- Estudar o perfil diferencial da abundância de proteínas por meio de análise proteômica comparativa durante a embriogênese somática de mamoeiro sob o efeito de diferentes lâmpadas LED.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Material vegetal e indução das culturas

Para a indução das culturas embriogênicas *in vitro*, foram utilizados embriões zigóticos obtidos das sementes de frutos, sempre no mesmo estágio de maturação (100% amarelos), do mamão cultivar Golden. Os frutos foram gentilmente cedidos pela empresa Caliman Agrícola S/A, localizada na cidade de Linhares, Espírito Santo (ES), Brasil (19° 23'S e 40° 4'W).

A indução ocorreu conforme metodologia descrita por Heringer et al. (2013). Os frutos foram lavados em água corrente com detergente por 3 vezes, posteriormente, em câmara de fluxo laminar vertical, a assepsia foi realizada por 2 minutos em etanol 70% e 30 minutos em hipoclorito de sódio 50% (água sanitária), seguido de 3 lavagens com água destilada autoclavada. Os embriões isolados através das sementes dos frutos

serviram como explante e inoculados em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 20 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962). O meio de cultura MS é suplementado com sacarose (30 g.L⁻¹), phytigel® (2,0 g.L⁻¹) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (20 µM). O pH é ajustado para 5,8 e por fim, autoclavado a 121°C por 15 min.

Após a inoculação dos explantes, as placas de Petri ficaram armazenadas em estufas de crescimento com temperatura controlada (25°C ± 1°C), no escuro, por aproximadamente 45 dias. As culturas embriogênicas induzidas foram submetidas a três ciclos de repicagem com intervalo de 21 dias, para a multiplicação.

5.2. Maturação das culturas embriogênicas

Culturas embriogênicas foram utilizadas como material para experimento de maturação. A retirada do regulador de crescimento 2,4-D, adição do agente osmótico PEG 6%, mio-inositol (0,005%) e sacarose (30 g.L⁻¹) do meio de cultura MS, como estabelecido por (Heringer et al., 2013), caracteriza o meio de cultura para maturação. O pH deve ser ajustado para 5,8 e o meio submetido a autoclave por 15 min a 121° C. Cada placa de Petri foi inoculada com três colônias de calos com 300 mg de matéria fresca (MF), totalizando 900 mg por placa, correspondendo a um tratamento. Os tratamentos foram constituídos por cinco repetições.

Em seguida, para a maturação dos embriões, mantemos os meios de cultura em sala de cultivo com temperatura controlada (25°C ± 1°C) e expostos a diferentes espectros de lâmpada Philips GreenPower TLED, com fotoperíodo de 16 h, de acordo com a Tabela 1, por 28 dias.

Tabela 1. Tratamentos de maturação durante embriogênese somática do mamoeiro usando diferentes tipos de lâmpadas LED com diferentes espectros de luz.

Tratamentos	Comprimentos de onda da lâmpada	µmol. m-2 s-1	Pico de comprimento de onda (nm)
Controle	Tubular fluorescente	55	435/ 545/ 580
W _h B	W/HB	55	450/530
W _m B	W/MB	55	450/ 530
W _l B _d R	W/ LB/ DR	45	450/ 530/ 660

W _m B _d R	W/ MB/ DR	45	450/ 530/ 660
W _l B _d R _f R	W/ LB/ DR/ FR	40	450/ 530/ 660/ 735
W _m B _d R _f R	W/ MB/ DR/ FR/	40	450/ 530/ 660/ 735

W (White) Branco; LB (Low Blue) Azul Baixo = 8-10% de azul; MB (Medium blue) Azul médio = 12-14% de azul; HB (High Blue) Azul alto = 16-18% de azul; FR (Far Red) Vermelho distante = 12% de vermelho distante; DR (Deep Red) Vermelho = 30 – 50% de vermelho.

Ao final do período estabelecido, o número de embriões somáticos no estágio cotiledonar e o incremento de matéria fresca (MF) foram contabilizados e os valores encontrados submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Student–Newman–Keuls (SNK) a 5% utilizando o software estatístico “R” (Dessau e Pipper, 2008). Para as análises proteômicas, retiramos três replicatas biológicas (300 mg de matéria fresca por amostra), de cada tratamento.

5.3. Análises proteômicas

5.3.1. Extração de proteínas

Para a extração proteica, foi utilizado o protocolo estabelecido por (Balbuena et al., 2011). O tampão de extração é constituído por 7 M uréia, 2 M tiouréia, 2% triton X-100, 1% ditiotretitol (DTT), 1 mM fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) e 5 µM pepstadina. Nós separamos três amostras biológicas de três placas de Petri, e maceramos em almofariz e pistilo utilizando nitrogênio líquido. Após essa etapa, as amostras são adicionadas em microtubos com 1 mL de tampão de extração, vortexadas por 5 minutos e incubadas em gelo por 30 minutos, seguidos por centrifugação em 16 000 g por 20 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram coletados, e a concentração das proteínas totais mensurada por 2-D Quant Kit.

5.3.2. Digestão proteica

As proteínas extraídas (100µg) foram purificadas com metanol clorofórmio para a retirada de detergentes das amostras, de acordo com protocolo estabelecido por Nanjo et al. (2012). Após essa etapa, dessanilizamos as amostras em membranas 3000 MWCO Amicon Ultra-0,5 mL, com a adição de 300 µL de bicarbonato de amônio (50mM) e

centrifugamos a 1500 g por 10 minutos a 20° C. Esse passo foi repetido por três vezes e no final, recuperado aproximadamente 50 µL de amostra.

Para a digestão de proteínas, 25 uL de RapiGest® 0,2% (v/v) é adicionado e as amostras brevemente vortexadas e incubadas em um Eppendorf Thermomixer® a 80°C durante 15 min. Em seguida, 2,5 mL de DTT 100 mM são adicionados, os tubos agitados e incubados a 60°C durante 30 min. Em seguida, são adicionados 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM e as amostras incubadas no escuro durante 30 min à temperatura ambiente. A digestão proteica é realizada pela adição de 20 µL de solução de tripsina (50 ng/µL), mantendo overnight a 37°C, sob agitação. Posteriormente, para precipitação do RapiGest®, 10 µL de ácido trifluoracético 5% (v/v) foram adicionados e as amostras incubadas a 37°C durante 90 min, seguido por uma etapa de centrifugação durante 30 min a 15000g. Ao final, as amostras são transferidas para vials Total Recovery.

5.3.3. *Análises por espectrometria de massas*

O sistema UPLC nanoAcquity acoplado ao espectrômetro de massas Synapt G2-Si HDMS foi utilizado para a análise ESI-LC-MS/MS segundo protocolo estabelecido por (Reis et al., 2016). Inicialmente as amostras são normalizadas quanto a concentração dos peptídeos mediante a injeção de 1 µL de amostras digeridas para aquisição no espectrômetro de massas no modo MS^E. Esse procedimento é baseado em medições estequiométricas da contagem total de íons da corrida gerada, e garantirá que todas condições tenham os mesmos valores molares. As corridas são constituídas por 3 replicatas biológicas.

Durante a separação, as amostras foram carregadas no nanoAcquity UPLC (5µm) através da coluna trap C18 (180 µm x 20 mm) à 5 µL/min durante 3 minutos e no nanoAcquity por uma coluna analítica de fase reversa HSS T3 (75 µm x 150 mm, 1.8 µm) à 400 nL/min, com a temperatura da coluna em 45° C. Para a eluição dos peptídeos utilizamos um gradiente binário, em que a fase móvel A é constituída por água e 0,1% de ácido fórmico e a fase móvel B por acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição foi de 7-40% de B até 91,12 min e se manteve até 92,78 min. Em seguida, o gradiente passou para 85% de B, até 100 min. Após, aumentou para 99,9% até 106 min, voltando em seguida para as condições iniciais até o fim da corrida em 120 minutos.

A espectrometria de massas foi executada em modo positivo, resolução (*V mode*), 35,000 FWHM, com mobilidade iônica e modo aquisição independente de dados (DIA);

a velocidade de onda IMS ajustada para 600m/s e a transferência de energia de colisão aumentada de 19 V para 45V no modo de alta energia; as voltagens do cone e do calpar foram 30V e 2800V respectivamente, com 70°C de temperatura da fonte. Nos parâmetros do TOF (*time of light*), o tempo de varredura é definido em 0,5 segundos em modo contínuo, com a massa variando de 50 a 2000 Da. Para a calibração, implementamos o [Glu¹]-fibrinopeptídeo B humano a 100 fmol/μL e a aquisição da massa específica realizada de 30 em 30 segundos.

5.3.4. Análise dos dados

Os processamentos no espectro e o contraste no banco de dados foram realizados através do programa Progenesis QI *Proteomics software* V.2.0. Definimos os seguintes parâmetros: uma clivagem perdida; fragmento de íon mínimo por peptídeo igual a 2, fragmento de íon mínimo por proteínas igual a 5, mínimo de peptídeos por proteínas de 2; as modificações fixadas em carbamidometilação (C), modificações variáveis de oxidação (M), fosforilação (STY), um valor máximo de 4% na taxa de falso-positivo (FDR), *score* superior a 5 e erro máximo de massa de 10 ppm. Empregamos o banco de dados Carica Papaya, PhytozomeV11.0 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Para se assegurar a qualidade dos resultados, definimos os parâmetros de refinamento: apenas proteínas presentes nas 3 repetições biológicas são consideradas para análise. As proteínas diferencialmente abundantes são aquelas que apresentaram significância na ANOVA ($p < 0,05$) e diferença de no mínimo 1,5 vezes na abundancia relativa. Por fim, as proteínas selecionadas foram submetidas à caracterização funcional pelo *software* Blast2go (www.blast2go.com).

6. RESULTADOS

6.1. Qualidade da luz na produção de embriões cotiledonares

Ao final dos 28 dias, todos os tratamentos, contendo os diferentes comprimentos de onda de luz, permitiram a formação de embriões somáticos, sendo que o tratamento com iluminação LED em comprimentos de onda branco e azul médio (W_mB) demonstrou ser o melhor tratamento (Figs. 1 e 2). O tratamento W_mB resultou na formação de 82 embriões no estágio cotiledonar por placa, enquanto que o controle (lâmpada

fluorescente) apenas 48 (Fig. 2). Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

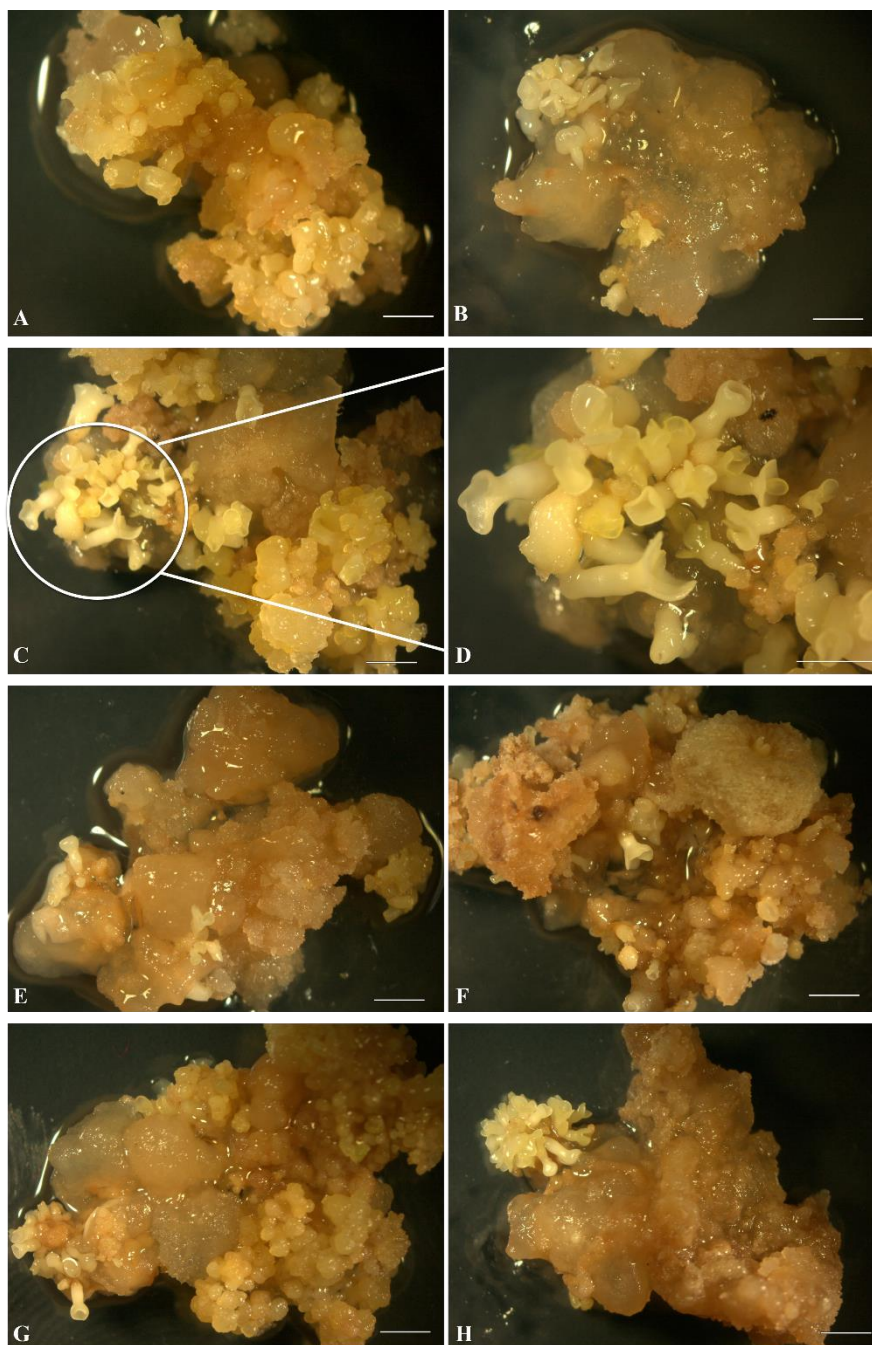


Figura 1. Calos embriogênicos de mamoeiro, aos 28 dias de cultivo, submetidos aos tratamentos de maturação usando lâmpadas LED com diferentes espectros de luz. A = Controle (fluorescência); B = W_hB ; C e D = W_mB ; E = W_lB_dR ; F = W_mB_dR ; G = $W_lB_dR_fR$; H $W_mB_dR_fR$ (ver Tab. 1).

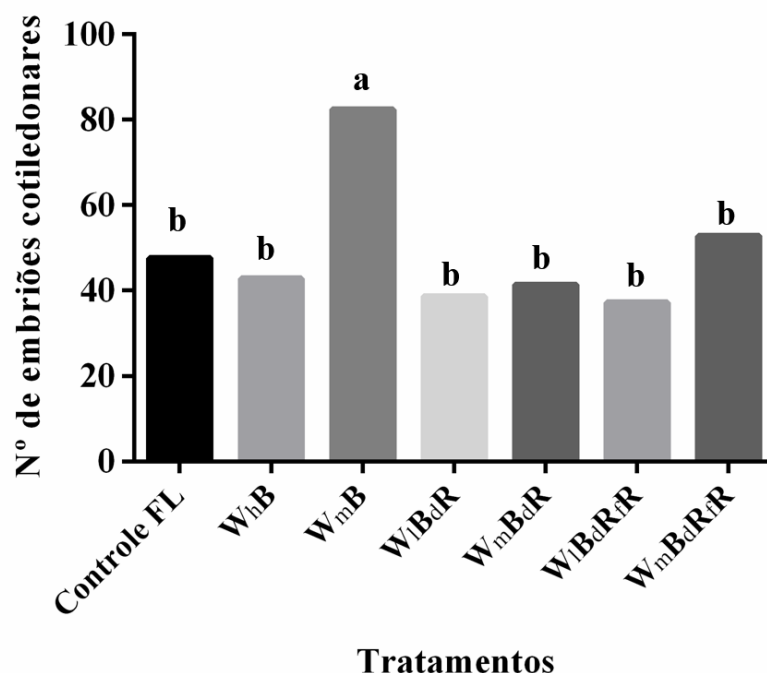


Figura 2. Número médio de embriões somáticos no estágio cotiledonar aos 28 dias de cultivo, nos diferentes tratamentos de maturação (ver Tab. 1). Médias seguidas pela mesma letra não diferem, significativamente, entre si de acordo com o teste de SNK ($P < 0,05$), $n = 5$, coeficiente de variação = 35%.

Os embriões oriundos do W_mB aparentam melhor sincronismo, atingindo os estádios finais de maneira mais uniforme e melhor quantidade (Fig. 1C - D), quando comparados aos outros tratamentos. Também pode-se constatar o correto estabelecimento da polaridade nos embriões e a formação de cotilédones bem definidos. Além disso, esses embriões apresentam aspecto opaco e coloração mais branco/amarelada (Fig. 1D), indicando que a síntese de pigmentos como carotenoides podem estar iniciando-se, assim como o acúmulo de grânulos de amido e o processo de maturação está em seu curso normal.

O aspecto escuro/translúcido e pouco embriogênico observado nos calos mantidos nos tratamentos (Fig. 1E - H) coincide com a presença do comprimento de onda vermelho. Essa morfologia específica pode estar relacionada com um possível acúmulo de antocianina, um pigmento sintetizado em resposta à luz, ligado a inibição da morfogênese e da capacidade de aquisição da competência embriogênica. Esses resultados demonstram que o efeito do comprimento de onda vermelho, estimulam em menor magnitude a maturação dos embriões somáticos do mamoeiro Golden.

Adicionalmente, na avaliação aos 14 dias de cultivo, foi possível observar a formação de embriões somáticos nos estádios iniciais do desenvolvimento (globular e torpedo) em todos os tratamentos (Fig. 3). Por consequência, as análises proteômicas foram realizadas para as amostras coletadas aos 14 dias de cultivo.

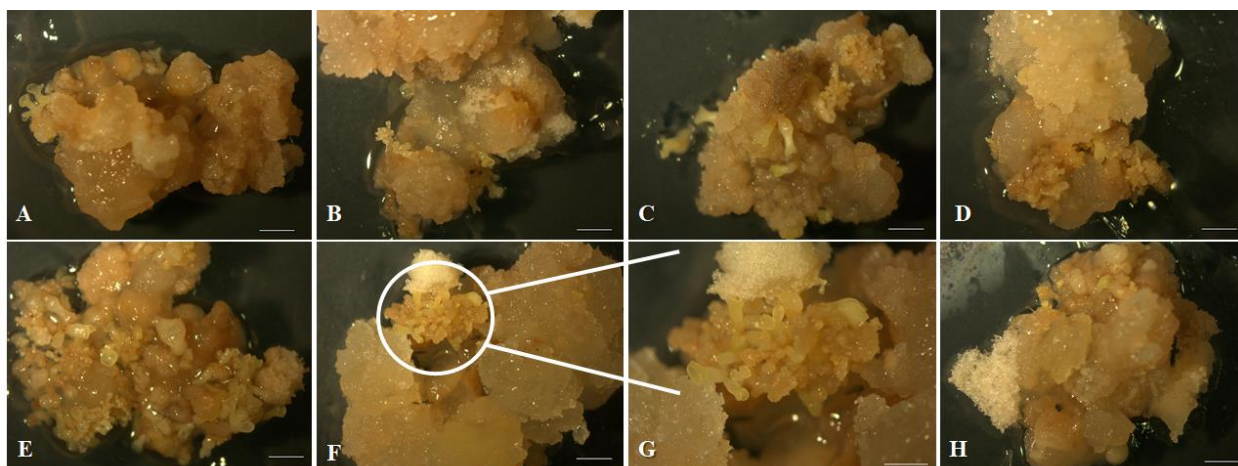


Figura 3. Calos embriogênicos de mamoeiro, aos 14 dias de cultivo, submetidos aos tratamentos de maturação usando lâmpadas LED com diferentes espectros de luz. A = Controle FL; B = W_hB ; C = W_mB ; D = W_lB_dR ; E = W_mB_dR ; F e G = $W_lB_dR_fR$; H = $W_mB_dR_fR$ (ver Tab. 1).

Foram observadas diferenças significativas no incremento de MF por placa ($P < 0,05$, Tab. 2). O tratamento W_mB_dR obteve um incremento de 1,9 mg de MF enquanto que o W_mB 1,21 mg (Tab. 2). Esses resultados indicam que o comprimento de onda vermelho induziu e o azul reprimiu o incremento de matéria fresca. Dessa maneira, podemos sugerir uma relação inversamente proporcional entre o incremento de matéria fresca e a diferenciação de embriões somáticos.

Tabela 2. Incremento médio de matéria fresca em gramas, ao final dos 28 dias de maturação.

	Controle FL	W_hB	W_mB	W_lB_dR	W_mB_dR	$W_lB_dR_fR$	$W_mB_dR_fR$
Incremento médio de MF por placa (g)	1,63 ab	1,18 b	1,21 b	1,70 ab	1,90 a	1,45 ab	1,62 ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem, significativamente, entre si de acordo com o teste de SNK ($P < 0,05$), $n = 5$, coeficiente de variação = 21%.

6.2. Análise proteômica durante a maturação dos embriões somáticos

A análise proteômica comparativa foi realizada entre o melhor tratamento (W_mB) e o tratamento controle, no tempo 14. Inicialmente, foram observadas diferenças significativas no conteúdo de proteínas totais entre os dois tratamentos (Fig. 4). Com base na quantificação podemos observar que o tratamento W_mB obteve um acentuado acúmulo de proteínas, enquanto que o controle produziu quase a metade.

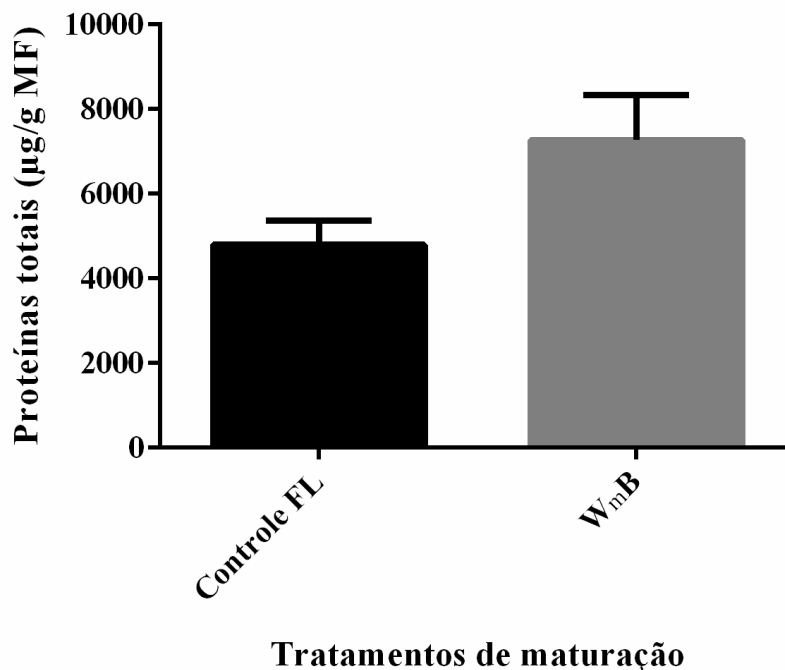


Figura 4. Conteúdo de proteína totais em calos embriogênicos mamoeiro submetidos a maturação nos tratamentos controle e W_mB aos 14 dias de cultivo (ver Tab. 1).

Na análise proteômica foram identificadas e quantificadas 726 proteínas (Anexo 1). O tratamento W_mB quando comparado ao controle, apresentou 50 proteínas diferencialmente abundantes, sendo 37 UP-reguladas (Tab. 4), 13 DOWN-reguladas (Tab. 5) e 676 não apresentaram abundância diferencial (*Unchanged*).

Após a classificação funcional as proteínas diferencialmente abundantes foram agrupadas em seis classes de processos biológicos (Fig. 5). Para as proteínas UP-reguladas o grupo relacionado aos processos de desenvolvimento foi o mais

representativo, abrangendo 18 proteínas, seguido por respostas à estresses com 8 e metabolismo energético com 7. Já para as proteínas DOWN-reguladas, o grupo com mais integrantes é o metabolismo de carboidratos com 6, seguido pelos processos de desenvolvimento com 4 e respostas à estresse também com 4.

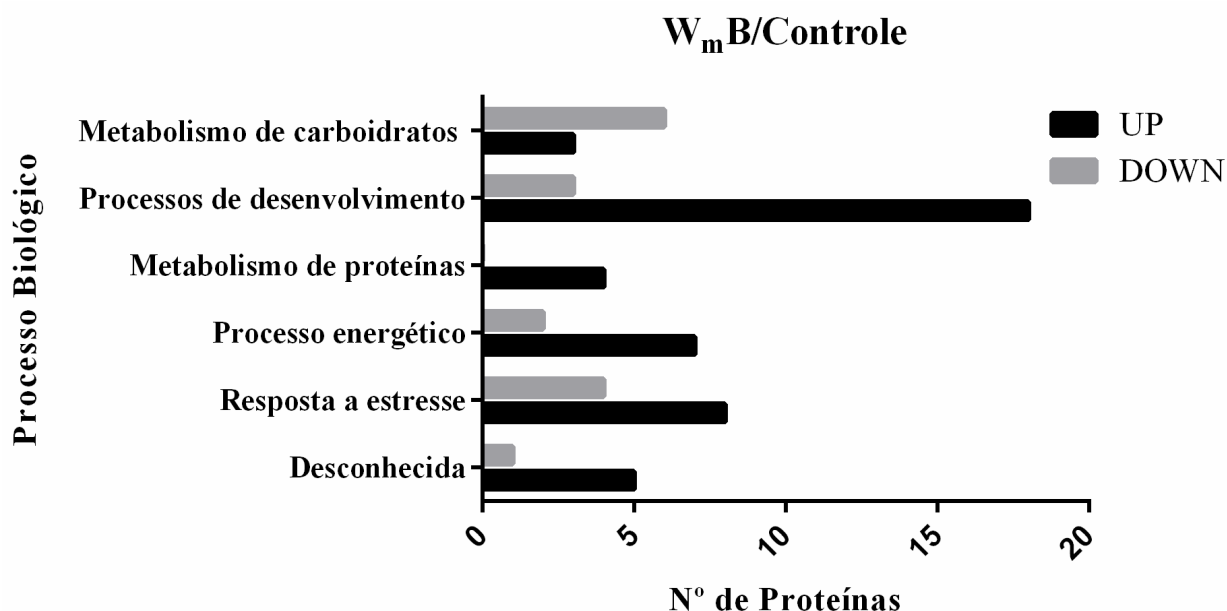


Figura 5. Proteínas diferencialmente abundantes identificadas nos embriões somáticos submetidos à maturação, agrupadas com base em seu processo biológico. Podemos destacar o processo de desenvolvimento que apresentou 18 proteínas UP-reguladas e o metabolismo de proteínas que não tiveram proteínas DOWN-reguladas.

As proteínas UP-reguladas mais abundantes no tratamento em relação ao controle, foram as Polygalacturonase-like (com abundância 3,8-vezes maior), Pentatricopeptide repeat-containing (2,17-vezes) e Germin subfamily 1 member 13 (2,16-vezes) (Tab.4). Podemos destacar a identificação de 3 membros da superfamília de pequenas proteínas Ras GTPase (Rab6, Ras-related Rab11C e Mitochondrial Rho GTPase 1-like) (Tab.4). Além disso, observamos um acentuado acréscimo no número de proteínas relacionadas ao metabolismo energético (Fig. 5). Essas proteínas são associadas aos processos de desenvolvimento e respostas a estresses, amplamente relacionadas como biomarcadoras da embriogênese somática. A presença delas em maior abundância no tratamento, indica que a combinação entre os comprimentos de onda W_mB pode promover respostas embriogênicas durante a morfogênese *in vitro* do mamoeiro.

Já para as proteínas DOWN-reguladas as D-3-phosphoglycerate dehydrogenase e Thioglucoside glucohydrolase foram as mais abundantes no controle, apresentando um $F_c = 0,16$ e $0,28$, respectivamente (Tab. 5). A primeira está envolvida na biossíntese do aminoácido serina, em tecidos não-fotossintetizantes, enquanto a segunda atua como uma enzima mirosinase, no metabolismo de carboidratos e nas respostas contra estresses. Esses resultados corroboram com a ideia de que no controle o estímulo para a síntese de moléculas relacionadas à recepção luminosa, como os cloroplastos, é menor, influenciando no correto desenvolvimento embriogênico e levando as células a condições estressantes.

Tabela 3. Descrição e processos biológicos das proteínas UP-reguladas no tratamento (W_mB) em relação ao controle, durante a fase inicial da maturação dos embriões somáticos em mamoeiro.

Acesso	Descrição	Contagem de peptídeos	Score	“Fold Change”	Processo biológico
UP-REGULADAS					
supercontig_250.7	Polygalacturonase-like	13	98,7736	3,790663	Developmental process; Carbohydrate metabolic process; Cell wall organization;
supercontig_51.59	Germin subfamily 1 member 13	2	21,5785	2,167066	Developmental process; Response to stress; Oxalate metabolic process
supercontig_63.43	Ankyrin repeat domain-containing 2	3	16,375	1,628241	Developmental process; Signal transduction
supercontig_3.118	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 2 of pyruvate dehydrogenase mitochondrial-like	18	111,4369	1,58983	Energetic process; Pyruvate metabolic process
supercontig_48.153	Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump 1	15	119,3467	1,809246	Developmental process; Proton transport
supercontig_1476.2	Hevein-like preproprotein	7	48,3394	1,579935	Response to stress
supercontig_117.77	Slit homolog 2 -like isoform X2	2	12,9408	2,121159	UNKNOWN
supercontig_81.140	Triosephosphate isomerase, cytosolic	9	59,6616	1,850249	Energetic process; Glycolytic process; Response to stress
supercontig_1.388	UDP-glucuronic acid decarboxylase 6-like	3	18,4817	1,796236	Developmental process; UDP-D-xylose biosynthetic process
supercontig_190.9	UDP-XYL synthase 6 isoform 1	10	61,7897	1,548907	Developmental process; Carbohydrate metabolic process; Nucleobase-containing compound metabolic process
supercontig_32.36	PREDICTED: uncharacterized protein At2g27730, mitochondrial	2	20,0425	1,508699	UNKNOWN
supercontig_17.219	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase mitochondrial	5	28,1276	1,52451	Energetic process; Reactive oxygen species metabolic process
supercontig_104.57	2-Cys peroxiredoxin chloroplastic	12	91,0149	1,738506	Response to stress; Cellular homeostasis; Developmental process
supercontig_22.63	Rab6	13	80,3476	1,798313	Developmental process; Signal transduction;

supercontig_67.71	S-adenosylmethionine synthase 2	4	31,2237	2,103192	Developmental process; S-adenosylmethionine biosynthetic process; Nucleobase-containing compound metabolic process
supercontig_25.179	Hypothetical protein EUTSA_v10011556mg	16	183,324	1,554808	UNKNOWN
supercontig_1.195	Serine threonine- phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	6	35,3627	1,580115	Developmental process; Regulation of phosphorylation
contig_30829.2	Proteasome subunit alpha type	2	13,6359	1,646488	Protein metabolism; Ubiquitin-dependent protein catabolic process
supercontig_3.423	Translation elongation factor EF1A initiation factor IF2gamma family isoform 4	2	11,5239	1,719827	Protein metabolism;
supercontig_1516.1	Lipoxygenase homology domain-containing 1-like	5	48,1977	1,632429	Response to stress; Oxylipin biosynthetic process;
supercontig_14.110	PREDICTED: uncharacterized protein At5g39570	9	64,4576	2,065906	UNKNOWN
supercontig_56.23	Cell division cycle 48 homolog	16	125,7883	1,868044	Developmental process; Cellular process; Metabolic process
supercontig_81.59	Ras-related Rab11C	10	65,0368	1,578863	Developmental process; Small GTPase mediated signal transduction; Metabolic process; Transport
supercontig_69.55	Probable nucleoredoxin 1	21	170,9466	1,819425	Response to stress; Developmental process; Cellular homeostasis
supercontig_94.58	Glycine-rich RNA-binding mitochondrial-like	4	34,2458	1,582815	Response to stress; Mitochondrial mRNA modification
supercontig_80.46	Acidic endochitinase	5	43,8247	1,772718	Response to stress; Carbohydrate metabolic process; Catabolic process
supercontig_12.91	DNA damage-inducible 1	3	16,4638	1,695773	Protein metabolic process
supercontig_66.86	Pollen-specific C13-like	5	36,6051	1,915919	UNKNOWN
supercontig_6.74	Probable indole-3-acetic acid-amido synthetase	35	356,3217	1,616999	Developmental process; Response to auxin; Response to light stimulus
supercontig_135.6	Glycine cleavage system H mitochondrial	3	23,9689	2,10323	Protein metabolism; Catabolic process; Cellular process

supercontig_1199.1	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex mitochondrial-like	5	29,7035	1,794942	Energetic process; Tricarboxylic acid cycle; Generation of precursor metabolites and energy;
supercontig_16.115	CASP 1D1	5	32,564	1,928695	Developmental process; Transport
supercontig_48.43	Mitochondrial Rho GTPase 1-like	4	22,8782	1,536276	Developmental process; Small GTPase mediated signal transduction; Cellular component organization; Energetic process
supercontig_106.98	ATP synthase subunit delta mitochondrial-like	5	31,9053	1,872471	Energetic process; ATP synthesis coupled proton transport; Nucleobase-containing compound metabolic process
supercontig_72.4	Probable ATP synthase 24 kDa mitochondrial	4	28,9166	1,800138	Energetic process; Proton transport
supercontig_14.100	Pentatricopeptide repeat-containing At5g15300	2	11,0986	2,176249	Developmental process; mRNA processing
supercontig_1.364	Actin-depolymerizing factor 2	3	26,932	1,90879	Developmental process; Defense response; Actin filament depolymerization

Tabela 4. Descrição e processos biológicos das proteínas DOWN-reguladas no tratamento (W_mB) em relação ao controle, durante a fase inicial da maturação dos embriões somáticos em mamoeiro.

Acesso	Descrição	Contagem de peptídeos	Score	"Fold Change"	Processo biológico
DOWN-REGULADAS					
supercontig_3387.2	Mother of FT and TFL1-like protein	2	10,939 5	0,307869	Developmental process; Positive regulation of seed germination; Response to abscisic acid
supercontig_42.86	Peroxidase N1-like	17	127,65 04	0,561339	Response to stress; Catabolic process; Cellular component organization;
supercontig_32.53	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase chloroplastic-like	10	81,152 6	0,465169	Energetic process
supercontig_188.19	Soluble inorganic pyrophosphatase 4	4	23,514 1	0,505092	Energetic process; Nucleobase-containing compound metabolic process
supercontig_17.152	Beta-thioglucoside glucohydrolase	14	132,61 04	0,479878	Carbohydrate metabolic process; Response to stress
supercontig_17.160	GDSL esterase lipase At5g45670-like	18	137,10 32	0,652861	Carbohydrate metabolic process
contig_29746.1	Beta-thioglucoside glucohydrolase	22	222,26 23	0,324883	Carbohydrate metabolic process; Response to stress
supercontig_21.148	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 3, chloroplastic	9	53,808 7	0,162221	Carbohydrate metabolic process; Biosynthetic process; Cellular process; Serine family amino acid biosynthetic process
supercontig_75.43	NHP2 1	3	19,545	0,493275	Developmental process; mRNA splicing, via spliceosome
supercontig_136.75	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit chloroplastic	2	10,985 9	0,468422	Carbohydrate metabolic process; Starch biosynthetic process
supercontig_119.97	Formate-tetrahydrofolate ligase	3	16,417	0,416961	Developmental process; Folic acid-containing compound biosynthetic process; Cellular process
contig_28829.1	Thioglucoside glucohydrolase	12	118,68 65	0,286615	Carbohydrate metabolic process; Response to stress;
supercontig_264.8	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100241465	20	177,88 13	0,550143	UNKNOWN

7. DISCUSSÃO

7.1. Efeitos da qualidade da luz na maturação de embriões somáticos:

A transferência dos calos para o meio de cultura livre de reguladores de crescimento vegetais, principalmente o 2,4-D, inibe a proliferação celular e estimula a maturação dos embriões somáticos. A progressão da maturação dos embriões somáticos na embriogênese somática são caracterizados por apresentarem elevados níveis de proteínas totais, intensa divisão celular e metabolismo hormonal, decrescendo mediante a progressão do desenvolvimento embriogênico (Rocha e Dornelas, 2013; Jariteh et al., 2015). Além do balanço dos reguladores de crescimento vegetal, outros fatores podem contribuir para a otimização do processo de desenvolvimento *in vitro*.

A influência da qualidade da luz como fator de modulação das respostas morfogênicas *in vitro* vêm sendo amplamente estudada, demonstrando sua importância no sucesso da cultura de tecidos vegetais (Sæbø et al., 1995; da Silva e Debergh, 1997; Shin et al., 2008; Edesi et al., 2014; Batista et al., 2016). Com popularização do uso da tecnologia de lâmpadas LED, estas surgem como uma atraente alternativa às tradicionais lâmpadas fluorescentes, principalmente pela capacidade em controlar os comprimentos de onda fornecidos à cultura e pela baixa emissão de calor.

Em nosso trabalho foi possível observar um maior número de embriões somáticos cotiledonares no tratamento W_mB, quando comparado ao Controle (Tab. 1 e 2) demonstrando que qualidade da luz interfere de maneira positiva na maturação de embriões somáticos do mamoeiro, mais especificamente a combinação de luz branca com azul médio.

O comprimento de onda azul tem sido correlacionado com efeitos positivos na embriogênese somática, indicando que a irradiação da luz azul em embriões somáticos de *Daucus carota* L. induziu a síntese de mRNAs que codificam proteínas responsáveis pela fase inicial da diferenciação dos cloroplastos (Aleith e Richter, 1991). Buscando otimizar os protocolos de indução da embriogênese somática em *D. carota*, Hoshino e Cuello (2005) notaram que o espectro azul exerceu efeito positivo no desenvolvimento de embriões somáticos durante os estádios globular, cordiforme e torpedo. (Lin et al., 2008), conseguiram diminuir o tempo necessário para germinação dos embriões somáticos de *Dimorcarpus longan* sob exposição à luz azul. As plântulas regeneradas foram mais vigorosas e suas folhas apresentavam intensa coloração verde. Em *Agave tequilana* Weber var. Azul, os autores demonstraram que a qualidade de luz azul, quando aplicada nas fases de indução e expressão da embriogênese somática, produziu o maior número de embriões e melhorou a eficiência nos processos de conversão e germinação desses embriões. Analisando a

influência de lâmpadas LED no potencial de regeneração de embriões somáticos em *Vitis vinífera* “Chardonnay”, foi observado que o comprimento de onda azul promoveu a conversão dos embriões somáticos em plântulas (Tittmann et al., 2013).

Os embriões somáticos derivados do tratamento W_mB (Fig. 3C e 3D), apresentaram melhores características morfológicas, quando comparados ao controle (Fig. 3A) e aos outros tratamentos (Fig. 3D, 3F, 3G e 3H). O aspecto opaco com coloração branco-amarelada também foi observado em embriões somáticos de *Persea americana* Mill (Perán-Quesada et al., 2004) e *Juglans regia* L. (Jariteh et al., 2015). Cortes histológicos, revelaram que as células epidérmicas dos embriões de *J. regia* exibiam grandes quantidades de grânulos de amido, enquanto que os embriões translúcidos com aspecto vítreo não possuíam essas estruturas (Jariteh et al., 2015). O acúmulo de substâncias de reserva como amido e proteínas na embriogênese somática, é uma etapa essencial, pois essas moléculas serão utilizadas como fonte de energia para a germinação, até a plântula se tornar autotrófica (Wang et al., 2014). A redução na síntese ou ausência desses compostos de reserva promove o aspecto translúcido nos embriões, assim como afeta severamente os últimos estádios do desenvolvimento, a germinação e conversão do embrião somático em plântula (Cailloux et al., 1996).

Por outro lado, o efeito do comprimento de onda vermelho também está relacionado com a promoção da embriogênese somática. D'Onofrio et al. (1998) concluíram que a luz vermelha, para *Cydonia oblonga*, é a mais efetiva na indução e produção de embriões somáticos. Assim como em calos de *Hyacinthus orientalis* L., a luz vermelha aumentou a indução, proliferação e conteúdo de carboidratos nos embriões somáticos, enquanto que a luz azul inibiu fortemente o crescimento (Bach e Krol, 2001). Em três espécies diferentes de *Pinus*, os autores relataram que a incidência da luz vermelha por lâmpadas LED na germinação dos embriões somáticos, elevou a frequência da germinação e conversão das plântulas (Merkle et al., 2006).

Os relatos encontrados na literatura até o momento, fornecem informações contrastantes quanto a participação da qualidade da luz na embriogênese somática, limitando a compreensão da relação entre a irradiação luminosa e o desenvolvimento *in vitro* (Altman e Hasegawa, 2011). Latkowska et al. (2000) avaliaram o efeito da qualidade da luz em culturas embriogênicas de três genótipos de *Picea abies* L. Karst, obtendo diferentes taxas de proliferação entre os genótipos. Kim e Moon (2014), também demonstram que embriões somáticos de quatro genótipos de *Pinus densiflora*, germinam com diferentes taxas de sucesso, quando expostos a lâmpadas LED com variados comprimentos de onda. Dessa maneira, as respostas da embriogênese somática em relação à qualidade da luz nas culturas embriogênicas tem ser mostrado ser genótipo-dependente.

Essas descobertas ressaltam a importância do atual trabalho, no fornecimento de bases para a compreensão dos fatores ambientais que afetam o rendimento da embriogênese *in vitro* do mamoeiro, como a qualidade da luz. O emprego da tecnologia LED na maturação dos embriões somáticos do mamoeiro, mostrou ter potencial para substituir as convencionais lâmpadas fluorescentes, aumentando significativamente a qualidade e a quantidade dos embriões somáticos maduros, fornecendo suporte para a otimização de protocolos para a embriogênese somática na espécie.

7.2 Análise proteômica comparativa

As análises proteômicas foram conduzidas a partir de calos coletados sob a exposição de lâmpadas LED nos comprimentos de onda branco e azul médio (tratamento W_mB) e lâmpadas tubulares fluorescentes (controle). Jariteh et al. (2015) constataram que na embriogênese somática, o conteúdo de proteínas totais aumentou durante a transição entre os estádios globular-cordiforme-torpedo e decresceu consideravelmente quando o embrião é considerado maduro, ou seja, no estágio cotiledonar. A grande quantidade de embriões somáticos encontrados nos estádios intermediários após 14 dias de transferência, evidenciou que neste momento os calos estão recebendo estímulos para adquirirem competência, se diferenciarem e progredirem para as próximas fases. Dessa maneira, as análises proteômicas se limitaram aos calos transferidos para o meio de cultura sem regulador, após 14 dias.

Para melhor visualização, a discussão foi agrupada pelos processos biológicos em que cada proteína é envolvida. Abordando as características e funções das proteínas que mais se destacam, assim como as implicações da regulação diferencial na maturação dos embriões somáticos do mamoeiro.

7.2.2 Proteínas atuantes nos processos de desenvolvimento:

- POLIGALACTURONASE:

É uma enzima que catalisa a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas entre os polímeros de pectina, um dos maiores constituintes das paredes celulares (Qiu e Erickson, 1996). As pectinas influenciam na porosidade e extensibilidade das paredes celulares, participando de forma fundamental no crescimento celular durante o desenvolvimento vegetal (Atmodjo et al., 2013). Um estudo recente em *Arabidopsis* demonstrou a atividade de genes que expressam a

poligalacturonase, participando na degradação da pectina em tecidos em expansão durante o desenvolvimento como plântulas, raízes e folhas (Wang et al., 2014).

Em *Quercus suber* L., Rodríguez-Sanz et al. (2014) definiram a presença de pectina nas paredes como um marcador para a proliferação e formação de embriões somáticos. Analisando marcadores de sequências genéticas expressas (EST) em calos embriogênicos de *Coffea*, os autores identificaram sequências que expressam a proteína poligalacturonase, estabelecendo uma relação entre essa enzima e o mecanismo de degradação da pectina na embriogênese somática (Silva et al., 2013).

Em nossos estudos, a poligalacturonase foi regulada positivamente, sendo expressa aproximadamente 3,8 vezes a mais que as outras proteínas (Tab. 4). Esses resultados estão de acordo com a literatura, sugerindo um papel determinante dessas enzimas no processo de formação dos embriões somáticos através de modificações na parede celular, especificamente catalisando a degradação de pectina, que permitem o desenvolvimento celular.

- GERMIN:

As proteínas Germin-like, constituem uma diversa família de glicoproteínas, com diferentes atividades bioquímicas como oxidação do oxalato e em outras funções no desenvolvimento como, na germinação. Essas proteínas vêm demonstrando ter importante atividade enzimática, estrutural, como receptora durante a embriogênese somática, em resposta a estresse salino e ataque de patógenos (Yang e Zhang, 2010).

Lippert et al. (2005) empregando análises proteômicas em *Picea glauca* Hort., encontraram a presença de proteínas germin em todos os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos, com um substancial aumento nas fases iniciais de formação do embrião. Mathieu et al. (2006) sugerem que as germin-like atuam no remodelamento e metabolismo da parede celular de embriões somáticos, pela quebra oxidativa dos polissacarídeos e interação com o complexo pectina-poligalacturonase.

Essa proteína foi regulada positivamente no tratamento (Tab. 4), o que nos leva a sugerir que os embriões tratados possuem melhor controle dos processos de crescimento e desenvolvimento, favorecendo a correta embriogênese somática. Resultados similares foram obtidos por Caliskan et al. (2004) em calos embriogênicos de *Triticum aestivum* L, em *Zea mays* (Salvo et al., 2014) e no desenvolvimento de embriões somáticos de *Pinus pinaster* Ait. (Morel et al., 2014). Por consequência, as proteínas Germin-like podem ser consideradas como biomarcadoras da embriogênese somática (Barman e Banerjee, 2015).

- ANKYRIN REPEAT DOMAIN:

As proteínas Ankyrin são conhecidas por conter um domínio ANK de 33 aminoácidos, responsável por mediar as interações proteínas-proteínas, recrutando substratos para os sítios catalíticos e estabilizando as suas conformações (Vo et al., 2015). Essas proteínas estão envolvidas em inúmeras respostas no desenvolvimento como ciclo celular, transdução de sinais e diferenciação celular (Yoo et al., 2011). Existe a possibilidade de algumas proteínas possuírem além do domínio ANK, outros domínios que conferem características adicionais, como o E3 e o RF, proporcionando atividade ubiquitina-ligase e regulação transcricional, respectivamente (Vo et al., 2015).

Estudos realizados com *Arabidopsis* possuindo mutações no gene EMB 506, que codifica uma proteína com cinco domínios ANK, resultou em embriões estacionados no estágio globular (Albert et al., 1999). Garcion et al. (2006), demonstraram que outra proteína ankyrin, AKRP, interage com EMB 506, formando um complexo essencial na biogênese dos cloroplastos. Mutantes para ambas proteínas geram embriões defeituosos. Bae et al. (2008) identificaram uma proteína com repetições ankyrin em *Arabidopsis* e sua homóloga (AKR2A e AKR2B), que possuem atividade chaperona para proteínas da membrana externa do envelope do cloroplasto. Além disso, atuam como mediadoras citosólicas, selecionando e direcionando as proteínas 7 do envelope externo (OEP7), facilitando sua entrada nos cloroplastos. Mutantes *knockout* para *akr2b* mostraram severa diminuição nos níveis de proteínas do cloroplasto e biossíntese defeituosa dessas organelas. Dessa maneira, essa proteína demonstrando que esse domínio proteico é essencial para a normal embriogênese e outras etapas do desenvolvimento vegetal.

A identificação da proteína Ankyrin repeat domain-containing 2 de forma UP-regulada no atual trabalho (Tab. 4), pode ter relação com a incidência do comprimento de onda azul fornecido na maturação dos embriões somáticos. Da mesma forma que esta proteína possui relação com a biossíntese dos cloroplastos, a incidência da luz azul em embriões somáticos de *Daucus carota* promove um aumento nas proteínas cloroplastidiais, favorecendo a diferenciação dessas organelas (Aleith e Richter, 1991). Portanto, esses fatores são um indicativo de que os embriões somáticos tratados, podem apresentar maior eficiência na biossíntese e diferenciação dos cloroplastos e consequentemente melhor germinação.

- UDP-ÁCIDO GLUCURÔNICO DESCARBOXILASE:

Diversos polissacarídeos constituintes da parede celular como os xiloglucanos e xilanos necessitam do açúcar UDP-xilose (UDP-Xyl) para sua síntese (Pattathil et al., 2005). Dentre as enzimas participantes no processo, a UDP-ácido glucurônico descarboxilase (Uxs) converte o

UDP-ácido glucurônico (UDP-GlcA) em UDP-Xyl dependendo de NAD⁺ (Harper e Bar-Peled, 2002). A regulação desse complexo enzimático é de extrema importância, pois determina o espessamento/afrouxamento das paredes celulares, interferindo na pressão de turgor e por consequência, na expansão celular (Yue et al., 2016).

Bai et al. (2016) empregaram a proteômica para avaliar o efeito do estresse salino em raízes de *Avena sativa* L., percebendo que a condição estressante por período prolongado diminuiu o crescimento desses órgãos. A diminuição no conteúdo da enzima Uxs no tecido, diminuiu a síntese de UDP-Xyl interferindo na correta formação da parede celular nas raízes.

Em embriões zigóticos de *Glycine max* L., o nível de UDP-GlcA aumenta gradativamente de acordo com a progressão da embriogênese. Os autores ainda relatam a participação do Mio-inositol como substrato para a biossíntese de UDP-GlcA (Litterer et al., 2006). Em nossas análises, foi constatada a regulação positiva das isoformas UDP-glucuronic acid decarboxylase 6-like e UDP-XYL synthase 6 isoform 1 (Tab. 4), ambas pertencentes a família gênica UXS (UDP-Xylose synthase). Essas enzimas podem estar correlacionadas com um possível aumento no nível endógeno de UDP-GlcA, causado pelo mio-inositol presente no meio de cultura, e consequentemente, aumentando a síntese do carboidrato UDP-Xyl. A regulação positiva das UXS's, demonstra que em tecidos pouco diferenciados, como nos embriões somáticos, é necessária a presença de enzimas e proteínas relacionadas com a síntese da parede celular, promovendo o correto crescimento e desenvolvimento celular.

- PEQUENAS PROTEÍNAS GTPase's:

São pequenas proteínas ligantes à GTP's (Guanosina trifosfato) classificadas de acordo com sua estrutura e função. Nas plantas são agrupadas em 4 famílias: Rab, Rho, Arf e Ran (Ma, 2007). Elas funcionam como interruptores moleculares, alternando entre o estado ativo quando ligadas ao GTP e inativo ligadas ao GDP (Bourne et al., 1990). Dessa maneira, atuam transduzindo sinais, regulando uma série de processos biológicos como proliferação celular, organização do citoesqueleto e tráfego intracelular entre membranas (Vernoud et al., 2003).

Uma subclasse de proteínas da subfamília Rab-GTPase, Rab-A2 e Rab-A3, foi identificada em pontas das raízes de *Arabidopsis*. Durante a citocinese na divisão celular, essas proteínas estão localizadas nas margens crescentes da placa celular (lamela média). A junção dessas moléculas forma um compartimento trans-Golgi que se comunica com a membrana plasmática e o novo sistema endossomal, contribuindo substancialmente para o estabelecimento do plano de divisão celular. Mutantes RAB-A2^a resultaram em células meristemáticas alargadas, polinucleadas e com um esboço de parede celular (Chow et al., 2008).

Trabalhando com calos embriogênicos em *Dimorcarpus longan* Lour., determinaram fundamental participação de um membro da família Ran (DlRan3A) durante a embriogênese somática. Essa pequena proteína foi induzida por fitohormônios, estresse osmótico e salino. Também foram observados domínios responsivos à luz na DlRan3A, em que o comprimento de onda verde estimulou a expressão dessa proteína e os comprimentos de onda branco, azul e vermelho não exerceram mudanças significativas. Portanto, os autores sugerem a influência de sinais ambientais, na participação direta ou indireta do DlRan3A regulando o ciclo celular e processos relacionados com a competência embriogênica.

Para os embriões tratados, foi observada a presença UP-regulada de dois membros da subfamília Rab: Rab6 e Ras-related Rab11C (Tab. 4). Essa subfamília proteica regula principalmente, o tráfego interno de vesículas do retículo endoplasmático, para o complexo de Golgi (Ma, 2007). Diversas Rab's são encontradas em diferentes vesículas e organelas, e sua função depende de sua localização (Agarwal et al., 2009). Domoki et al. (2006) identificaram e caracterizam o gene 2-6_RAB que codifica uma proteína Rab e o relacionaram com a aquisição da competência embriogênica em protoplastos de *Medicago sativa*. Culturas de células de *Silybum marianum* quando induzidas por metil jasmonato e metil ciclodextrina, regularam positivamente a expressão da proteína Rab11C-like (Corchete e Bru, 2013). Em um genótipo embriogênico de *Cichorium intybus*, os autores observaram que durante a embriogênese somática houve um aumento na transcrição de um gene da família Rab5, enquanto que o mesmo gene não foi expresso no genótipo não-embriogênico. Entretanto, para ambas cultivares foram identificados ao menos, dois transcritos homólogos, indicando que outros membros da família de pequenas proteínas GTPase's são expressos constitutivamente (Randoux et al., 2002). Em *Pinus pinaster* a proteína Rab1 foi identificada durante os estádios iniciais da embriogênese zigótica, exercendo papel fundamental no início da maturação dos embriões (Nogueira et al., 2007). Portanto, é sugerido que a subfamília Rab-GTPase's possui forte influência nos processos de diferenciação celular, crescimento e desenvolvimento de órgãos e tecidos, visto que seus membros atuam na transdução de sinais nas membranas, no efetivo transporte de vesículas, ligando-se as membranas-alvo e na reciclagem de componentes da parede celular (Randoux et al., 2002; Nielsen et al., 2008; Corchete e Bru, 2013).

No atual estudo, também foi identificada a proteína Mitochondrial Rho GTPase 1-like de forma UP-regulada (Tab. 4). Devido a similaridades no domínio N-terminal, inicialmente as Miro GTPase (Mitochondrial Rho GTPase) foram agrupadas à subfamília Rho-GTPase. Entretanto, suas diferentes formas estruturais e propriedades funcionais, a colocaram como uma nova subfamília, da superfamília das pequenas GTPases (Reis et al., 2009). As proteínas Miro contém dois domínios

GTPases e dois motivos *EF-hand* ligantes a Cálcio (Ca^{2+}) e são associadas à membrana mitocondrial externa, através do domínio C-terminal trans-membrana (Saotome et al., 2008). No genoma de *Arabidopsis*, existem dois genes codificando proteínas Miro (MIRO1 e MIRO2), que são transcritos em todos tecidos da planta e seus produtos localizados na mitocôndria. Mutações no gene MIRO1 impedem a embriogênese causando letalidade nos embriões zigóticos e prejudicam a germinação dos polens e crescimento do tubo polínico. Os autores sugerem que o gene MIRO1 é essencial para o correto desenvolvimento vegetal, pois regula diretamente a morfologia e distribuição intracelular das mitocôndrias (Yamaoka e Leaver, 2008).

- S-ADENOSILMETIONINA SINTASE:

A enzima S-adenosilmetionina sintase (SAMS) catalisa a formação de S-adenosilmetionina (SAM) a partir de metionina e ATP (Van Breusegem et al., 1994). A SAM é uma doadora universal de grupos metil em diversas reações de transmetilações e atua regulando a biossíntese dos aminoácidos metionina e asparagina. Também são precursoras de fitohormônios como etileno e atuam na biossíntese das poliaminas (Sánchez-Aguayo et al., 2004).

Estudando o efeito do agente osmótico PEG em raízes de plântulas de algodão resistentes e susceptíveis ao estresse hídrico, os autores encontraram de forma UP-regulada e DOWN-regulada, respectivamente, a enzima SAMS. Estabelecendo uma relação entre a proteína e às respostas tolerantes (Zhang et al., 2016). Sánchez-Aguayo et al. (2004) demonstraram que o silenciamento do gene SAMS em tomate, reduz a lignificação dos tecidos da raiz, prejudicando a comunicação célula-célula, afetando o transporte de água e aumentando a absorção de íons, provocando a susceptibilidade ao estresse hídrico. Sob estresse salino, a proteína SAMS foi mais expressa em cultivares resistentes de cevada (Witzel et al., 2009) e trigo (Guo et al., 2012). Ambos autores sugeriram que a enzima está envolvida na detoxificação dos ROS nas células e na manutenção da homeostase iônica.

Nossas análises identificaram que a proteína S-adenosylmethionine synthase 2 (SAMS2) foi UP-regulada, sendo expressa 2 vezes a mais que as outras proteínas (Tab. 4). O gene *sam-2* foi altamente expresso em calos de *Arabidopsis* (Peleman et al., 1989). A enzima foi detectada durante a embriogênese zigótica de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Balbuena et al., 2009). Em calos nodulares de *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a enzima SAMS3 foi diferencialmente expressa durante a indução (Corredor-Prado et al., 2016). Lippert et al. (2005) caracterizaram três membros das proteínas SAMS durante o início da embriogênese somática de *Picea glauca*. Culturas embriogênicas de *A. angustifolia* produziram em grande quantidade a enzima SAMS, em conjunto com etileno e ROS (Jo et al., 2013). Altos níveis de metilação do DNA são observados durante a

embriogênese somática, sendo fundamentais para a remodelação da cromatina e exposição seletiva de genes necessários para o crescimento dos embriões somáticos (De-la-Peña et al., 2015). Li et al. (2011) ainda relatam a influência da qualidade da luz nos padrões de metilações do DNA. Adicionalmente, já é estabelecido que as poliaminas participam fundamentalmente nas etapas de indução e maturação na embriogênese somática (Reis et al., 2016; Satish et al., 2016). Nossos resultados reforçam a importância dessa enzima nos tecidos embriogênicos, sugerindo sua participação nos processos de detoxificação celular, fornecimento de energia, controle da metilação de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos, biossíntese de poliaminas e etileno, manutenção da homeostase e formação da parede celular.

- SERINA/TREONINA FOSFATASE 2A:

A fosforilação reversível de proteínas é uma das mais importantes e estudadas regulações pós-traducionais em eucariotos, envolvidas na troca da atividade celular de um estado, para outro. Dessa maneira, as células conseguem responder aos sinais extracelulares, como hormônios e luz, regulando a expressão de genes, proliferação e diferenciação celular (Lechward et al., 2001; Bigeard et al., 2014).

Diferentes formas de proteínas serina/treonina fosfatases (PPP) já foram purificadas, denominadas tipo PP1, PP2/PP2A, PP3/PP2B e PP2C. Em plantas, são observadas formas adicionais dessas proteínas como as PP4, PP5 e PKLs (*protein phosphatase with Kelch-like repeat domains*) e não se encontra o tipo 2B (Kerk et al., 2008). Elas são agrupadas com base em sua sequência primária e mecanismo catalítico. A proteína fosfatase 2A (PP2A) é uma holoenzima heterotrimérica, constituída pelas subunidades: catalítica com 34 kDa (PP2A_C), estrutural/regulatória com 65kDa (PP2A-A1) expressas constitutivamente e a subunidade variável regulatória (PP2A-B). A subunidade estrutural/regulatória A existe em duas isoformas (α e β) e atua como uma ponte, permitindo a formação do complexo heterotrimérico (DeLong, 2006).

Em Arabidopsis, foi mostrado que o gene RCN1 (*Roots curl in naphthylphthalamic acid 1*) codifica a subunidade A, da enzima PP2A (PP2A-A1) (Garbers et al., 1996). Buscando entender o papel dessa subunidade, os mutantes *rcn1* já foram aplicados em diversos cenários. Plântulas mutantes apresentaram deformidades no fenótipo como raízes malformadas, hipocótilos pouco alongados (Garbers et al., 1996), defeito no alongamento diferencial das células e a atividade da proteína PP2A caiu duas vezes, comparando-se o mutante com o selvagem (Deruère et al., 1999). Ainda foi observado que no mutante *rcn1*, o transporte polar de auxina é alterado, assim como as respostas gravitacionais e o crescimento das raízes laterais (Rashotte et al., 2001). Kwak et al. (2002) apontaram que esses mutantes exibiam reduzida resposta ao ácido abscísico (ABA). Em

mutantes duplos (*rcn1-1*) os autores demonstraram que as PP2A-A1 atuam desfosforilando as fototropinas 2 (*phot2*). As *phot2* são proteínas receptoras da luz azul, e ativas quando fosforiladas. Portanto, as PP2A-A1 também estão envolvidas na regulação das respostas à luz azul (Tseng e Briggs, 2010).

De acordo com a tabela 3, a proteína Serine threonine- phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform (PP2A-A1) foi UP-regulada no tratamento, em relação ao controle. Em embriões zigóticos de *Arabidopsis*, a construção *PP2AA1,2,3::GUS*, revelou atividade transcricional dos 3 genes (PP2A1, PP2A2 e PP2A3) nos primeiros dias de desenvolvimento. Os genes repórteres *PP2AA1::GUS* e *PP2AA1::PP2AA1::GFP* mostraram intensa expressão por todo embrião durante o estágio globular. Embriões mutantes *pp2aa1* desenvolveram aberrações severas como cotilédones deformados e com falta de definição no padrão apical-basal. Mutantes *pid*, para as proteínas quinase PINOID, responsáveis por fosforilar os receptores de auxina (PIN) foram estudados em conjunto com mutantes *pp2aa1*, demonstrando efeito antagonista. Dessa maneira, os autores definiram que as PP2A-A1 atuam de forma substancial na embriogênese de *Arabidopsis*, mais especificamente na determinação do padrão apical-basal, coordenando o fluxo de auxina juntamente com as proteínas PINOID (Michniewicz et al., 2007). Para a embriogênese somática em *vitis vinífera*, os autores detectaram um *spot* correspondendo a PP2A-A1 (Marsoni et al., 2008). Em calos embriogênicos de *C. persicum*, a PP2A-A1 foi identificada em altos níveis, enquanto que nas células não-embriogênicas não foi encontrada Lyngved et al. (2008). Sendo assim, a PP2A tem uma atividade regulatória multifuncional, atuando em inúmeras etapas do desenvolvimento vegetal. E a PP2A-A1 em específico, pode ser considerada uma marcadora bioquímica da embriogênese somática, atuando no transporte de auxina, estabelecimento do padrão apical-basal, mediando a recepção dos hormônios brassinosteróides e ABA além de participar regulando a recepção do comprimento de onda azul.

- PROTEÍNA DO CICLO DE DIVISÃO CELULAR 48:

As proteínas do ciclo de divisão celular 48 (CDC48), são membros da família AAA⁺ (ATPases associadas a diversas atividades celulares), que abrangem um grupo altamente conservado e ubíquo de chaperonas moleculares (Neuwald et al., 1999). A família proteica AAA⁺ é caracterizada por conter um (tipo I) ou dois (tipo II) domínios ATPase responsáveis pela ligação ao ATP e hidrólise. As proteínas CDC48 pertencem ao tipo II da família AAA⁺ (Rancour et al., 2004).

Genes que codificam a proteína CDC48 em *Arabidopsis*, AtCDC48, são altamente expressos em tecidos meristemáticos e células em expansão, porém em células diferenciadas não

são observados (Dey et al., 1998). Estudos com células em divisão de *Arabidopsis*, demonstraram que os genes *AtCDC48* participam no tráfego de vesículas na membrana, durante a formação da placa celular na citocinese, regulando o plano de divisão celular (Rancour et al., 2002). Embriões mutantes *Atcdc48A^{T-DNA}* não conseguiram passar do estágio cordiforme do desenvolvimento, por apresentarem defeitos na citocinese, expansão celular e diferenciação. Evidenciando o importante papel da proteína CDC48 na embriogênese (Park et al., 2008).

Em nossas análises, a proteína Cell division cycle 48 homolog (CDC48) foi regulada positivamente, como mostrado na tabela 3. Aker et al. (2006) demonstraram que a CDC48 colocaliza com um receptor transmembrana, expresso pelo gene *SERK1* (*Somatic embryogenesis receptor like kinase 1*), no retículo endoplasmático e na membrana plasmática de protoplastos, demonstrando uma interação direta, proteína-proteína, entre o *SERK1* e a CDC48. Neste mesmo sentido, foi provada a existência de sítios de ligação das proteínas 14-3-3 na estrutura da CDC48, sugerindo interação entre elas. As proteínas 14-3-3 são necessárias para a correta fosforilação dos domínios quinase das *SERK1*. Dessa maneira, os autores estabeleceram um complexo de interações entre *SERK1*, CDC48 e 14-3-3 (Rienties et al., 2005). Diversos estudos já demonstraram a participação do *SERK1* na indução da totipotência, na defesa contra estresses, e na percepção dos hormônios brassinosteróides (Fan et al., 2016). Mutantes não apresentam correto desenvolvimento e normalmente são letais (Aker et al., 2006). Thibaud-Nissen et al. (2003) evidenciaram que embriões somáticos de *G. max* acumularam transcritos relacionados à proteína CDC48 durante os picos de proliferação celular, nos primeiros sete dias. Assim como em *C. persicum*, a proteína CDC48 foi encontrada em abundância em todos os estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos (Rode et al., 2012). Em *Nelumbo nucifera* Gaertn, Liu et al. (2016) sugeriram que a proteína CDC48 é essencial para a formação de calos embriogênicos e para o desenvolvimento dos cotilédones nos embriões somáticos. Suspensões de células embriogênicas em *Vigna unguiculata* L. Walp também apresentaram a proteína CDC48 (Nogueira et al., 2007). Em suma, podemos concluir que as proteínas CDC48 atuam positivamente na indução e manutenção da embriogênese somática, controlando a expansão celular e mediando o estabelecimento do complexo *SERK1*-CDC48-14-3-3 e suas transduções de sinais.

-ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO AMIDO SINTETASE:

Na embriogênese somática, a ação das auxinas é determinante na indução da competência, principalmente pela alteração na polaridade celular, induzindo a divisão celular assimétrica e pelo controle do alongamento celular (von Arnold et al., 2002). As auxinas induzem a expressão de três

famílias gênicas: SAUR (*Small auxin-up RNA*), GH3 e Aux/IAA (*Auxin/índole-3-acetic acid*) (Ding et al., 2008).

Um dos primeiros genes responsivos à auxina descrito, foi isolado em *G. max* há mais de vinte anos por (Hagen e Guilfoyle, 1985). Staswick et al. (2005) examinaram a função enzimática da família GH3, identificando vários genes que codificam a enzima ácido indol-3-acético amido sintetase (IAA-amido sintetase). Mutantes *gh3.1-1*, *gh3.2-1*, *gh3.17-1* e *gh3.5-1* revelaram que essa enzima atua conjugando a auxina excedente em aminoácido, ajudando na manutenção da homeostase hormonal.

A regulação positiva da proteína indole-3-acetic acid-amido synthetase (IAA-amido sintetase) em nosso trabalho (Tab. 4), está de acordo com os recentes trabalhos descritos. Análises com cDNA-AFLP em calos embriogênicos de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* indicaram a expressão do gene GH3.1, que codifica a proteína IAA-amido sintetase (Maldonado-Borges et al., 2013). Utilizando a transcriptômica na embriogênese somática de *Gossypium hirsutum* cv. YZ1, foi observado um acúmulo no gene GH3, que codifica a enzima IAA-amido sintetase (Jin et al., 2014). Através da proteômica, em calos embriogênicos de *N. nucifera*, foram identificadas proteínas IAA-amido sintetase, 10 e 20 dias após a indução dos calos (Liu et al., 2016). Em cana-de-açúcar, calos embriogênicos tratados com putrescina mostraram grande quantidade da proteína IAA-amido sintetase, sendo a proteína mais abundante, após 28 dias de maturação (Reis et al., 2016). A presença da enzima IAA-amido sintetase na embriogênese somática tem demonstrado ser essencial, principalmente nos estádios tardios, regulando a homeostase de auxina através da conjugação desse hormônio.

- PROTEÍNAS CONTENDO REPETIÇÕES PENTATRICOPEPTÍDEO:

As proteínas contendo repetições pentatricoptetídeos (PPR) na grande maioria possuem atividade RNA-ligase sequência-específica, direcionando e processando os RNAs para organelas, principalmente mitocôndria e cloroplasto (Schmitz-Linneweber e Small, 2008). A primeira identificação gênica relacionada às proteínas PPRs foi realizada em *Arabidopsis* por Small e Peeters (2000), caracterizando a família pela presença de múltiplas repetições em tandem, de motivos com 35 aminoácidos.

Já é estabelecida a participação das proteínas PPRs, na biogênese dos cloroplastos e mitocôndrias. Elas geralmente atuam no processamento, splicing, clivagem e tradução de RNAs organelares (Schmitz-Linneweber e Small, 2008). A mutação recessiva *crp1* implica na perda do complexo citocromo *b₆f* e de parte do fotossistema I. A proteína CRP1 (*Chloroplast RNA processing 1*) é uma PPR necessária para a tradução dos transcritos *petA* e *psaC*, que codificam as

subunidades dos citocromos e fotossistemas, respectivamente (Barkan et al., 1994). Além disso, foi demonstrado que as proteínas CRP1 são componentes de um complexo de subunidades múltiplas, agindo de forma análoga aos cloroplastos, na biossíntese das mitocôndrias (Fisk et al., 1999).

Nos últimos anos, inúmeros trabalhos vêm identificando diferentes genes que codificam proteínas PPRs e os relacionando com a embriogênese vegetal. Cushing et al. (2005) caracterizaram mutantes *Embryo-defective175* de *Arabidopsis* e identificaram o gene EMB175, que codifica uma PPR. Os mutantes apresentavam organização celular desordenada e paravam o desenvolvimento antes da transição globular-cordiforme. Mutantes *knockout pprp* revelaram ser letais nas primeiras etapas do desenvolvimento e quando não letais, formavam cotilédones atrofiados, estabelecendo a presença de outros genes PPR na morfogênese do embrião. Outro membro das PPR, a GRP23 (*Glutamine-rich protein23*) é localizada no núcleo, e responsável por regular a expressão gênica durante o início da embriogênese, interagindo com a subunidade III da RNA polimerase II (Ding et al., 2006). O gene cloroplastidial PPR2 de *Arabidopsis*, se liga à subunidade 23S dos rRNAs plastidiais, modulando os processos traducionais nos plastídeos. Mutações no gene PPR2 (*Atppr2*) causam retenção na embriogênese levando à letalidade do embrião, evidenciando a necessidade de plastídeos funcionais para a divisão celular (Lu et al., 2011). A caracterização molecular do gene FAC19 (*embryonic factor19*) revelou a codificação de uma proteína PPR mitocondrial. Embriões mutantes *fac19* ficaram retidos nas primeiras etapas do desenvolvimento. Sugerindo o envolvimento dessas proteínas no processamento de RNAs essenciais para as funções mitocondriais e consequentemente para a ativação da embriogênese zigótica (Yu et al., 2012).

Assim como na embriogênese zigótica, também é relatada a influência das PPRs na embriogênese somática. Em *Fraxinus angustifolia* Vhal., análises com cDNA-AFLP revelaram a expressão de PPRs durante os estádios globulares (Zamboni et al., 2005). Genes codificando proteínas PPRs foram isolados e associados à embriogênese somática de algodão (Zeng et al., 2006). No atual trabalho, a proteína Pentatricopeptide repeat-containing At5g15300 (PPR) foi uma das mais abundantes e observada de forma UP-regulada (Tab. 4). Recentes estudos proteômicos com *Cyphomandra betacea* (Correia et al., 2012), *C. papaya* (Vale et al., 2014), *Fraxinus mandshurica* Rupr. (Liu et al., 2015) e *Elaeis guineensis* Jacq (Tan et al., 2016) também identificaram proteínas PPRs durante a embriogênese somática, corroborando com nossos dados. Esses relatos nos fazem sugerir a fundamental participação dessas proteínas nos processamentos pós-transcricionais, na biogênese das mitocôndrias e plastídeos, fornecendo o cenário ideal para a correta progressão embriogênica.

-BOMBAS DE PROTONS MEMBRANARES:

As plantas possuem proteínas integrais de membrana capazes de controlar o gradiente de pH, entre a organela e o citosol, podendo-se destacar três famílias: Tipo-P, H⁺-adenosina trifosfatase (P-ATPase), H⁺ATPase vacuolar (V-ATPase) e H⁺-pirofosfatases (H⁺-PPases). Essas estruturas são importantes elementos para as comunicações célula-célula e célula-ambiente nos vegetais (Schulz, 2011). Em nosso trabalho identificamos uma proteína de forma UP-regulada, da família V-PPase: Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump 1 (Tab. 4).

Essas proteínas são encontradas nos tonoplastos (membranas dos vacúolos) e atuam como bombas de prótons, estabelecendo uma diferença no potencial eletroquímico entre o citosol e a organela. São responsáveis pela acidificação dos vacúolos, utilizando a hidrólise dos pirofosfatos (PP_i) como fonte de energia (Seidel et al., 2013). Em plantas as V-PPase são divididas em dois grupos: Tipo 1 – Ativas por K⁺ e menos sensíveis a íons Ca²⁺; Tipo 2 – Insensíveis a K⁺ e hipersensíveis a Ca²⁺ (Schulz, 2011). A alta atividade dessas proteínas nos vacúolos dos tecidos em desenvolvimento, sugere sua participação no crescimento celular (Maeshima, 1990).

7.2.3. *Metabolismo energético:*

- DIIDROLIPOIL ACETILTRANSFERASE E SUCCINILTRANSFERASE:

O complexo multienzimático piruvato desidrogenase (PDC) catalisa a descarboxilação oxidativa do piruvato à acetil-CoA e CO₂. Ele contém diferentes formas enzimáticas agrupadas em três componentes: piruvato desidrogenase subunidades α e β (E1), diidrolipoil acetiltransferase (E2) e diidrolipoamido desidrogenase (E3) (Baud e Lepiniec, 2009). A subunidade E2 transfere o grupamento acetil de seu grupo prostético lipoil, para a coenzima-A (Luethy et al., 2001). O complexo PDC em plantas é localizado na matriz das mitocôndrias e no estroma dos cloroplastos, geralmente ligado ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e via glicolítica, exercendo papel fundamental no controle das rotas metabólicas e biossíntese de ácidos graxos (Tovar-Méndez et al., 2003).

Neste mesmo sentido, o complexo 2-oxoglutarato desidrogenase (OGDC) se encontra nas mitocôndrias e participa na conversão do 2-oxoglutarato à Succinil-CoA e NADH, igualmente contendo três componentes: 2-oxoglutarato desidrogenase (OGDC-E1), diidrolipoil succiniltransferase (OGDC-E2) e lipoamida desidrogenase (OGDC-E3) (Millar e Leaver, 1999). Portanto, o complexo enzimático OGDC é análogo ao PDC, demonstrando igual importância.

Comparando o desenvolvimento das folhas primárias de plântulas com folhas maduras em *Pisum sativum* L., (Luethy et al., 2001) verificaram que a atividade catalítica do complexo PDC,

aumentou em paralelo à expressão dos transcritos E1 α , E1 β e E2 nos tecidos em desenvolvimento, caindo profundamente ao passo que o órgão se torna maduro e fotossintético. A mutação induzida no gene plastidial E2 (*pIE2*) em embriões, quando em homozigose, é letal (Lin et al., 2003). Da mesma forma, que a mutação no gene mitocondrial *mtE2-2* gera embriões letais (Song e Liu, 2015). Plantas transgênicas de *Solanum lycopersicum* L. expressando uma sequência antisenso do gene OGDC-E1 exibem atividade enzimática do complexo OGDC reduzida, promovendo baixas taxas de respiração, crescimento restrito dos órgãos, perfis metabólicos alterados, incluindo modificações nos intermediários do TCA e dos aminoácidos (Araújo et al., 2012). Estudando o efeito do estresse salino nos eixos embrionários de *Lupine luteus* L., os autores identificaram a expressão da proteína mitocondrial dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase (E2) em resposta à condição estressante (Wojtyla et al., 2013). Nossa pesquisa encontrou de forma UP-regulada as proteínas dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 2 of pyruvate dehydrogenase mitochondrial-like (E2), e dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex mitochondrial-like (OGDC-E2), concordando com os resultados citados e permitindo apontar a importância do correto funcionamento das mitocôndrias, plastídeos e suas proteínas relacionadas, no fornecimento energético, biossíntese de ácidos graxos e aminoácidos durante o desenvolvimento vegetal sob condições estressantes, como a embriogênese somática.

- TRIOSE-FOSFATO ISOMERASE

As enzimas triose-fosfato isomerase (TPI) participam diretamente na glicólise, catalisando a interconversão reversível de diidroxiacetona fosfato em D-gliceraldeído-3-fosfato (Anderson, 1971). Além disso, são fundamentais em outras rotas metabólicas como gliconeogênese, biossíntese de ácidos graxos, via das pentoses-fosfato e na fixação de CO₂ fotossintético (Xu e Hall). As TPIs podem ser encontradas no citosol, participando majoritariamente das vias glicolíticas e nos cloroplastos, no ciclo de Calvin (Henze et al., 1994). Geralmente a enzima do citosol, é codificada por apenas um gene (Xu e Hall, 1993) e sofre glutationilações que regulam suas funções (Ito et al., 2003).

Meyer et al. (2012) constataram a expressão das proteínas TPIs em embriões de arroz, relacionando-as aos estádios iniciais do desenvolvimento. Winkelmann et al. (2006) observaram maior acúmulo das proteínas TPIs em embriões somáticos, quando comparados aos embriões zigóticos. Nossas pesquisas permitiram identificar que a isoforma Triosephosphate isomerase, cytosolic (cTPI) participa de maneira UP-regulada (Tab. 4) nas fases iniciais do desenvolvimento dos embriões somáticos. A proteína cTPI foi expressa unicamente em embriões somáticos de *C.*

papaya tratados com PEG (Vale et al., 2014). Estudos empregando a proteômica na embriogênese somática com outras espécies como *V. unguiculata* (Nogueira et al., 2007), *A. angustifolia* (Balbuena et al., 2009), *C. persicum* (Rode et al., 2012), *Vanilla planifolia* Andrews (Tan et al., 2013), *Q. suber* (Gomez-Garay et al., 2013), *E. guineenses* (Silva et al., 2014), *Larix principis-rupprechtii* Mayr. (Zhao et al., 2015) e *Theobroma cacao* L. (Niemenak et al., 2015), também encontraram de forma UP-regulada as proteínas TPI. Podemos inferir, que as proteínas envolvidas na via glicolítica ajudam a fornecer energia de forma efetiva, para os tecidos não clorofilados, como os embriões, disponibilizando o ATP necessário para o crescimento e desenvolvimento celular (Lyngved et al., 2008).

- ATP-SINTASE:

O complexo ATP-sintase ou complexo V, está inserido no espaço inter-membrana mitocondrial e faz parte da cadeia transportadora de elétrons, convertendo o gradiente eletroquímico em ATP (Rakhmankulova, 2014). A estrutura do complexo consiste em uma fração hidrofílica contendo o sítio de ligação nucleotídica localizado na matriz (F_1) e a outra atuando como um canal de prótons ligado na membrana interna (F_0) (Hatefi, 1993). Em *Arabidopsis*, a fração F_1 é bem caracterizada, composta por 5 subunidades: α , β , γ , δ , e ε (Heazlewood et al., 2003).

As culturas submetidas ao tratamento W_mB regularam positivamente duas proteínas pertencentes ao complexo V: ATP synthase subunit delta mitochondrial-like e ATP synthase 24 kDa mitochondrial. Resultados similares foram obtidos por (Lippert et al., 2005; Lyngved et al., 2008; Sghaier-Hammami et al., 2009; Liu et al., 2015; Niemenak et al., 2015). Noah et al. (2013) sugerem que a presença de enzimas relacionadas a fosforilação oxidativa nos embriões somáticos, indica maior atividade aeróbica/respiratória. Em embriões somáticos de *Abies alba* Mill., o aumento nos níveis de ATP foi interligado à maturação (Petrussa et al., 2009). Adicionalmente, já foi demonstrado que a concentração de ATP nas células vegetais controla os mecanismos de morte celular programada (Vianello et al., 2007), que é considerado essencial para a correta maturação dos embriões somáticos (Bozhkov et al., 2005).

-GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE:

Em nosso estudo, a proteína Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase chloroplastic-like (GAPCp), foi amplamente DOWN-regulada, sendo expressa aproximadamente 6 vezes a mais nos embriões do controle (Tab. 5). A GAPCp está envolvida na via glicolítica plastidial, produzindo energia nos plastídios não clorofilados e cloroplasto (Muñoz-Bertomeu et al., 2009).

Essa enzima catalisa a conversão do gliceraldeído-3-fosfato (G3P) à 1,3-bifosfoglicerato em presença de NAD^+ (Cerff e Chambers, 1979). Empregando a proteômica comparativa em duas linhagens, embriogênica e não-embriogênica, de *Z. mays*, os autores apontaram a expressão da proteína Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de forma DOWN-regulada nos calos embriogênicos (Sun et al., 2013). Assim como em nossos dados, esses resultados estão em contraste com a maioria dos estudos na embriogênese somática (Nogueira et al., 2007; Thomás et al., 2009; Zhang et al., 2009; Gomez-Garay et al., 2013) e precisam ser melhores investigados.

Análises realizadas com duplo mutantes *gapcp* em *Arabidopsis*, apresentaram fenótipos severos como interrupção no desenvolvimento das raízes, nanismo e esterilidade, demonstrando sua importância no fornecimento de serina para os tecidos não fotossintéticos, como as raízes (Muñoz-Bertomeu et al., 2009). Essa evidência nos permite sugerir que os tecidos dos embriões expostos as lâmpadas fluorescentes, ainda não possuem funcionalmente as vias biossintéticas de serina, sendo necessário o acúmulo das proteínas GAPCp para suprir a carência de serina.

7.2.4. Respostas à estresses:

- PROTEÍNAS RELACIONADAS À PATÓGENOS:

Inicialmente as proteínas relacionadas à patógenos em plantas (proteínas PR) foram identificadas em respostas à ataque por microorganismos (Van Loon e Van Kammen, 1970). Posteriormente, o conhecimento sobre a família aumentou e foram observadas respostas a outros estímulos como ácido salicílico (Malamy e Klessig, 1992), etileno (Lawton et al., 1994) e embriogênese somática (Wiweger et al., 2003). Essas proteínas foram classificadas com base em sua sequência de aminoácidos e funções biológicas, inseridas em diversos grupos desde as PR-1 até PR-14 (Muthukrishnan et al., 2001).

Dentre as PRs, as famílias PR-3 e PR-8 se destacam por demonstrarem atividade quitinase, (Kauffmann et al., 1987), ou seja, são enzimas glicosil hidrolases que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas β -[1-4] da N-acetil-glicosamina, um componente estrutural da quitina (Hamid et al., 2013). A subclasse de quitinases III pertencem a família PR-8, enquanto que as demais subclasses (I, II e IV) são agrupadas na família PR-3 (Collinge et al., 1993). Em *N. tabacum*, as classes III apresentavam além de atividade quitinase, atividade de lisozima (Brunner et al., 1998).

Nossas pesquisas permitiram encontrar de forma UP-regulada duas enzimas pertencentes a família PR-8, a Hevein-like preproprotein e a Acidic endochitinase (Tab. 4). Ambas proteínas pertencem a subclasse III (Batista et al., 2016; Berthelot et al., 2016) e são amplamente

relacionadas à tolerância contra estresses (Lawton et al., 1992; Griffith e Yaish, 2004; de las Mercedes Dana et al., 2006; Takenaka et al., 2009) e em outras etapas do desenvolvimento como embriogênese somática (Helleboid et al., 2000) e armazenamento (Rao e Gowda, 2008). De Jong et al. (1992) conseguiram resgatar o desenvolvimento de embriões somáticos mutantes, retidos no estágio globular, pela aplicação da endoquitinase na cultura. Frequentemente são relatadas a presença das proteínas quitinases em maior quantidade nas culturas embriogênicas (Tchorbadjieva e Pantchev, 2006; Niemenak et al., 2015; Bandupriya e Dunwell, 2016). É sugerido que essas proteínas na cultura *in vitro* podem apresentar atividade enzimática digerindo as Arabinogalactanas presentes nas paredes celulares (van Hengel et al., 2001), gerando oligossacarídeos essenciais às primeiras etapas da embriogênese (Malinowski e Filipceki, 2002) e alterando a estrutura química das paredes celulares, direcionando a direção da divisão celular (Fráterová et al., 2013).

-PEROXIRREDOXINAS:

Fazem parte da família enzimática das peroxidases, que são capazes de reduzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o hidroperóxido de alquila, à água e álcool, respectivamente, utilizando o grupamento tiol como doador (Dietz, 2003). Em plantas, a classe 2-Cisteína peroxirredoxina (2-CysPrx) é encontrada em abundância e geralmente associada aos cloroplastos (Muthuramalingam et al., 2009). Essa classe enzimática está envolvida não só nos processos de desintoxicação celular pela ação antioxidante, mas também na regulação da transdução de sinais mediada por H_2O_2 (Wood et al., 2003) e na proteção contra os danos oxidativos ao aparato fotossintético (Broin et al., 2002).

O gene BAS1 codifica as proteínas 2-CysPrx do cloroplasto e sua expressão é regulada pelo controle do estado redox da célula (Baier e Dietz, 1997). Para promover a formação dos embriões somáticos, geralmente é necessária a exposição da cultura à alguma condição estressante, como o estresse oxidativo (Fehér, 2015). A identificação da proteína 2-Cys peroxiredoxin chloroplastic (2-CysPrx) nos embriões tratados (Tab. 4), nos permite inferir que esses embriões passaram pelo estresse necessário para a aquisição da competência embriogênica e possuem uma maquinaria de defesa eficiente, conseguindo manter o estado redox da célula e proteger os lipídeos, enzimas e DNA contra as espécies reativas de oxigênio (Imin et al., 2005). Resultados similares em *M. truncatula* (De Jong et al., 2007), *C. persicum* (Rode et al., 2011) e *Q. suber* (Gomez-Garay et al., 2013) corroboram com nossas observações.

-LIPOXIGENASES:

As enzimas lipoxigenases (LOX) catalizam a adição de oxigênio molecular, na conversão dos ácidos graxos poliinsaturados em moléculas de oxilipinas (Porta e Rocha-Sosa, 2002). Os ácidos graxos oxidados (Oxilipinas) são uma importante classe de moléculas sinalizadoras, sendo sintetizadas geralmente em resposta à uma condição estressante. O ácido jasmônico é um exemplo de oxilipina, sintetizado sob situações de estresse. (Eckardt, 2008). As moléculas OPDA (12-oxo-phytodienoic acid) e fitoprostana, são um outro tipo de oxilipinas, que demonstram ter papel essencial na detoxificação celular, metabolismo secundário e regulação de fatores de transcrição TGA (reguladores dos genes que codificam as proteínas relacionadas à patógenos) (Mueller et al., 2008).

Sementes em desenvolvimento de *G. max* possuem membros da família LOX em todos grupos analisados (Asakura et al., 2012), assim como em embriões zigóticos (Hildebrand et al., 1991). (Liu et al., 1994) demonstram que a expressão de LOX se inicia no meio para o final da maturação nos embriões somáticos e provavelmente está relacionada com a dessecação. Embriões que expressaram as proteínas LOX apresentaram maiores taxas de germinação. (Thibaud-Nissen et al., 2003) observaram um acúmulo de proteínas LOX no estágio globular em embriões somáticos de *G. max*. Assim como nos trabalhos citados, nossas análises, também identificaram a expressão da proteína Lipoxxygenase homology domain-containing 1-like (LOX) nos embriões tratados com o comprimento de onda W_mB (Tab. 4), nos permitindo sugerir que esses embriões podem ser mais tolerantes às condições estressantes *in vitro* e por consequência, serem mais aptos à germinação.

- PEROXIDASE:

As peroxidases (POXs) pertencem a família de enzimas capazes de oxidar diferentes substratos na presença de H₂O₂. Nas plantas superiores as POXs apresentam um considerável número de isoformas, sendo distinguidas pelo uso não específico dos derivados fenólicos (de Marco et al., 1999).

Em nossas análises a proteína Peroxidase N1-like foi DOWN-regulada no tratamento W_mB (Tab. 5). Laukkanen et al. (1999) sugeriram que as POXs podem regular a capacidade de regeneração em calos de *Pinus sylvestris* L. Altos níveis da enzima podem provocar escurecimento dos calos levando a possível morte celular e parada do desenvolvimento embriogênico. Monitorando a atividade da enzima peroxidase durante o desenvolvimento dos embriões somáticos em *Abies concolor* Gord. et Glend, os autores perceberam considerada atividade enzimática nos calos não embriogênicos, quando comparados aos embriogênicos. Propondo que os elevados

níveis de POX nos calos não embriogênicos é devido ao alto conteúdo de ácidos fenólicos livres nesses tecidos, que servem como substrato para as reações de oxidação (Kormutak e Vookova, 2001).

7.2.5. Metabolismo de proteínas:

-PROTEASSOMA:

É um grande complexo multicatalítico de proteinases, que clivam as ligações peptídicas das proteínas. São compostos por pelo menos 14 subunidades diferentes e possuem três atividades endopeptidases, que variam de acordo com suas subunidades (Orlowski, 1990).

O proteassoma 26S é um complexo dependente de ATP, que consiste de uma subunidade com atividade protease (20S), localizada no centro do complexo, onde os substratos são remodelados e clivados, cercada de ambos os lados por subunidades regulatórias (19S), responsáveis por reconhecer e transportar os substratos marcados com ubiquitina para dentro da câmara proteolítica e liberar os produtos da digestão (Zientara-Rytter e Sirko, 2016).

Neste sentido, o complexo de proteinases exerce crítico controle no balanço entre síntese/degradação proteica, influenciando profundamente em inúmeros processos biológicos como ciclo celular, diferenciação, respostas contra estresse, modulação de receptores da superfície celular, reparo de DNA, regulação transcricional e biogênese de organelas (Glickman e Adir, 2004).

Para que se alcance a reprogramação celular, é necessário um fino balanço entre a degradação de proteínas específicas não mais necessárias e a síntese, remodelamento e modificações pós-traducionais das novas proteínas geradas (Tchorbadjieva, 2016). Sharifi et al. (2012) e (Rode et al., 2012) destacam a alta expressão das subunidades do proteassoma 26S no estágio torpedado dos embriões somáticos, enquanto que Gomez-Garay et al. (2013) notaram uma diminuição na abundância dessas proteínas nos estádios cotiledonares. De acordo com nossos dados, foi possível identificar o membro Proteasome subunit alpha type nos embriões tratados (Tab. 4). Zhang et al. (2009) também observaram subclasses UP-reguladas do complexo proteassoma em calos embriogênicos de *V. vinífera*, assim como em *M. truncatula* (Imin et al., 2005), *Manihot esculenta* Crantz (Baba et al.) e *C. papaya* (Vale et al., 2014). Portanto, os níveis de proteínas envolvidas no complexo proteassoma parecem influenciar diretamente na transição entre os estádios de desenvolvimento dos embriões, controlando a degradação de proteínas de vias específicas e fornecendo aminoácido para a biossíntese das novas proteínas.

-FATOR DE ALONGAMENTO:

Os fatores de alongamento 1A e 2 (EF1A e EF2) são proteínas que regulam e promovem a tradução proteica, pela ligação do aminoacil-tRNA aos ribossomos e sua translocação durante o alongamento do polipeptídeo nascente (Shin et al., 2002). Um fator de iniciação análogo (eIF2), pertence à família de proteínas ligantes a GTP (Severini et al., 1991), sendo responsável por ligar o iniciador Met-tRNA_i^{Met} à subunidade menor do ribossomo na primeira etapa da tradução. Em eucariotos o estabelecimento do complexo eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met} associado à subunidade 40S dos ribossomos, resulta na ligação ao códon iniciador AUG na terminação 5' do mRNA.

Nossas pesquisas identificaram a regulação de forma positiva da proteína Translation elongation factor EF1A initiation factor IF2gamma family isoform 4 (Tab. 4). Diversos estudos com a embriogênese somática também observaram a presença de fatores de alongamento e os relacionaram com o correto desenvolvimento dos embriões {Rensing, 2005 #463; Zeng, 2007 #464; Li, 2010 #465; Noah, 2013 #244} (Rensing et al., 2005; Zeng et al., 2007; Li, K. et al., 2010; Noah et al., 2013). Esses resultados ratificam a importância dessas proteínas, na síntese de novas moléculas específicas que são necessárias para a progressão do desenvolvimento embriogênico, revelando seu papel como proteínas “house-keepings”.

-FOSFOGLICERATO DESIDROGENASE:

A enzima D-3-fosfoglicerato desidrogenase (PGDH) participa na formação dos aminoácidos L-serina a partir do ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) nos plastídios. Ela catalisa a etapa inicial, na oxidação do 3-PGA dependente de NAD⁺, gerando 3-fosfohidroxipiruvato (3-PHP), que é convertido via transaminação em 3-fosfoserina e por fim em L-serina (Toujani et al., 2013). Os aminoácidos serina posteriormente são utilizados em diversas vias metabólicas como na síntese de proteínas, regulação da atividade catalítica de enzimas, metabolismo de um carbono (utilizado para síntese de purinas e pirimidinas), síntese de triptofano e fosfolípidos (Ros et al., 2014).

A expressão preferencial dos mRNAs PGDH em tecidos não-fotossintéticos como as raízes, indica que essa via biossintética é uma importante fonte de serina para tecidos incapazes de realizar a fotossíntese (Ho et al., 1999). A proteína D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 3, chloroplastic (PGDH) foi 6 vezes mais abundante no controle, quando comparado ao tratamento (Tab. 5). Com base nesses dados, podemos sugerir que os embriões submetidos às lâmpadas fluorescentes, não receberam os estímulos necessários para a correta formação dos cloroplastos, como a incidência do comprimento de onda azul e, portanto, necessita compensar a biossíntese de serina pela via do 3-PGA.

7.2.6. Metabolismo de carboidratos:

- TIOGLICOSIDEO GLICOHIDROLASE:

Também conhecida como mirosinase, essa classe enzimática pertence à família glicosil hidrolase 1 (Wang et al., 2009). O metabólito secundário glicosinolato contendo nitrogênio ou enxofre, é utilizado como substrato para a hidrólise, gerando diversos produtos como isotiocianato, nitrila, epitionitrila e tiocianato. Geralmente nas plantas *in vivo* esses compostos são produzidos a partir de ataques por patógenos (Halkier e Gershenzon, 2006).

Existem poucos estudos relacionando o efeito da quebra desses metabólitos secundários na embriogênese somática. Em nossas análises foi observado um considerável acúmulo de proteínas relacionadas à hidrólise do glicosinolato nos embriões submetidos às lâmpadas fluorescentes. As enzimas β -thioglucoside glucohydrolase (Fc = 2,12), β -thioglucoside glucohydrolase (Fc = 3,12) e Thioglucoside glucohydrolase (Fc = 3,57) demonstraram relativa abundância no controle, quando comparado ao tratamento W_mB (Tab. 5). Vale et al. (2014) em acordo com nossos resultados, observaram a presença dessa família enzimática apenas nos embriões somáticos não tratados, de *C. papaya*. Esses dados nos fazem sugerir que o acúmulo dos produtos oriundos da hidrólise do glicosinolato, como isotiocianato e nitrila podem ser tóxicos aos tecidos embriogênicos do mamoeiro, influenciando de forma negativa na embriogênese somática.

-GLICOSE-1-FOSFATO ADENILTRANSFERASE:

Também conhecida como ADP-glicose pirofosforilase (ADPGlc PPase), essa enzima participa na síntese de amido em plantas. A ADPGlc PPase catalisa a formação de ADP-glicose, a partir de glicose-1-fosfato e ATP. A ADP-glicose serve como doadora de grupamentos glicosil para o alongamento das cadeias α -1,4-glicosídicas. Geralmente essas enzimas são reguladas alostericamente por intermediários das vias de assimilação do carbono (Ballicora et al., 2004).

De acordo com a tabela 5, a proteína Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit chloroplastic foi DOWN-regulada, sendo expressa 2 vezes a mais no controle. Analisando o acúmulo de amido e a atividade da enzima ADPGlc PPase em embriões somáticos de *D. carota*, os autores não observaram diferenças na quantidade de amido entre os calos embriogênicos e não embriogênicos. Entretanto, a atividade enzimática foi mais elevada nos calos não embriogênicos (Keller et al., 1988). Wurtele et al. (1988) sugerem que o potencial embriogênico e o nível de amido nas células independe da atividade dessa enzima. Em embriões somáticos de *Hevea brasiliensis* L. os autores também não observaram correlação entre a atividade da enzima ADPGlc PPase, o acúmulo de amido e a capacidade embriogênica (Courty et al., 1998). A junção dessas

referencias nos leva a acreditar que essa família enzimática não possui papel determinante na formação de embriões somáticos.

8. CONCLUSÕES:

Nosso estudo reporta pela primeira vez, o efeito da qualidade da luz através de lâmpadas LED, na embriogênese somática do mamoeiro Golden e, adicionalmente, suas implicações na regulação de proteínas diferencialmente abundantes. Nós demonstramos que o tratamento W_mB, contendo o comprimento de onda azul médio exerceu efeito positivo durante a maturação, quando comparado aos demais tratamentos, produzindo embriões somáticos cotiledonares com melhor qualidade e em maior número. Foram identificadas proteínas reguladas diferencialmente, quanto a abundância, pertencentes a seis classes funcionais. O grupo mais representativo foi o relacionado aos processos de desenvolvimento, contendo 18 proteínas UP-reguladas, seguido pelo metabolismo energético. As proteínas Germin, Ankyrin, Hevein, Triose-fosfato isomerase, pequenas GTPases, S-adenosilmetionina, proteassoma, CDC48, PP2A, ATP-sintase, AIA-amido sintetase e PPR são amplamente descritas na literatura e sugeridas como biomarcadoras moleculares específicas em diferentes etapas da embriogênese somática.

Esses resultados indicam que uma complexa rede de atividades moleculares deve ser progressivamente ativa e desativa durante a embriogênese *in vitro*, para garantir o correto controle do metabolismo energético, divisão e alongamento celular, síntese/degradação proteolítica, regulação da transcrição/tradução/processamento pós-traducional e estresses inerentes do processo de embriogênese nas plantas.

Portanto o atual trabalho fornece bases moleculares que auxiliam no entendimento dos processos que regem a embriogênese somática em mamoeiro, assim como, estabelecer protocolos mais eficientes pela substituição das lâmpadas fluorescentes convencionais, pelas eficientes lâmpadas LED, otimizando a etapa da maturação.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, P. *et al.* Plant rabs: characterization, functional diversity, and role in stress tolerance. **Plant molecular biology reporter**, v. 27, n. 4, p. 417-430, 2009.

AKER, J. *et al.* The Arabidopsis thaliana AAA protein CDC48A interacts in vivo with the somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 receptor at the plasma membrane. **Journal of structural biology**, v. 156, n. 1, p. 62-71, 2006.

ALBERT, S. *et al.* The EMB506 gene encodes a novel ankyrin repeat containing protein that is essential for the normal development of Arabidopsis embryos. **The Plant Journal**, v. 17, n. 2, p. 169-179, 1999.

ALEITH, F.; RICHTER, G. Chloroplast differentiation in somatic embryos of carrot: efficiency of blue and red light irradiation on gene expression. **Journal of plant physiology**, v. 138, n. 3, p. 304-308, 1991.

ALTMAN, A.; HASEGAWA, P. M. **Plant biotechnology and agriculture: prospects for the 21st century**. Academic press, 2011. ISBN 0123814677.

ANANDAN, R. *et al.* In vitro somatic embryogenesis from suspension cultures of *Carica papaya* L. **Scientia horticultruae**, v. 136, p. 43-49, 2012.

ANDERSON, L. E. Chloroplast and cytoplasmic enzymes II. Pea leaf triose phosphate isomerases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 235, n. 1, p. 237-244, 1971.

ARAÚJO, W. L. *et al.* Antisense inhibition of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in tomato demonstrates its importance for plant respiration and during leaf senescence and fruit maturation. **The Plant Cell**, v. 24, n. 6, p. 2328-2351, 2012.

ASAKURA, T. *et al.* Global gene expression profiles in developing soybean seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 147-153, 2012.

ATMODJO, M. A.; HAO, Z.; MOHNEN, D. Evolving views of pectin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 747-779, 2013.

BABA, A. I. *et al.* Proteome analysis of secondary somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant science**, v. 175, n. 5, p. 717-723, 2008.

BACH, A.; KROL, A. Effect of light quality on somatic embryogenesis in *Hyacinthus orientalis* L. Delft's Blue. **Biological Bulletin of Poznań**, v. 38, n. 1, 2001.

BAE, W. *et al.* AKR2A-mediated import of chloroplast outer membrane proteins is essential for chloroplast biogenesis. **Nature cell biology**, v. 10, n. 2, p. 220-227, 2008.

BAI, J. *et al.* Proteomic analysis of salt-responsive proteins in oat roots (*Avena sativa* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2016.

BAIER, M.; DIETZ, K. J. The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. **The plant journal**, v. 12, n. 1, p. 179-190, 1997.

- BALBUENA, T. S. *et al.* Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 4, p. 302-311, 2011.
- BALBUENA, T. S. *et al.* Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). **Journal of proteomics**, v. 72, n. 3, p. 337-352, 2009.
- BALLICORA, M. A.; IGLESIAS, A. A.; PREISS, J. ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis. **Photosynthesis Research**, v. 79, n. 1, p. 1-24, 2004.
- BANDUPRIYA, H. D.; DUNWELL, J. M. Transcriptome analysis for discovering candidate genes involve in embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.) through 454 pyrosequencing. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 43, n. 4, 2016.
- BARKAN, A. *et al.* A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. **The EMBO journal**, v. 13, n. 13, p. 3170, 1994.
- BARMAN, A. R.; BANERJEE, J. Versatility of germin-like proteins in their sequences, expressions, and functions. **Functional & integrative genomics**, v. 15, n. 5, p. 533-548, 2015.
- BATISTA, D. S. *et al.* Light quality affects in vitro growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, p. 1-7, 2016.
- BAUD, S.; LEPINIEC, L. Regulation of de novo fatty acid synthesis in maturing oilseeds of *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 448-455, 2009.
- BERTHELOT, K.; PERUCH, F.; LECOMTE, S. Highlights on *Hevea brasiliensis* (pro) hevein proteins. **Biochimie**, v. 127, p. 258-270, 2016.
- BHATTACHARYA, J.; KHUSPE, S. In vitro and in vivo germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 91, n. 1, p. 39-49, 2001.
- BIGEARD, J. *et al.* Phosphorylation-dependent regulation of plant chromatin and chromatin-associated proteins. **Proteomics**, v. 14, n. 19, p. 2127-2140, 2014.
- BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A.; MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. **Nature**, v. 348, n. 6297, p. 125-132, 1990.
- BOZHKOVA, P.; FILONOVA, L.; SUAREZ, M. Programmed cell death in plant embryogenesis. **Current topics in developmental biology**, v. 67, p. 135, 2005.
- BREMER, B. *et al.* An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2009.
- BROIN, M. *et al.* The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. **The Plant Cell**, v. 14, n. 6, p. 1417-1432, 2002.

BROWN, C. S.; SCHUERGER, A. C.; SAGER, J. C. Growth and photomorphogenesis of pepper plants under red light-emitting diodes with supplemental blue or far-red lighting. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 120, n. 5, p. 808-813, 1995.

BRUIJNE, E. D.; LANGHE, E. D.; RIJCK, R. V. Actions of hormones and embryoid formation in callus cultures of *Carica papaya*. Int Symp Fytofarm Fytiat, 1974.

BRUNNER, F. *et al.* Substrate specificities of tobacco chitinases. **The Plant Journal**, v. 14, n. 2, p. 225-234, 1998.

BUDIARTO, K. Spectral quality affects morphogenesis on *Anthurium* plantlet during in vitro culture. **Agrivita**, v. 32, n. 3, p. 234, 2010.

BUKHORI, M. F. M. Improved protocol for high frequency plant regeneration through somatic embryogenesis in *Carica papaya*. **Research in Biotechnology**, v. 4, n. 5, 2013.

BULA, R. *et al.* Light-emitting diodes as a radiation source for plants. **HortScience**, v. 26, n. 2, p. 203-205, 1991.

CAILLOUX, F. *et al.* Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. **Plant Science**, v. 120, n. 2, p. 185-196, 1996.

CALISKAN, M.; TURET, M.; CUMING, A. C. Formation of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryogenic callus involves peroxide-generating germin-like oxalate oxidase. **Planta**, v. 219, n. 1, p. 132-140, 2004.

CERFF, R.; CHAMBERS, S. E. Subunit structure of higher plant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (EC 1.2. 1.12 and EC 1.2. 1.13). **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 13, p. 6094-6098, 1979.

CHEN, M.; WANG, P.; MAEDA, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. **Plant Cell Reports**, v. 6, n. 5, p. 348-351, 1987.

CHOW, C.-M. *et al.* Rab-A2 and Rab-A3 GTPases define a trans-golgi endosomal membrane domain in *Arabidopsis* that contributes substantially to the cell plate. **The Plant Cell**, v. 20, n. 1, p. 101-123, 2008.

COLLINGE, D. B. *et al.* Plant chitinases. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 31-40, 1993.

CORCHETE, P.; BRU, R. Proteome alterations monitored by DIGE analysis in *Silybum marianum* cell cultures elicited with methyl jasmonate and methyl B cyclodextrin. **Journal of proteomics**, v. 85, p. 99-108, 2013.

CORREDOR-PRADO, J. P. *et al.* Proteomic analysis in the induction of nodular cluster cultures in the bromeliad *Vriesea reitzii* Leme and Costa. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 5, p. 1-10, 2016.

CORREIA, S. *et al.* Comparative Proteomic Analysis of Auxin-Induced Embryogenic and Nonembryogenic Tissues of the Solanaceous Tree *C. yphomandra betacea* (Tamarillo). **Journal of proteome research**, v. 11, n. 3, p. 1666-1675, 2012.

COURTY, C.; DUCHER, M.; COUDRET, A. Comparison of starch, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase levels in non-embryogenic cells and developing embryos in *Hevea brasiliensis*. **Journal of plant physiology**, v. 153, n. 3, p. 469-474, 1998.

CUSHING, D. A. *et al.* Arabidopsis emb175 and other ppr knockout mutants reveal essential roles for pentatricopeptide repeat (PPR) proteins in plant embryogenesis. **Planta**, v. 221, n. 3, p. 424-436, 2005.

D'ONOFRIO, C.; MORINI, S.; BELLOCCHI, G. Effect of light quality on somatic embryogenesis of quince leaves. **Plant cell, Tissue and organ culture**, v. 53, n. 2, p. 91-98, 1998.

DA SILVA, J. A. T. *et al.* Papaya (*Carica papaya L.*) biology and biotechnology. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 47-73, 2007.

DA SILVA, M. M.; DEBERGH, P. The effect of light quality on the morphogenesis of in vitro cultures of *Azorella vidalii* (Wats.) Feer. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 51, n. 3, p. 187-193, 1997.

DE-LA-PEÑA, C. *et al.* The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. **Frontiers in plant science**, v. 6, 2015.

DE JONG, A. J. *et al.* A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. **The Plant Cell**, v. 4, n. 4, p. 425-433, 1992.

DE JONG, F. *et al.* A proteome study of the proliferation of cultured *Medicago truncatula* protoplasts. **Proteomics**, v. 7, n. 5, p. 722-736, 2007.

DE LAS MERCEDES DANA, M.; PINTOR-TORO, J. A.; CUBERO, B. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. **Plant Physiology**, v. 142, n. 2, p. 722-730, 2006.

DE MARCO, A.; GUZZARDI, P.; JAMET, É. Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. **Plant physiology**, v. 120, n. 2, p. 371-382, 1999.

DELONG, A. Switching the flip: protein phosphatase roles in signaling pathways. **Current opinion in plant biology**, v. 9, n. 5, p. 470-477, 2006.

DERUÈRE, J. *et al.* The RCN1-encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity in vivo. **The Plant Journal**, v. 20, n. 4, p. 389-399, 1999.

DESSAU, R.; PIPPER, C. ["R"--project for statistical computing]. **Ugeskrift for læger**, v. 170, n. 5, p. 328-330, 2008.

DEY, M. *et al.* differentiation in plant tissue culture. **Current Science**, v. 74, n. 7, p. 10, 1998.

DIETZ, K.-J. Plant peroxiredoxins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 93-107, 2003.

DING, X. *et al.* Activation of the indole-3-acetic acid–amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. **The Plant Cell**, v. 20, n. 1, p. 228-240, 2008.

DING, Y.-H. *et al.* Arabidopsis GLUTAMINE-RICH PROTEIN23 is essential for early embryogenesis and encodes a novel nuclear PPR motif protein that interacts with RNA polymerase II subunit III. **The Plant Cell**, v. 18, n. 4, p. 815-830, 2006.

DOMOKI, M. *et al.* Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf-protoplast-derived alfalfa cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1759, n. 11, p. 543-551, 2006.

DOS SANTOS, A.L.W. *et al.* Quantitative proteomic analysis of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze cell lines with contrasting embryogenic potential. **Journal of proteomics**, v. 130, p. 180-189, 2016.

ECKARDT, N. A. Oxylin signaling in plant stress responses. **The Plant Cell**, v. 20, n. 3, p. 495-497, 2008.

EDESI, J. *et al.* Does light spectral quality affect survival and regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips after cryopreservation? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 119, n. 3, p. 599-607, 2014.

ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 49, n. 6, p. 631-642, 2013.

FAN, M.; WANG, M.; BAI, M.-Y. Diverse roles of SERK family genes in plant growth, development and defense response. **Science China Life Sciences**, v. 59, n. 9, p. 889-896, 2016.

FAO. Crop Production. 2014. Disponível em: < <http://faostat.fao.org> >. Acesso em: 18 jan.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis—Stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.

FEHER, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, n. 3, p. 201-228, 2003.

FERNANDO, J. A. *et al.* Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 247-255, 2001.

FISK, D. G.; WALKER, M. B.; BARKAN, A. Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 9, p. 2621-2630, 1999.

FITCH, M. M. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 32, n. 2, p. 205-212, 1993.

FITCH, M. M. *et al.* Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 5, p. 245-249, 1993.

- FITCH, M. M. *et al.* Clonally propagated and seed-derived papaya orchards: I. Plant production and field growth. **HortScience**, v. 40, n. 5, p. 1283-1290, 2005.
- FOLTA, K. M. *et al.* Design and fabrication of adjustable red-green-blue LED light arrays for plant research. **BMC plant biology**, v. 5, n. 1, p. 1, 2005.
- FRÁTEROVÁ, L. *et al.* The role of chitinases and glucanases in somatic embryogenesis of black pine and hybrid firs. **Central European Journal of Biology**, v. 8, n. 12, p. 1172-1182, 2013.
- GARBERS, C. *et al.* A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in Arabidopsis. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 9, p. 2115, 1996.
- GARCION, C. *et al.* AKRP and EMB506 are two ankyrin repeat proteins essential for plastid differentiation and plant development in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 48, n. 6, p. 895-906, 2006.
- GEORGE, E.; HALL, M.; DE KLERK, G. Plant propagation by tissue culture. Volume 1: the background. **Plant propagation by tissue culture. Volume 1: the background**, n. Ed. 3, 2008.
- GLICKMAN, M. H.; ADIR, N. The proteasome and the delicate balance between destruction and rescue. **PLoS Biol**, v. 2, n. 1, p. e13, 2004.
- GLIWICKA, M. *et al.* Extensive modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in Arabidopsis thaliana. **Plos one**, v. 8, n. 7, p. e69261, 2013.
- GOMEZ-GARAY, A. *et al.* Proteomic perspective of Quercus suber somatic embryogenesis. **Journal of proteomics**, v. 93, p. 314-325, 2013.
- GRIFFITH, M.; YAISH, M. W. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. **Trends in plant science**, v. 9, n. 8, p. 399-405, 2004.
- GUO, G. *et al.* Comparative proteomic analysis of salt response proteins in seedling roots of two wheat varieties. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 6, p. 1867-1885, 2012.
- GUPTA, S. D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis. **Plant biotechnology reports**, v. 7, n. 3, p. 211-220, 2013.
- HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. Rapid induction of selective transcription by auxins. **Molecular and cellular biology**, v. 5, n. 6, p. 1197-1203, 1985.
- HALKIER, B. A.; GERSHENZON, J. Biology and biochemistry of glucosinolates. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 57, p. 303-333, 2006.
- HAMID, R. *et al.* Chitinases: an update. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 21, 2013.
- HARPER, A. D.; BAR-PELED, M. Biosynthesis of UDP-xylose. Cloning and characterization of a novel Arabidopsis gene family, UXS, encoding soluble and putative membrane-bound UDP-glucuronic acid decarboxylase isoforms. **Plant Physiology**, v. 130, n. 4, p. 2188-2198, 2002.

- HATEFI, Y. ATP synthesis in mitochondria. **European Journal of Biochemistry**, v. 218, n. 3, p. 759-767, 1993.
- HEAZLEWOOD, J.; WHELAN, J.; MILLAR, A. The products of the mitochondrial orf25 and orfB genes are FO components in the plant F1FO ATP synthase. **Febs Letters**, v. 540, n. 1-3, p. 201-205, 2003.
- HELLEBOID, S. *et al.* Three major somatic embryogenesis related proteins in Cichorium identified as PR proteins. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 348, p. 1189-1200, 2000.
- HENZE, K. *et al.* Chloroplast and cytosolic triosephosphate isomerases from spinach: purification, microsequencing and cDNA cloning of the chloroplast enzyme. **Plant molecular biology**, v. 26, n. 6, p. 1961-1973, 1994.
- HEO, J. *et al.* Growth responses of marigold and salvia bedding plants as affected by monochromatic or mixture radiation provided by a light-emitting diode (LED). **Plant Growth Regulation**, v. 38, n. 3, p. 225-230, 2002.
- HERINGER, A. S. *et al.* Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes Kunth*) using RITA® temporary immersion system. **Scientia Horticulturae**, v. 179, p. 284-292, 2014.
- HERINGER, A. S. *et al.* Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, n. 2, p. 116-124, 2013.
- HILDEBRAND, D. F.; VERSLUYS, R. T.; COLLINS, G. B. Changes in lipoxygenase isozyme levels during soybean embryo development. **Plant science**, v. 75, n. 1, p. 1-8, 1991.
- HO, C.-L. *et al.* Regulation of serine biosynthesis in Arabidopsis crucial role of plastidic 3-phosphoglycerate dehydrogenase in non-photosynthetic tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 1, p. 397-402, 1999.
- HOSHINO, T.; CUELLO, J. L. Regulating radiation quality and intensity using narrow-band leds for optimization of somatic embryogenesis. **ASAE Annual Meeting**, 2005, American Society of Agricultural and Biological Engineers. p.1.
- HUGHES, K. W. In vitro ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. **Environmental and Experimental Botany**, v. 21, n. 3, p. 281-288, 1981.
- IMIN, N. *et al.* Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Medicago truncatula. Explant cultures grown under 6-benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid treatments. **Plant Physiology**, v. 137, n. 4, p. 1250-1260, 2005.
- INOUE, S.-I.; TAKEMIYA, A.; SHIMAZAKI, K.-I. Phototropin signaling and stomatal opening as a model case. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 5, p. 587-593, 2010.
- ITO, H.; IWABUCHI, M.; OGAWA, K. I. The sugar-metabolic enzymes aldolase and triose-phosphate isomerase are targets of glutathionylation in Arabidopsis thaliana: detection using biotinylated glutathione. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, n. 7, p. 655-660, 2003.

JARITEH, M. *et al.* Developmental changes of protein, proline and some antioxidant enzymes activities in somatic and zygotic embryos of Persian walnut (*Juglans regia* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 122, n. 1, p. 101-115, 2015.

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

JIN, F. *et al.* Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. **Plant biotechnology journal**, v. 12, n. 2, p. 161-173, 2014.

JO, L. *et al.* Proteomic analysis and polyamines, ethylene and reactive oxygen species levels of *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine) embryogenic cultures with different embryogenic potential. **Tree physiology**, p. tpt102, 2013.

JORRÍN-NOVO, J. V. *et al.* Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: Moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. **Proteomics**, v. 15, n. 5-6, p. 1089-1112, 2015.

KARAMI, O.; SAIDI, A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 5, p. 2493-2507, 2010.

KAUFFMANN, S. *et al.* Biological function of pathogenesis-related proteins: four PR proteins of tobacco have 1, 3- β -glucanase activity. **The EMBO Journal**, v. 6, n. 11, p. 3209, 1987.

KELLER, G. L. *et al.* Comparison of starch and ADP-glucose pyrophosphorylase levels in nonembryogenic cells and developing embryos from induced carrot cultures. **Plant physiology**, v. 86, n. 2, p. 451-456, 1988.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Guanabara Koogan Rio de Janeiro, 2004. ISBN 852770949X.

KERK, D.; TEMPLETON, G.; MOORHEAD, G. B. Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants. **Plant physiology**, v. 146, n. 2, p. 351-367, 2008.

KIM, Y. W.; MOON, H. K. Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese red pine (*Pinus densiflora*). **Plant Biotechnology Reports**, v. 8, n. 3, p. 259-266, 2014.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1425, 1993.

KORMUTAK, A.; VOOKOVA, B. Peroxidase activity in non-embryogenic and embryogenic calli and in developing somatic embryos of white fir (*Abies concolor* Gord. et Glend). **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 135, n. 1, p. 101-105, 2001.

KUBITZKI, K. Caricaceae. In: (Ed.). **Flowering Plants· Dicotyledons**: Springer, 2003. p.57-61. ISBN 3642076807.

- KURILČIK, A. *et al.* In vitro culture of Chrysanthemum plantlets using light-emitting diodes. **Central European Journal of Biology**, v. 3, n. 2, p. 161-167, 2008.
- KWAK, J. M. *et al.* Disruption of a guard cell-expressed protein phosphatase 2A regulatory subunit, RCN1, confers abscisic acid insensitivity in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 14, n. 11, p. 2849-2861, 2002.
- LATKOWSKA, M.; KVAALLEN, H.; APPELGREN, M. Genotype dependent blue and red light inhibition of the proliferation of the embryogenic tissue of Norway spruce. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 36, n. 1, p. 57-60, 2000.
- LAUKKANEN, H. *et al.* Tissue browning of in vitro cultures of Scots pine: role of peroxidase and polyphenol oxidase. **Physiologia Plantarum**, v. 106, n. 3, p. 337-343, 1999.
- LAWTON, K. *et al.* Acidic and basic class III chitinase mRNA accumulation in response to TMV infection of tobacco. **Plant molecular biology**, v. 19, n. 5, p. 735-743, 1992.
- LAWTON, K. A. *et al.* Acquired resistance signal transduction in Arabidopsis is ethylene independent. **The Plant Cell**, v. 6, n. 5, p. 581-588, 1994.
- LECHWARD, K. *et al.* Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions. **ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION**, v. 48, n. 4, p. 921-934, 2001.
- LELJAK-LEVANIĆ, D. *et al.* Hormonal and epigenetic regulation during embryogenic tissue habituation in Cucurbita pepo L. **Plant cell reports**, v. 35, n. 1, p. 77-89, 2016.
- LI, H.; XU, Z.; TANG, C. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 103, n. 2, p. 155-163, 2010.
- LI, K. *et al.* Proteome characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) somatic embryos, plantlets and tuberous roots. **Proteome science**, v. 8, n. 1, p. 1, 2010.
- LI, T. *et al.* Effect of different light quality on DNA methylation variation for brown cotton (*Gossypium hirsutum*). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 33, p. 6220-6226, 2011.
- LIAN, M.-L.; MURTHY, H.; PAEK, K.-Y. Effects of light emitting diodes (LEDs) on the in vitro induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid 'Pesaro'. **Scientia Horticulturae**, v. 94, n. 3, p. 365-370, 2002.
- LIN, K.-H. *et al.* The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata). **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 86-91, 2013.
- LIN, M.; BEHAL, R.; OLIVER, D. J. Disruption of pLE2, the gene for the E2 subunit of the plastid pyruvate dehydrogenase complex, in Arabidopsis causes an early embryo lethal phenotype. **Plant molecular biology**, v. 52, n. 4, p. 865-872, 2003.
- LIN, X.; LAI, Z.; XU, Q. High Frequency Plant Regeneration via In Vitro Somatic Embryogenesis in Fifteen Cultivars of *Dimocarpus longan* Lour. III International Symposium on Longan, Lychee, and other Fruit Trees in Sapindaceae Family 863, 2008. p.155-160.

LIPPERT, D. *et al.* Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 461-473, 2005.

LITTERER, L. A. *et al.* Biosynthesis of UDP-glucuronic acid in developing soybean embryos: possible role of UDP-sugar pyrophosphorylase. **Physiologia Plantarum**, v. 128, n. 2, p. 200-211, 2006.

LITZ, R.; CONOVER, R. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carica papaya* L. ovular callus. **Plant Science Letters**, v. 26, n. 2-3, p. 153-158, 1982.

LIU, C.-P.; YANG, L.; SHEN, H.-L. Proteomic analysis of immature *Fraxinus mandshurica* cotyledon tissues during somatic embryogenesis: effects of explant browning on somatic embryogenesis. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 6, p. 13692-13713, 2015.

LIU, W. *et al.* Expression of desiccation-induced and lipoxygenase genes during the transition from the maturation to the germination phases in soybean somatic embryos. **Planta**, v. 194, n. 1, p. 69-76, 1994.

LIU, Y. *et al.* Induction and quantitative proteomic analysis of cell dedifferentiation during callus formation of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn. spp. *baijiantian*). **Journal of proteomics**, v. 131, p. 61-70, 2016.

LLERAS, E. Caricaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil**, Rodriguesia, 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22405>>. Acesso em: 18 Jan.

LU, Y. *et al.* AtPPR2, an Arabidopsis pentatricopeptide repeat protein, binds to plastid 23S rRNA and plays an important role in the first mitotic division during gametogenesis and in cell proliferation during embryogenesis. **The Plant Journal**, v. 67, n. 1, p. 13-25, 2011.

LUETHY, M. H. *et al.* Developmental expression of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex in pea (*Pisum sativum*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 112, n. 4, p. 559-566, 2001.

LYNGVED, R. *et al.* Embryo-specific proteins in *Cyclamen persicum* analyzed with 2-D DIGE. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 27, n. 4, p. 353-369, 2008.

MA, H. *et al.* High-density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in papaya. **Genetics**, v. 166, n. 1, p. 419-436, 2004.

MA, Q.-H. Small GTP-binding proteins and their functions in plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 4, p. 369-388, 2007.

MAESHIMA, M. Oligomeric structure of H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 168, n. 3, p. 1157-1162, 1990.

MAHDAVI-DARVARI, F.; NOOR, N. M.; ISMANIZAN, I. Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 2, p. 407-422, 2015.

MALAMY, J.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid and plant disease resistance. **The Plant Journal**, v. 2, n. 5, p. 643-654, 1992.

MALDONADO-BORGES, J. I.; KU-CAUICH, J. R.; ESCOBEDO-GRACIAMEDRANO, R. M. Annotation of differentially expressed genes in the somatic embryogenesis of Musa and their location in the banana genome. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

MALINOWSKI, R.; FILIPECKI, M. The role of cell wall in plant embryogenesis. **Cellular and molecular biology letters**, v. 7, n. 4, p. 1137-1152, 2002.

MARSONI, M. *et al.* Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Vitis vinifera. **Plant cell reports**, v. 27, n. 2, p. 347-356, 2008.

MATHIEU, M. *et al.* Germin-like genes are expressed during somatic embryogenesis and early development of conifers. **Plant molecular biology**, v. 61, n. 4-5, p. 615-627, 2006.

MERKLE, S. A. *et al.* Light quality treatments enhance somatic seedling production in three southern pine species. **Tree physiology**, v. 26, n. 2, p. 187-194, 2006.

MEYER, L. J. *et al.* Phosphoproteomic analysis of seed maturation in Arabidopsis, rapeseed, and soybean. **Plant physiology**, v. 159, n. 1, p. 517-528, 2012.

MICHNIEWICZ, M. *et al.* Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. **Cell**, v. 130, n. 6, p. 1044-1056, 2007.

MILLAR, A. H.; LEAVER, C. J. Plant mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase complex: purification and characterization in potato. **Biochemical journal**, v. 343, n. 2, p. 327-334, 1999.

MOREL, A. *et al.* Early molecular events involved in Pinus pinaster Ait. somatic embryo development under reduced water availability: transcriptomic and proteomic analyses. **Physiologia plantarum**, v. 152, n. 1, p. 184-201, 2014.

MUELLER, S. *et al.* General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 20, n. 3, p. 768-785, 2008.

MUÑOZ-BERTOMEU, J. *et al.* Plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiency leads to altered root development and affects the sugar and amino acid balance in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 151, n. 2, p. 541-558, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MUTHUKRISHNAN, S. *et al.* Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, n. 2-3, p. 93-114, 2001.

MUTHURAMALINGAM, M. *et al.* Multiple redox and non-redox interactions define 2-Cys peroxiredoxin as a regulatory hub in the chloroplast. **Molecular Plant**, v. 2, n. 6, p. 1273-1288, 2009.

- NANJO, Y. *et al.* Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 1, p. 372-385, 2012.
- NEUWALD, A. F. *et al.* AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. **Genome research**, v. 9, n. 1, p. 27-43, 1999.
- NHUT, D. *et al.* Growth of banana plantlets cultured in vitro under red and blue light-emitting diode (led) irradiation source. **Acta horticulturae**, 2002.
- NHUT, D. T.; NAM, N. B. Light-emitting diodes (LEDs): an artificial lighting source for biological studies. The Third International Conference on the Development of Biomedical Engineering in Vietnam, 2010, Springer. p.134-139.
- NHUT, D. T. *et al.* Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, n. 1, p. 43-52, 2003.
- NIELSEN, E.; CHEUNG, A. Y.; UEDA, T. The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. **Plant Physiology**, v. 147, n. 4, p. 1516-1526, 2008.
- NIEMENAK, N. *et al.* Proteome analysis during pod, zygotic and somatic embryo maturation of Theobroma cacao. **Journal of plant physiology**, v. 180, p. 49-60, 2015.
- NOAH, A. M. *et al.* Comparative proteomic analysis of early somatic and zygotic embryogenesis in Theobroma cacao L. **Journal of proteomics**, v. 78, p. 123-133, 2013.
- NOGUEIRA, F. *et al.* Proteome analysis of embryogenic cell suspensions of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant cell reports**, v. 26, n. 8, p. 1333-1343, 2007.
- OKAMOTO, K.; YANAGI, T.; KONDO, S. Growth and morphogenesis of lettuce seedlings raised under different combinations of red and blue light. **Acta horticulturae**, 1997.
- ORLOWSKI, M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. **Biochemistry**, v. 29, n. 45, p. 10289-10297, 1990.
- PÁDUA, M. S. *et al.* Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 660-665, 2014.
- PARK, S.; RANCOUR, D. M.; BEDNAREK, S. Y. In planta analysis of the cell cycle-dependent localization of AtCDC48A and its critical roles in cell division, expansion, and differentiation. **Plant physiology**, v. 148, n. 1, p. 246-258, 2008.
- PATERSON, A. H. *et al.* The fruits of tropical plant genomics. **Tropical Plant Biology**, v. 1, n. 1, p. 3-19, 2008.
- PATTATHIL, S.; HARPER, A. D.; BAR-PELED, M. Biosynthesis of UDP-xylose: characterization of membrane-bound AtUxs2. **Planta**, v. 221, n. 4, p. 538-548, 2005.
- PELEMAN, J. *et al.* Structure and expression analyses of the S-adenosylmethionine synthetase gene family in Arabidopsis thaliana. **Gene**, v. 84, n. 2, p. 359-369, 1989.

- PERÁN-QUESADA, R. *et al.* Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. **Scientia horticulturae**, v. 102, n. 1, p. 61-73, 2004.
- PÉREZ, L. P. *et al.* Effect of phloroglucinol on rooting and in vitro acclimatization of papaya (Carica papaya L. var. Maradol Roja). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 52, n. 2, p. 196-203, 2016.
- PETRUSSA, E. *et al.* Mitochondrial bioenergetics linked to the manifestation of programmed cell death during somatic embryogenesis of Abies alba. **Planta**, v. 231, n. 1, p. 93-107, 2009.
- PORTA, H.; ROCHA-SOSA, M. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. **Plant physiology**, v. 130, n. 1, p. 15-21, 2002.
- POUDEL, P. R.; KATAOKA, I.; MOCHIOKA, R. Effect of red-and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 92, n. 2, p. 147-153, 2008.
- QIU, X.; ERICKSON, L. A pollen-specific polygalacturonase-like cDNA from alfalfa. **Sexual Plant Reproduction**, v. 9, n. 2, p. 123-124, 1996.
- RAKHMANKULOVA, Z. Respiratory supercomplexes of plant mitochondria: Structure and possible functions. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 61, n. 6, p. 721-732, 2014.
- RANCOUR, D. M. *et al.* Characterization of AtCDC48. Evidence for multiple membrane fusion mechanisms at the plane of cell division in plants. **Plant physiology**, v. 130, n. 3, p. 1241-1253, 2002.
- RANCOUR, D. M. *et al.* Plant UBX domain-containing protein 1, PUX1, regulates the oligomeric structure and activity of Arabidopsis CDC48. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54264-54274, 2004.
- RANDOUX, B. *et al.* Characterisation of cDNAs homologous to Rab5-GTP binding protein expressed during early somatic embryogenesis in chicory. **Plant Science**, v. 162, n. 3, p. 413-422, 2002.
- RAO, D. H.; GOWDA, L. R. Abundant class III acidic chitinase homologue in tamarind (Tamarindus indica) seed serves as the major storage protein. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 6, p. 2175-2182, 2008.
- RASHOTTE, A. M.; DELONG, A.; MUDAY, G. K. Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response, and lateral root growth. **The Plant Cell**, v. 13, n. 7, p. 1683-1697, 2001.
- REIS, K.; FRANSSON, Å.; ASPENSTRÖM, P. The Miro GTPases: at the heart of the mitochondrial transport machinery. **FEBS letters**, v. 583, n. 9, p. 1391-1398, 2009.
- REIS, R. S. *et al.* Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. **Journal of proteomics**, v. 130, p. 170-179, 2016.

RENSING, S. A. *et al.* EST sequencing from embryogenic *Cyclamen persicum* cell cultures identifies a high proportion of transcripts homologous to plant genes involved in somatic embryogenesis. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 24, n. 2, p. 102-115, 2005.

REUVENI, M.; EVENOR, D. On the effect of light on shoot regeneration in petunia. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 89, n. 1, p. 49-54, 2007.

REUVENI, O.; SHLESINGER, D.; LAVI, U. In vitro clonal propagation of dioecious *Carica papaya*. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 20, n. 1, p. 41-46, 1990.

RIENTIES, I. M. *et al.* The Arabidopsis SERK1 protein interacts with the AAA-ATPase AtCDC48, the 14-3-3 protein GF14 λ and the PP2C phosphatase KAPP. **Planta**, v. 221, n. 3, p. 394-405, 2005.

ROCHA, D. I.; DORNELAS, M. C. Molecular overview on plant somatic embryogenesis. **CAB Rev**, v. 8, n. 022, p. 1-17, 2013.

RODE, C. *et al.* Enolases: storage compounds in seeds? Evidence from a proteomic comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. **Plant molecular biology**, v. 75, n. 3, p. 305-319, 2011.

RODE, C. *et al.* From callus to embryo: a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum*. **Planta**, v. 235, n. 5, p. 995-1011, 2012.

RODRÍGUEZ-SANZ, H. *et al.* Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and immature zygotic embryos in cork oak, *Quercus suber* L. **BMC plant biology**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.

ROS, R.; MUÑOZ-BERTOMEU, J.; KRUEGER, S. Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. **Trends in plant science**, v. 19, n. 9, p. 564-569, 2014.

SABZALIAN, M. R. *et al.* High performance of vegetables, flowers, and medicinal plants in a red-blue LED incubator for indoor plant production. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, n. 4, p. 879-886, 2014.

SÆBØ, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 41, n. 2, p. 177-185, 1995.

SALVO, S. A. *et al.* Whole transcriptome profiling of maize during early somatic embryogenesis reveals altered expression of stress factors and embryogenesis-related genes. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e111407, 2014.

SÁNCHEZ-AGUAYO, I. *et al.* Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-L-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. **Planta**, v. 220, n. 2, p. 278-285, 2004.

SAOTOME, M. *et al.* Bidirectional Ca²⁺-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 52, p. 20728-20733, 2008.

SATISH, L. *et al.* Influence of plant growth regulators and spermidine on somatic embryogenesis and plant regeneration in four Indian genotypes of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 124, n. 1, p. 15-31, 2016.

SCHMILDT, O. *et al.* Effects of indol butyric acid concentration on propagation from cuttings of papaya cultivars 'Golden' and 'Uenf/Caliman 01'. **Fruits**, v. 71, n. 1, p. 27-33, 2016.

SCHMILDT, O. *et al.* Photosynthetic capacity, growth and water relations in 'Golden' papaya cultivated in vitro with modifications in light quality, sucrose concentration and ventilation. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 27, n. 1, p. 7-18, 2015.

SCHMITZ-LINNEWEBER, C.; SMALL, I. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. **Trends in plant science**, v. 13, n. 12, p. 663-670, 2008.

SCHULZ, B. Functional classification of plant plasma membrane transporters. In: (Ed.). **The plant plasma membrane**: Springer, 2011. p.131-176.

SEABROOK, J. E. Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) in vitro: a review. **American journal of potato research**, v. 82, n. 5, p. 353-367, 2005.

SEIDEL, T. *et al.* Energization of vacuolar transport in plant cells and its significance under stress. **Int. Rev. Cell Mol. Biol**, v. 304, p. 57-131, 2013.

SERRANO, L. A. L.; CATTANEO, L. F. Papaya culture in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 0-0, 2010.

SEVERINI, M. *et al.* Ribosome-independent GTPase activity of translation initiation factor IF2 and of its G-domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 34, p. 22800-22802, 1991.

SGHAIER-HAMMAMI, B.; DRIRA, N.; JORRÍN-NOVO, J. V. Comparative 2-DE proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic and zygotic embryos. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 1, p. 161-177, 2009.

SHARIFI, G. *et al.* Identification of differentially accumulated proteins associated with embryogenic and non-embryogenic calli in saffron (*Crocus sativus* L.). **Proteome science**, v. 10, n. 1, p. 1, 2012.

SHARMA, K. K.; THORPE, T. A. Asexual embryogenesis in vascular plants in nature. In: (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**: Springer, 1995. p.17-72. ISBN 9401042179.

SHIN, B.-S. *et al.* Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 1015-1025, 2002.

SHIN, K. S. *et al.* The effect of light quality on the growth and development of in vitro cultured Doritaenopsis plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 3, p. 339-343, 2008.

SILVA, A. *et al.* Identification of expressed sequences in the coffee genome potentially associated with somatic embryogenesis. **Genet Mol Res**, v. 12, n. 2, p. 1698-1709, 2013.

SILVA, R. C. *et al.* Proteomic identification of differentially expressed proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of proteomics**, v. 104, p. 112, 2014.

SILVEIRA, V. *et al.* Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 114, n. 3, p. 351-364, 2013.

SMALL, I. D.; PEETERS, N. The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. **Trends Biochem Sci**, v. 25, n. 2, p. 46-7, Feb 2000.

SONG, L.; LIU, D. Mutations in the three Arabidopsis genes that encode the E2 subunit of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex differentially affect enzymatic activity and plant growth. **Plant cell reports**, v. 34, n. 11, p. 1919-1926, 2015.

STASWICK, P. E. *et al.* Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. **The Plant Cell**, v. 17, n. 2, p. 616-627, 2005.

SUN, L. *et al.* Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (*Zea mays* L.) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 113, n. 1, p. 103-119, 2013.

TAKENAKA, Y. *et al.* Chitinase gene expression in response to environmental stresses in Arabidopsis thaliana: chitinase inhibitor allosamidin enhances stress tolerance. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 73, n. 5, p. 1066-1071, 2009.

TAMULAITIS, G. *et al.* High-power light-emitting diode based facility for plant cultivation. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 38, n. 17, p. 3182, 2005.

TAN, B. C. *et al.* Proteomic analysis of callus development in Vanilla planifolia Andrews. **Plant molecular biology reporter**, v. 31, n. 6, p. 1220-1229, 2013.

TAN, H. S. *et al.* Differential proteomic analysis of embryogenic lines in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of proteomics**, 2016.

TAUTORUS, T.; FOWKE, L.; DUNSTAN, D. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n. 9, p. 1873-1899, 1991.

TCHORBADJIEVA, M.; PANTCHEV, I. Secretion of a chitinase-like protein in embryogenic suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. **Biologia plantarum**, v. 50, n. 1, p. 142-145, 2006.

TCHORBADJIEVA, M. I. Advances in Proteomics of Somatic Embryogenesis. In: (Ed.). **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**: Springer, 2016. p.67-90.

THIBAUD-NISSEN, F. *et al.* Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. **Plant Physiology**, v. 132, n. 1, p. 118-136, 2003.

THOMAS, C.; JIMÉNEZ, V. M. Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: molecular aspects. In: (Ed.). **Somatic Embryogenesis**: Springer, 2005. p.157-175.

- THOMÁS, G.-E. *et al.* Proteolytic activity in enzymatic extracts from *Carica papaya* L. cv. Maradol harvest by-products. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 77-82, 2009.
- TIAN, Q. *et al.* D1Ran3A is involved in hormone, light, and abiotic stress responses in embryogenic callus of *Dimocarpus longan* Lour. **Gene**, v. 569, n. 2, p. 267-275, 2015.
- TITTMANN, S. *et al.* Influence of led-illumination to the regeneration potential of somatic embryos of *Vitis vinifera* 'chardonnay'-preliminary studies. VIII International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 1083, 2013. p.445-453.
- TORNÉ, J. M. *et al.* Effects of light quality on somatic embryogenesis in *Araujia sericifera*. **Physiologia plantarum**, v. 111, n. 3, p. 405-411, 2001.
- TOUJANI, W. *et al.* Functional characterization of the plastidial 3-phosphoglycerate dehydrogenase family in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 163, n. 3, p. 1164-1178, 2013.
- TOVAR-MÉNDEZ, A.; MIERNYK, J. A.; RANDALL, D. D. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 6, p. 1043-1049, 2003.
- TREICHEL, M. *et al.* Anuário brasileiro da fruticultura. **Brazilian Fruit Yearbook**, p. 88, 2016.
- TSENG, T.-S.; BRIGGS, W. R. The *Arabidopsis* rcn1-1 mutation impairs dephosphorylation of Phot2, resulting in enhanced blue light responses. **The Plant Cell**, v. 22, n. 2, p. 392-402, 2010.
- URASAKI, N. *et al.* A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 2-3, p. 281-285, 2002.
- VALE, E. *et al.* Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in *Carica papaya* L. **Proteome science**, v. 12, n. 1, p. 1, 2014.
- VAN BREUSEGEM, F. *et al.* Characterization of a S-adenosylmethionine synthetase gene in rice. **Plant physiology**, v. 105, n. 4, p. 1463, 1994.
- VAN HENGEL, A. J. *et al.* N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. **Plant Physiology**, v. 125, n. 4, p. 1880-1890, 2001.
- VAN LOON, L.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN': II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. **Virology**, v. 40, n. 2, p. 199-211, 1970.
- VERDEIL, J.-L. *et al.* Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in plant science**, v. 12, n. 6, p. 245-252, 2007.
- VERNOUD, V. *et al.* Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 131, n. 3, p. 1191-1208, 2003.
- VIANELLO, A. *et al.* Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death. **Physiologia Plantarum**, v. 129, n. 1, p. 242-252, 2007.

- VO, K. T. X. *et al.* Molecular insights into the function of ankyrin proteins in plants. **Journal of Plant Biology**, v. 58, n. 5, p. 271-284, 2015.
- VON ARNOLD, S. *et al.* Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, n. 3, p. 233-249, 2002.
- WANG, M. *et al.* Characterization of a root-specific β -thioglucoside glucohydrolase gene in *Carica papaya* and its recombinant protein expressed in *Pichia pastoris*. **Plant science**, v. 177, n. 6, p. 716-723, 2009.
- WANG, Y. *et al.* Efficient Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Embryos of *Tapiscia sinensis* Oliv., an Endemic and Endangered Species in China. **HortScience**, v. 49, n. 12, p. 1558-1562, 2014.
- WINKELMANN, T. *et al.* Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. **Planta**, v. 224, n. 3, p. 508-519, 2006.
- WITZEL, K. *et al.* Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 12, p. 3545-3557, 2009.
- WIWEGER, M. *et al.* Expression of Chia4-Pa chitinase genes during somatic and zygotic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*): similarities and differences between gymnosperm and angiosperm class IV chitinases. **Journal of experimental botany**, v. 54, n. 393, p. 2691-2699, 2003.
- WOJTYLA, Ł.; KOSMALA, A.; GARNCZARSKA, M. Lupine embryo axes under salinity stress. II. Mitochondrial proteome response. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 8, p. 2383-2392, 2013.
- WONGNOK, A. *et al.* Effects of light emitting diodes on micropropagation of *Phalaenopsis* orchids. **Acta horticulturae**, 2008.
- WOOD, Z. A.; POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 650-653, 2003.
- WU, H.-C.; LIN, C.-C. Red light-emitting diode light irradiation improves root and leaf formation in difficult-to-propagate *Protea cynaroides* L. plantlets in vitro. **HortScience**, v. 47, n. 10, p. 1490-1494, 2012.
- WU, M.-C. *et al.* A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1753-1758, 2007.
- WURTELE, E. S. *et al.* Quantitation of starch and ADP-glucose pyrophosphorylase in non-embryogenic cells and embryogenic cell clusters from carrot suspension cultures. **Journal of plant physiology**, v. 132, n. 6, p. 683-689, 1988.
- XU, Y.; HALL, T. C. Cytosolic triosephosphate isomerase is a single gene in rice. **Plant physiology**, v. 101, n. 2, p. 683-687, 1993.

YAMAOKA, S.; LEAVER, C. J. EMB2473/MIRO1, an Arabidopsis Miro GTPase, is required for embryogenesis and influences mitochondrial morphology in pollen. **The Plant Cell**, v. 20, n. 3, p. 589-601, 2008.

YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 29, n. 1, p. 36-57, 2010.

YEH, N.; CHUNG, J.-P. High-brightness LEDs—Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 8, p. 2175-2180, 2009.

YOO, J. *et al.* An ankyrin repeat protein is involved in anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. **Physiologia plantarum**, v. 142, n. 4, p. 314-325, 2011.

YORIO, N. C. *et al.* Improving spinach, radish, and lettuce growth under red light-emitting diodes (LEDs) with blue light supplementation. **HortScience**, v. 36, n. 2, p. 380-383, 2001.

YU, D. *et al.* EMBRYONIC FACTOR 19 encodes a pentatricopeptide repeat protein that is essential for the initiation of zygotic embryogenesis in Arabidopsis. **Journal of integrative plant biology**, v. 54, n. 1, p. 55-64, 2012.

YUE, J.-H. *et al.* Gibberellin and auxin signals control scape cell elongation and proliferation in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis*. **Journal of Plant Biology**, v. 59, n. 4, p. 358-368, 2016.

ZAMBONI, A.; DONDINI, L.; TONON, G. cDNA-AFLP study of gene expression during somatic embryogenesis in *Fraxinus angustifolia* Vhal. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 80, n. 2, p. 240-244, 2005.

ZENG, F. *et al.* A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. **Genomics**, v. 90, n. 5, p. 620-628, 2007.

ZENG, F. *et al.* Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. **Plant molecular biology**, v. 60, n. 2, p. 167-183, 2006.

ZHANG, H. *et al.* Proteomic responses of drought-tolerant and drought-sensitive cotton varieties to drought stress. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, n. 3, p. 1293-1303, 2016.

ZHANG, J. *et al.* Stress response proteins' differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon—a proteomic approach. **Plant Science**, v. 177, n. 2, p. 103-113, 2009.

ZHANG, J. *et al.* Factors that influence the yield and viability of protoplasts from *Carica papaya* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 26, p. 5143, 2011.

ZHAO, J. *et al.* iTRAQ-based comparative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic tissues of Prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 2, p. 655-669, 2015.

ZHEN, Y. *et al.* Proteomics of embryogenic and non-embryogenic calli of a *Liriodendron* hybrid. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 10, p. 211, 2015.

ZI, J. *et al.* Stress responsive proteins are actively regulated during rice (*Oryza sativa*) embryogenesis as indicated by quantitative proteomics analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74229, 2013.

ZIENTARA-RYTTER, K.; SIRKO, A. To deliver or to degrade—an interplay of the ubiquitin–proteasome system, autophagy and vesicular transport in plants. **The FEBS journal**, 2016.

10. ANEXO 1