

**ANÁLISE PROTEÔMICA E DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS  
NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**TATIANA BARROSO CHIQUIERI**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE-DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**MARÇO, 2013**

**ANÁLISE PROTEÔMICA E DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS  
NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**TATIANA BARROSO CHIQUIERI**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Vanildo Silveira**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**MARÇO, 2013**

**ANÁLISE PROTEÔMICA E DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS  
NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**TATIANA BARROSO CHIQUIERI**

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013.

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antônia Elenir Amancio Oliveira (Prof<sup>a</sup>. Associada)-LQFPP/UENF

---

Prof.Dr. Marcelo de Freitas Lima (Professor Adjunto)-UFRRJ

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tania Jacinto Freitas da Silva (Prof<sup>a</sup>. Associada)-LBT/UENF

---

Prof. Dr. Vanildo Silveira (Professor Associado)-LBT/UENF-(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Giulia pelo carinho, amor e compreensão incondicionais, a mim dispensados.

Aos meus pais Carlos Alberto e Adenair, irmãos Tarciso e Tarcio, pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Vanildo Silveira pela confiança e ensinamentos.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Claudete Santa-Catarina pela revisão da tese, atenção e ensinamentos.

A UFRRJ- Campus Leonel Miranda, pelo fornecimento de material vegetal, ao Pesquisador Dr. Carlos Frederico Veiga e ao Técnico Agrícola- Sr. Luis Francisco, pelos ensinamentos transmitidos, referentes aos tratos culturais em cana-de-açúcar.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira-CTC e ao Pesquisador Dr.Odair Bison, pelo fornecimento de material vegetal.

A FIOCRUZ e seus membros: Pesquisador-Dr.Jonas Enrique Aguilar Perales, Pesquisadora-Dr<sup>a</sup> Ana Gisele da Costa Neves Ferreira, Pesquisador-Dr.Richard Hemmi Valente, Tecnologista-Dr.André Teixeira Ferreira e a Bolsista- Monique Nunes, pelas análises de espectrometria de massas.

Ao Dr. Tiago Balbuena, pela ajuda nas análises *in silico* e interpretação dos dados.

A Dr<sup>a</sup>.Sara Maldonado e aos Msc.Hernán Burrieza e Msc.Paula Hernandez da Universidade de Buenos Aires, pelas análises de desidrinas.

Ao grupo de pesquisa em Biotecnologia Vegetal e todos os seus membros, em especial: Ricardo Reis, Lucas Passamani, Luis André Fulgêncio, Ellen Vale e Tainá Martins pelo companheirismo, amizade e paciência, que tanta diferença fizeram nessa caminhada.

Ao Laboratório de Biotecnologia e seus funcionários, com agradecimento especial: as técnicas Rivea Rodrigues e Telma Aguiar, a secretária Patrícia Cezário, e aos companheiros, Sylvio Botelho, Viviane Perdízio e Dalvânia Domingues pelo carinho, e amizade a mim dispensados.

As instituições fomento FAPERJ, CNPq e CAPES, pelo provimento dos recursos financeiros.

A UENF pela concessão da bolsa e pela oportunidade de ensino gratuito e de qualidade.

*Pela companhia luminosa nessa caminhada,  
com amor incondicional,  
à Giulia, dedico.*

## Sumário

RESUMO .....	I
TÍTULO: Análise proteômica e determinação de carboidratos na embriogênese somática de cana-de-açúcar.....	I
ABSTRACT .....	III
TITLE: Proteomic analysis and carbohydrates determination during the somatic embryogenesis of sugarcane.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
LISTA DE FIGURAS .....	VI
LISTA DE TABELAS .....	IX
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. A espécie de estudo- Cana-de-açúcar ( <i>Saccharum</i> spp.).....	1
1.2. Importância econômica .....	2
1.3. Embriogênese somática.....	5
1.4. Análise proteômica na embriogênese.....	9
1.5. Dehidrinas .....	12
1.6. Metabolismo de carboidratos durante a embriogênese somática .....	15
2. OBJETIVOS .....	17
2.1. Objetivo geral .....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1. Material vegetal .....	18
3.2. Indução das culturas .....	18
3.3. Multiplicação das culturas .....	20
3.4. Experimento de maturação .....	20
3.5. Deteminação do crescimento celular .....	21

3.6.	Análise proteômica .....	22
3.6.1.	Extração de proteínas para análise de desidrinas .....	22
3.6.2.	Determinação de desidrinas .....	23
3.6.3.	Extração de proteínas para 2-DE .....	23
4.	ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE) .....	25
5.	ANÁLISE DE IMAGENS .....	26
6.	IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	26
7.	DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS .....	28
8.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
8.1.	Maturação de culturas .....	30
8.2.	Análise proteômica .....	38
8.2.1.	Identificação de desidrinas .....	38
8.2.2.	Quantificação de proteínas .....	40
8.2.3.	Identificação de proteínas .....	42
8.3.	Determinação de carboidratos .....	61
9.	CONCLUSÕES .....	74
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76



## RESUMO

### **Título: ANÁLISE PROTEÔMICA E DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

O pioneirismo do Brasil no aprimoramento da cultura de cana-de-açúcar para a produção de etanol, fez com que o mesmo, se tornasse o maior produtor mundial de etanol proveniente de cana-de-açúcar. Nesse cenário, as técnicas biotecnológicas como a embriogênese somática apresentam um grande potencial para implementação e aceleração de ganhos genéticos com a reprodução massal *in vitro* de variedades melhores adaptadas as condições de solo, fertilidade, disponibilidade de água e redução de tratos culturais. O presente trabalho apresenta como objetivo geral, a identificação de proteínas expressas diferencialmente e a determinação de carboidratos durante a embriogênese somática em cana-de-açúcar, visando a compreensão do processo morfogênético da embriogênese somática em cana-de-açúcar. Adicionalmente, apresentam-se como objetivos específicos: i) o estudo do padrão de expressão de proteínas através da interface eletroforese bidimensional versus espectrometria de massas do tipo MS/MS (2-DE - MS/MS) em culturas embriogênicas, ii) determinação dos efeitos do carvão ativado na progressão dos embriões somáticos e no padrão de expressão de proteínas durante as diferentes etapas da maturação, iii) identificação e determinação do padrão de acúmulo de desidrinas na embriogênese somática de cana-de-açúcar, iv) determinação quantitativa e qualitativa dos carboidratos sintetizados em culturas embriogênicas e não-embriogênicas e na maturação de embriões somáticos de cana-de-açúcar. A identificação de proteínas pela plataforma 2-DE/MSxMS, mostrou-se satisfatória uma vez que, dos 530 spots selecionadas para a análise por espectrometria de massas, cerca de 138 foram selecionados para discussão, após análise *in silico*. As proteínas identificadas no presente estudo, que apresentaram expressão comum aos tratamentos de manutenção e maturação estão relacionadas aos processos metabólicos basais de desenvolvimento celular como os representados pelo: metabolismo de carboidratos (precursor de alfa amilase), pela glicólise (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), biossíntese de proteínas (fator de iniciação da transcrição em eucariotos) e divisão celular (actina). Com a identificação de

dehidrinas foi possível determinar um padrão de acúmulo de dehidrinas associado a uma expressão diferencial ao longo das diferentes etapas do desenvolvimento embrionário e uma associação da expressão de dehidrinas a fase inicial da morfogênese em embriões somáticos, em cana-de-açúcar. Os resultados obtidos na determinação de carboidratos indicam, um padrão diferenciado de acúmulo e degradação dos três carboidratos analisados: glicose, frutose e sacarose, em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento de maturação e manutenção, sendo que, os conteúdos de carboidratos apresentam-se de forma diferenciada comparando-se os meios de manutenção e maturação, indicando a ação diferenciada de diferentes concentrações dos carboidratos analisados, na regulação dos processos de divisão celular e morfogênese.

## **ABSTRACT**

### **Title: PROTEOMIC ANALYSIS AND CARBOHYDRATES DETERMINATION DURING THE SOMATIC EMBRYOGENESIS OF SUGARCANE**

In Brazil, the pioneering spirit in improving the sugarcane crop for ethanol production has made the country the world's largest producer of this fuel. In this scenario, biotechnological techniques such as somatic embryogenesis show great potential for implementation and acceleration of genetic gains with in vitro mass reproduction of varieties which are better adapted to soil conditions, fertility, water availability and reduced cultivation. The general objective of this paper is to identify differentially expressed proteins and to determine the carbohydrates contents present during the somatic embryogenesis, aiming at understanding the morphogenetic process of somatic embryogenesis in sugarcane. Also, as specific objectives, we have: i) the study of the expression pattern of proteins by two-dimensional electrophoresis interface versus MS/MS (2-DE x MS/MS) mass spectrometry in embryogenic cultures, ii) the determination of the effects of activated charcoal in the progression of somatic embryos and the expression pattern of proteins in the different stages of maturation, iii) the identification and determination of the pattern of accumulation of dehydrins in the somatic embryogenesis, iv) quantitative and qualitative determination of the endogenous carbohydrates in embryogenic and non-embryogenic cultures. Induced cultures of sugarcane (var. SP80-3280). were under the maturation and maintenance treatments. The identification of proteins by the 2-DE x MS/MS platform was satisfactory, since from the 530 spots selected for analysis by mass spectrometry, approximately 138 have been selected for discussion, after analysis in silico. The proteins identified in this study, which showed common expression to the maintenance and maturation treatments are related to early stages of metabolic processes of cell development as represented by: carbohydrate metabolism (precursor of alpha amylase) by glycolysis (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), biosynthesis of proteins (initiation factor of the transcription in eukaryotes-) and cell division (actin). Being the remaining proteins identified, related to the biological processes of cell division, energy metabolism, response to different stresses and respiratory metabolisms, in the embryogenic cultures treated with

maintenance and maturation, indicating the differential protein expression during maturation and maintenance media. With the identification of dehydrins was possible to determine a pattern of accumulation of dehydrins associated with a differential expression throughout the different stages of embryonic development and an association of the dehydrins expression in the early stage of morphogenesis in somatic embryos in sugarcane. The results obtained in the determination of carbohydrates showed a distinct pattern of accumulation and degradation of the three analyzed carbohydrates: glucose, fructose and sucrose in embryogenic cultures under the maturation and maintenance treatment, being that the amounts of carbohydrates present themselves differently comparing the maintenance and maturation media, indicating the differentiated action of different concentrations of analyzed carbohydrates in regulating the processes of cell division and morphogenesis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

CA- Carvão ativado

E- Embriogênico

ETOH- Etanol

ES- Embrião(ões) somático(s)

FE- Fase estacionária

FM- Fase móvel

MF- Matéria fresca

NCBI- National Center for Biotechnology Information

NE- Não-embriogênico

HPLC- Cromatografia líquida de alta pressão

IEF- Focalização isoeletrica

IMP v.7- Image máster Platinum versão 7

PVPP- Polivinilpolipirrolidona

TCA- Ácido tricloroacético

2-DE- Eletroforese bidimensional

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

T1- Tratamento de maturação

T2-Tratamento de manutenção

MS/MS- Espectrometria de massas em tandem

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Obtenção dos explantes primários- A- Plantas crescidas em substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>. B-Planta germinada, C-Palmito formado pelas folhas jovens e D-Secção transversal em meio de cultura como explantes na indução de calos.

**Figura 2-** Esquema demonstrativo das metodologias de extração protéica utilizadas.

**Figura 3.** Aspectos morfológicos de culturas de cana-de-açúcar. A-culturas embriogênicas e B- culturas não-embriogênicas.

**Figura 4-** Efeito do carvão ativado em culturas embriogênicas e não-embriogênicas- culturas embriogênicas (E) e não-embriogênicas (NE) de cana-de-açúcar, submetidas ao tratamento de maturação contendo MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel<sup>®</sup> (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, durante o 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup>, 28<sup>o</sup> 35<sup>o</sup> dias de cultivo.

**Figura 5-** Maturação de culturas embriogênicas- culturas embriogênicas de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento de maturação contendo MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel<sup>®</sup> (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado (claro), durante o 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup>, 28<sup>o</sup>, 35<sup>o</sup>, 42<sup>o</sup> e 49<sup>o</sup> dias de desenvolvimento, plantas regeneradas a partir de calos embriogênicos.

**Figura 6-**Incremento de matéria fresca em mg em culturas embriogênicas (E): T1- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel<sup>®</sup> (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, tratamento T2- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>), phytigel<sup>®</sup> (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 µM de 2,4 D, no claro, tratamento T3- Meio de cultura MS, phytigel<sup>®</sup> (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 µM de 2,4 D no escuro, tratamento T4- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel<sup>®</sup> (2,0 g L<sup>-1</sup>) (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir das médias de 3 placas contendo 5 culturas por placa).

**.Figura 7-** Incremento de matéria fresca em mg em culturas não-embriogênicas (NE): T1- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel<sup>®</sup> (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, tratamento T2- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>), phytigel<sup>®</sup> (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 µM de 2,4 D, no claro, tratamento T3- Meio de cultura MS, phytigel<sup>®</sup> (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 µM de 2,4 D no escuro, tratamento T4- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel<sup>®</sup> (2,0 g L<sup>-1</sup>) (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir das médias de 3 placas contendo 5 culturas por placa).

**Figura 8-** Incremento de matéria fresca em mg, a partir de 300 mg por colônia, aplicadas em 4 diferentes tratamentos: T1- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel<sup>®</sup> (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, tratamento T2- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20g L<sup>-1</sup>), phytigel<sup>®</sup> (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 µM de 2,4 D, no claro, tratamento T3- Meio de cultura

MS, phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 µM de 2,4 D no escuro, tratamento T4- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) em culturas embriogênicas (E) e não embriogênicas (NE) (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir das médias de 3 placas contendo 5 culturas por placa).

**Figura 9-** Análise de western blot da embriogênese somática de cana-de-açúcar- A- identificação de desidrinas em culturas não-embriogênicas (NE) e embriogênicas (E).

**Figura 10-** Conteúdo protéico determinados por 2DE Quant Kit® (GE HealthCare)- em 300mg de matéria fresca. T1- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, e T2 Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>), phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 µM de 2,4 D após 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de desenvolvimento (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir das médias de 3 placas contendo 5 culturas por placa).

**Figura 11-** Número de polipeptídeos identificados pelo programa Image Master Platinum v.7, nos tratamentos de manutenção (20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,0 g L<sup>-1</sup> de Phytigel®, e 10 µM do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D)) e maturação (20 mL de meio MS suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,0 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado).

**Figura 12-** Análise proteômica comparativa feita pelo Image Master Platinum V.7, entre A- calos embriogênicos submetidos ao meio de maturação, B-calos embriogênicos submetidos ao meio de manutenção, no dia 14º dia de desenvolvimento.

**Figura 13-** Análise proteômica comparativa feita pelo Image Master Platinum V.7, entre A- calos embriogênicos submetidos ao meio de maturação, B-calos embriogênicos submetidos ao meio de manutenção, no dia 21º dia de desenvolvimento.

**Figura 14-** Análise proteômica comparativa feita pelo Image Master Platinum V.7, entre A- calos embriogênicos submetidos ao meio de maturação, B-calos embriogênicos submetidos ao meio de manutenção, no dia 28º dia de desenvolvimento.

**Figura 15-** Classificação funcional realizado pelo programa Blast2Go de proteínas identificadas pelo programa MASCOT, em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*- Var. SP8032-80), submetidas ao meio de manutenção.

**Figura 16-** - Determinação da função molecular realizada pelo programa Blast2Go de proteínas identificadas pelo programa MASCOT, em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*- Var. SP8032-80), submetidas ao meio de manutenção.

**Figura 17-** Classificação funcional realizado pelo programa Blast2Go de proteínas identificadas pelo programa MASCOT, em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*- Var. SP8032-80), submetidas ao meio de maturação.

**Figura 18-** Determinação da função molecular realizada pelo programa Blast2Go de proteínas identificadas pelo programa MASCOT, em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*- Var. SP8032-80), submetidas ao meio de maturação.

**Figura 19-** Conteúdo de carboidratos em culturas embriogênicas- tratamento T1 (maturação)-Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir da média de três repetições).

**Figura 20-** Conteúdo de carboidratos em culturas embriogênicas- tratamento T2 (manutenção)- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $10 \mu\text{M}$  de 2,4 D, no claro após 0, 7, 14, 21, 28 dias de desenvolvimento (as barras indicam o desvio padrão calculado a partir da média de três repetições).

**Figura 21-** Esquema de atuação do metabolismo celular em condições autotróficas (adaptado de Nelson e Cox, 2012).

**Figura 22-** Esquema de atuação do metabolismo celular em condições heterotróficas (adaptado de Nelson e Cox, 2012).

**Figura 23-** Conteúdo de carboidratos em culturas não-embriogênicas- tratamento T1 (maturação)- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir da média de três repetições).

**Figura 24-** Conteúdo de carboidratos em culturas não-embriogênicas- tratamento T2 (manutenção)- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $10 \mu\text{M}$  de 2,4 D, no claro após 0, 7, 14, 21, 28 dias de desenvolvimento (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir da média de três repetições).

**Figura 25-** Conteúdo de Frutose, Glicose e Sacarose em calos embriogênicos e não-embriogênicos- Taxas de carboidratos obtidas em culturas embriogênicas e não-embriogênicas, submetidas ao tratamento maturação (Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado), e manutenção (Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $10 \mu\text{M}$  de 2,4 D), no claro após 0, 7, 14, 21, 28 dias de desenvolvimento - A- teores de frutose, B- teores de glicose, C- teores de sacarose (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir da média de três repetições).



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Composição química dos tratamentos utilizados.

**Tabela 2-** Parâmetros utilizados do programa Blast2go.

**Tabela 3-** Polipetídeos identificados por espectrometria de massas em calos embriogênicos submetidos aos tratamentos de maturação e de manutenção, no dia 14º dia de cultivo.

**Tabela 4-** Polipetídeos identificados por espectrometria de massas em calos embriogênicos submetidos aos tratamentos de maturação e de manutenção, no dia 21º dia de cultivo.

**Tabela 5-** Polipetídeos identificados por espectrometria de massas em calos embriogênicos submetidos aos tratamentos de maturação e de manutenção, no dia 28º dia de cultivo.

**Tabela 6-** Proteínas identificadas em calos embriogênicos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*- Var. SP8032-80), nos tratamentos de manutenção e maturação.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A espécie de estudo- Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) é uma espécie que apresenta seu centro de origem de dispersão no Sudeste Asiático, pertencente à família Poaceae. O gênero *Saccharum* é formado por pelo menos cinco espécies: *Saccharum officinarum*, *Saccharum sinensis*, *Saccharum barberi*, *Saccharum spontanium*, *Saccharum robusyum* e as variedades de cana-de-açúcar cultivadas em escala comercial representam um híbrido multi-específico, que recebe a denominação *Saccharum* spp (Veiga, 2006).

A família Poaceae apresenta como características principais, a inflorescência em forma de panícula aberta, caule diposto em colmos, folhas com lâminas de sílica em suas bordas e bainha foliar aberta (Araldi, 2010). Essa inflorescência aparece em forma panicular e se desenvolve a partir do último entre nó. A forma da inflorescência é característica de cada variedade, podendo ser chamada de bandeira ou flecha servindo assim para a identificação das variedades. Sobre as panículas se desenvolvem flores hermafroditas, as quais podem produzir sementes férteis, o que permite a obtenção de novas variedades ou híbridos através de programas de melhoramento genético clássico (Mozambani *et al.*, 2006).

O cultivo da cana-de-açúcar apresenta-se como uma das mais importantes culturas agrícolas do mundo tropical, sendo o Brasil, um dos principais produtores mundiais, comercializando os subprodutos como o açúcar e o álcool (anidro e hidratado) no mercado interno e externo (Veiga, 2006).

A atividade sucroalcooleira é uma monocultura caracterizada por vastas plantações contíguas e aplicação de técnicas de plantio direto (Veiga, 2006). A produção deste setor no Brasil tem despertado o interesse de diversos países, em razão dos baixos custos de produção do açúcar e do álcool, que aumentam a competitividade e resultam em um aumento das taxas de exportação a cada ano (Perera *et al.*, 2006). A produção nacional está sendo impulsionada pela necessidade das nações desenvolvidas de reduzirem

concomitantemente, suas taxas de emissão de poluentes na atmosfera e sua dependência da utilização de combustíveis fósseis como base energética de seu desenvolvimento.

## **1.2. Importância econômica**

A produção de biocombustíveis representa na atual conjuntura econômico/social mundial, uma das alternativas mais viáveis, para a geração de energia limpa e mitigação dos efeitos promotores de danos ambientais gerados pela queima de combustíveis fósseis, utilizados como principal matriz energética de um grande número de países, desenvolvidos e em desenvolvimento (Arruda, 2011).

A produção de etanol proveniente da fermentação de produtos agrícolas como: milho, beterraba, trigo e cana-de-açúcar, representa a quase totalidade das opções para produção de etanol, via produtos agrícolas, atualmente implementadas (Goldemberg *et al.*, 2008). Dentre as culturas disponíveis para produção de etanol, a cana-de-açúcar no Brasil e o milho nos EUA se destacam em caráter quantitativo, representando juntos, cerca de 72% da produção mundial de etanol (UNICA, 2008, EIA, 2008). A substituição dos combustíveis fósseis pelo etanol representa um elevado potencial redutor de emissão de gases do efeito estufa, como o CO<sub>2</sub>, sendo claro que quanto maior tecnologia agregada ao processo produtivo, maior a redução na produção e consequente emissão desses gases (Goldemberg *et al.*, 2008, Compeán e Polenske, 2011, Doku e Di Falco, 2012).

Na vanguarda para substituir o uso do petróleo como combustível, e apresentando-se atualmente como maior produtor mundial de etanol proveniente de cana-de-açúcar (Furtado *et al.*, 2011, Arruda 2011, Dal-Bianco *et al.*, 2011), o Brasil é o principal país do mundo a viabilizar, em larga escala, um combustível renovável como alternativa, apresentando uma destinação da produção de cana-de-açúcar nas últimas décadas direcionada para o suprimento da demanda gerada pelo uso de veículos bicombustíveis, com funcionamento a álcool hidratado e gasolina. Atualmente, a venda de veículos bicombustíveis apresenta índices crescentes a cada ano, sendo a frota de

carros bicompostíveis estimada em cerca de 7,0 milhões de unidades em circulação no país.

A safra brasileira de acordo com o terceiro levantamento de safras 2011/2012 feito pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), está estimada em 572 milhões de toneladas. (Conab, 2012).

O Estado do Rio de Janeiro é um histórico produtor de cana-de-açúcar. A região Norte do Estado foi uma das primeiras regiões do Brasil a iniciar a atividade canavieira, e ainda hoje essa atividade representa um importante segmento da economia agrícola regional. A região Norte Fluminense, atualmente apresenta pouco destaque na produção canavieira brasileira, embora Campos dos Goytacazes se posicione como o segundo município com maior área cultivada com cana-de-açúcar no país. Apesar de plantar área considerável com cana-de-açúcar, a produtividade média no município está abaixo da média nacional (Conab, 2012). Até a década de 70, o estado ocupava uma posição de destaque no setor sucroalcooleiro nacional, sendo a partir dessa década, superado na produção por outros estados como São Paulo e Paraná (Veiga, 2006), atualmente encontra-se na última posição na região sudeste e 15ª no país em termos produção (Conab, 2012).

Este resultado pode estar relacionado com o emprego de métodos de produção ultrapassados e a não utilização de variedades plenamente adaptadas à região, fatores estes que influenciam diretamente nos índices de produtividade, que se encontram muito aquém dos obtidos pelos principais estados produtores (Veiga, 2006).

O sistema de produção empregado nos estados que apresentam melhores índices de produtividade está caracterizado pela aplicação de novas tecnologias, utilização de variedades adaptadas à região de cultivo, correção e adubação do solo, controle de plantas daninhas e a substituição da prática da queimada da cana-de-açúcar, medidas estas, que não se encontram atualmente em execução no estado do Rio de Janeiro, em particular no município de Campos dos Goytacazes (Veiga, 2006).

Uma alternativa para acelerar o reposicionamento do Estado do Rio de Janeiro no setor canavieiro nacional seria a utilização de material genético de alto valor, em conjunto com a utilização de técnicas da biotecnologia vegetal. A utilização da biotecnologia vegetal como ferramenta do

melhoramento genético de plantas, está vinculada ao desenvolvimento e aprimoramento de protocolos de regeneração *in vitro* a partir da cultura de células e/ou de tecidos, incluindo a embriogênese somática. Protocolos eficientes para a regeneração *in vitro* são, também, fundamentais na utilização de técnicas de transformação genética, que oferecem novas possibilidades para a obtenção de variedades com características de interesse (Cidade *et al.*, 2006).

Uma alternativa apresentada para a modernização do setor canavieiro no estado do Rio de Janeiro, seria o estabelecimento da produção industrial de cana-de-açúcar *in vitro*, caracterizado pelas biofábricas, prática essa, já amplamente utilizada, com excelentes resultados, pelo estado de São Paulo, e por países como China e Cuba (Lee *et al.*, 2007). Destacando-se nesse contexto a produção de mudas com base em embriões somáticos, que viabilizariam altas taxas de multiplicação, velocidade na produção de mudas, produção constante, gerando dessa forma uma redução de custos e consequentemente um desenvolvimento do setor em questão.

Neste sentido, técnicas como a transformação genética e cultura de tecidos vegetais, e sua integração com programas de melhoramento têm representado uma estratégia para a introdução de características desejáveis em muitos cultivares comerciais de importantes culturas agrícolas (Arencibia *et al.*, 1998). A tolerância ao ataque de viroses, insetos e fungos, a resistência à herbicidas, a melhora na qualidade das fibras e o uso de plantas como biorreatores são as principais características agronômicas manipuladas na transformação genética em plantas (Arencibia *et al.*, 1998, Galo-Meagher *et al.*, 2000, Lakshmanan *et al.*, 2005). A habilidade para induzir embriogênese somática em protoplastos, suspensão celular e culturas embriogênicas formam a base para a exploração efetiva de tecnologias de engenharia genética para o melhoramento moderno (Lakshmanan, 2006).

As principais características de interesse, selecionadas por meio de programas de melhoramento vegetal clássico, levam cerca de 15 anos em média para o desenvolvimento de uma nova variedade em cana-de-açúcar (Pan, 2012). A agregação de técnicas biotecnológicas aos sistemas de produção tradicional tem por objetivos principais, o aumento dos índices de produção e sustentabilidade, uma vez que ao agregar tecnologia ao processo

produtivo, ocorre o favorecimento simultâneo dos aspectos econômicos e sociais (Compeán e Polensk, 2011, Arruda, 2011, Arruda, 2012).

Nesse cenário as técnicas biotecnológicas como a embriogênese somática apresentam um grande potencial para implementação e aceleração de ganhos genéticos com a reprodução massal *in vitro* de variedades melhores adaptadas a condições de solo, fertilidade, disponibilidade de água e redução de tratos culturais.

Em razão do exposto a utilização de técnicas biotecnológicas como a embriogênese somática apresenta-se como uma potencial contribuição para reversão dos baixos índices de produtividade do estado do Rio de Janeiro, por apresentar a possibilidade de associação com outras técnicas na busca por variedades adaptadas a região.

### **1.3. Embriogênese somática**

Em 2005 em comemoração aos seus 125 anos, o renomado periódico Science publicou uma edição comemorativa que versava sobre as grandes perguntas científicas que a humanidade ainda não havia respondido. Inicialmente 125 questões foram selecionadas e dentre estas as 25 perguntas mais importantes foram discutidas e publicadas na edição comemorativa. Uma destas questões foi: “Como uma única célula somática vegetal consegue se transformar numa planta inteira?” (Kennedy e Norman, 2005).

Essa indagação figura entre as questões de maior relevância científica que ainda se encontram sem resposta (Vogel, 2005). Em resumo, esta questão se remete ao conceito de embriogênese somática, que é uma técnica de cultivo *in vitro*, em que, células isoladas ou um pequeno grupo de células somáticas dão origem a embriões (Tautorus *et al.*, 1991). Este conceito contempla a definição da totipotencialidade das células vegetais demonstrada por Steward *et al.*(1958) e Reinert (1958), que através do experimento com explantes de cenoura (*Daucus carota*), conseguiram regenerar plantas inteiras, via embriões somáticos. Desde então uma série de experimentos com a utilização dos mais variados tipos de explantes e distintas alterações nos meios

de cultura para utilização *in vitro*, tem sido realizados na tentativa de desvendar os complexos processos moleculares que determinam a competência embriogênica em células vegetais (Lakshmanan *et al.*, 2005, Lakshmanan, 2006)

A embriogênese somática em sua essência é um processo análogo a embriogênese zigótica, onde a partir de células somáticas, embriões somáticos podem se desenvolver, induzidos por alterações na composição do meio de cultura ao qual, os explantes estão submetidos. Essas alterações são em sua grande maioria relacionadas à inserção no meio de cultura de diferentes reguladores de crescimento vegetal, como auxinas e citocininas. Num primeiro momento, estes reguladores de crescimento vegetal induzem a multiplicação celular indiferenciada e quando retirados do meio de cultura, induzem a diferenciação celular, caracterizando dessa forma a etapa de maturação das culturas, onde os embriões são formados, dando origem a novas plântulas somáticas (Lakshmanan *et al.*, 2005, Lakshmanan, 2006, Vasil, 2008).

Por representar um modelo de propagação clonal de plantas, em escala massal, a embriogênese somática aplicada à cultura de cana-de-açúcar representa uma excelente alternativa, para redução de custos produtivos e obtenção de plantas selecionadas para características produtivas de interesse, e fixação de características de interesse econômico (Lakshmanan *et al.*, 2005, Lakshmanan, 2006).

Nesse contexto, a busca por marcadores bioquímicos associados a embriogênese somática em cana-de-açúcar, mostra-se fundamental para compreensão do processo de formação de embriões somáticos.

Durante a embriogênese somática, células diferenciadas e mitoticamente quiescentes podem recuperar o potencial embriogênico e originar novos embriões viáveis, através da reprogramação da expressão gênica, gerando os chamados embriões somáticos (Marsoni *et al.*, 2008). A formação de embriões somáticos que podem futuramente gerar plantas íntegras, envolvem um complexo processo, que se inicia com a desdiferenciação de uma célula somática, passando por uma reativação celular, divisão e reprogramação do metabolismo e rotas de desenvolvimento. Todas essas mudanças envolvem uma complexa regulação gênica e

metabólica e em modelos experimentais são fortemente influenciadas pelas diferentes concentrações hormonais, as quais as células são expostas (Fehér *et al.*, 2003).

A formação de embrião somático segue o mesmo padrão morfogênético dos embriões zigóticos formados naturalmente após a fertilização da célula ovo, apresentando os mesmos estágios de desenvolvimento embrionários, podendo dessa forma representar um modelo experimental, por não apresentar as limitações teciduais e de localização encontradas na embriogênese zigótica (Zimmermann 1993, Goldberg *et al.*, 1994).

Em cana-de-açúcar, o estabelecimento e a manutenção de embriões somáticos foi reportado inicialmente na década de 70 quando, os primeiros resultados de regeneração de plantas a partir de calos foram apresentados por Liu e Chen (1974) e Nadar *et al.* (1977). Entretanto, estes trabalhos não apresentaram evidências científicas suficientes, que embasassem que o processo de regeneração das plantas oriundas de culturas de calos fosse através da embriogênese somática (Lakshmanan, 2006). Após estes trabalhos iniciais, Ho e Vasil (1983) e Ahloowalia e Maretzki (1983) publicaram os primeiros resultados, com grandes evidências científicas, e alta reprodutibilidade, para a regeneração de plantas de cana-de-açúcar, via embriogênese somática, a partir de calos, suspensões celulares e cultura de protoplastos. Sendo esse conhecimento gerado, utilizado para a evolução nos estudos do desenvolvimento do primeiro protoplasto transgênico de cana-de-açúcar e a primeira planta de cana-de-açúcar transgênica (Bower e Birch, 1992).

Comparativamente às demais técnicas de micropropagação, a embriogênese somática apresenta como vantagens: a obtenção de uma grande quantidade de propágulos (embriões somáticos), a possibilidade de automação do sistema, permitindo baixar os custos por unidade produzida, através da utilização de biorreatores, produção de embriões somáticos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização e pureza genética, utilização como uma ferramenta integrada a programas de melhoramento genético, em especial quando associada às técnicas de criopreservação e engenharia genética (Guerra *et al.*, 1999, Steiner *et al.*, 2008). Entretanto, a



principal limitação dos sistemas de embriogênese somática, desenvolvidos para várias espécies, é a variação somaclonal ocorrida após sucessivas subculturas, afetando o desenvolvimento das plantas produzidas (Lakshmanan *et al.*, 2005).

A modulação da embriogênese somática pode ser dividida em quatro fases distintas: 1) indução em meios de cultura contendo reguladores de crescimento como citocininas e auxinas, 2) multiplicação em meios contendo auxinas em baixas concentrações, 3) maturação na ausência de reguladores de crescimento e/ou em presença de ácido abscísico (ABA) e agentes osmóticos, e 4) germinação em meios de cultura isentos de reguladores de crescimento (Guerra *et al.*, 1999).

O principal esforço para a otimização do sistema de embriogênese somática em muitas espécies concentra-se principalmente nas fases de maturação e germinação dos embriões somáticos, sendo os meios de cultura manipulados quanto aos tipos e concentrações de substâncias promotoras de maturação, como o ácido abscísico (ABA), e o ajuste osmótico pela adição de polietilenoglicol (PEG), agente não plasmolisante, e agentes plasmolisantes (carboidratos, hexitois) (Thorpe, 1995, Lakshmanan, 2006).

O estudo da embriogênese somática envolve vários fatores, como reguladores de crescimento, que apresentam efeitos diretos sobre os processos fisiológicos e bioquímicos nas várias etapas deste processo morfogenético. Dentre os aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares associados à embriogênese somática destacam-se os estudos sobre o balanço hormonal, o metabolismo de poliaminas (PAs) e aminoácidos, carboidratos e a expressão diferencial de proteínas ao longo do desenvolvimento embrionário.

Dentre os aspectos citados acima o presente projeto, contemplará o estudo da expressão diferencial de proteínas e do metabolismo de carboidratos na embriogênese em cana-de-açúcar.

#### 1.4. Análise proteômica na embriogênese

O termo proteoma surgiu nos anos 90 e foi definido por Waisinger *et al.* (1995), como o conjunto de proteínas expressas por um organismo em uma condição específica, sendo a proteômica a ciência de análise sistemática de diversos proteomas, viabilizando uma análise qualitativa e quantitativa da expressão proteica diferencial, em distintos eventos fisiológicos que ocorrem em células, tecido e órgãos (Chen e Harmon, 2006, Korkumat *et al.*, 2006).

A eletroforese bidimensional (2-DE) é a base da proteômica clássica. Na primeira dimensão da 2-DE as proteínas são submetidas à focalização isoelétrica (IEF), onde migram sob ação de um campo elétrico, em um gel contendo um gradiente de pH, até que alcancem seus respectivos pontos isoelétricos. A segunda dimensão da 2-DE é obtida por meio da utilização de um sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes convencional (SDS-PAGE), geralmente vertical, onde as proteínas isofocalizadas na primeira dimensão, são submetidas a um novo campo elétrico e migrarão por um gel SDS-PAGE sendo separadas, nessa etapa, pela sua massa molecular.

Inicialmente a primeira dimensão da 2-DE consistia na preparação de géis cilíndricos de poliacrilamida, onde um gradiente de pH era obtido por meio de uma pré-corrída com anfólitos específicos, que apresentavam alta capacidade tamponante, em pHs próximos aos seus pontos isoelétricos. Posteriormente, as proteínas eram então submetidas a uma focalização isoelétrica (IEF) e a uma eletroforese SDS-PAGE (Westermeier, 2000). Neste padrão a técnica proposta mostrava-se laboriosa e de baixa reprodutibilidade, dependendo de muitos fatores interferentes para a obtenção de bons resultados (Pandey e Mann, 2000).

Análise proteômica teve sua utilização ampliada com o desenvolvimento e aprimoramento da 2-DE. A alta reprodutibilidade da 2-DE, em parte de se deve ao surgimento do gradiente de pH imobilizado (IPG), com diversas faixas de pH, o que permite a utilização de faixas de pH distintas, mais apropriadas às diferentes amostras, que conseqüentemente contém proteínas com diferentes pesos moleculares (Görg *et al.*, 1985).

Os IPGs são formados por derivados de acrilamida contendo grupos tamponantes ácidos e básicos, sendo um método altamente reprodutível, com alta capacidade de aplicação das amostras em uma baixa condutividade durante a focalização (Görg, *et al.*, 2000). Com a proposta apresentada por Görg *et al.* (1985), iniciou-se a comercialização em lotes padronizados de IPGs em tiras de gel de poliacrilamida o que conferiu a técnica, alta reprodutibilidade.

A técnica de 2-DE tem sido sucessivamente aprimorada. Os avanços como o advento do IPG, o desenvolvimento de protocolos mais elaborados de preparo de amostras e de coloração, como a utilização de fluorescência tornaram a aplicação da técnica mais eficiente, versátil e reprodutível (Carpentier, 2005).

A análise proteômica comparativa em plantas tem seu sucesso ancorado à escolha de métodos adequados de extração protéica de diferentes amostras. Os tecidos vegetais apresentam uma concentração relativamente baixa na razão proteína/volume total e um grande número de moléculas interferentes como: compostos fenólicos, componentes de parede celular, lipídios, enzimas proteolíticas e oxidantes, terpenos, pigmentos, ácidos orgânicos, íons, carboidratos e metabólitos secundários (Saravanan e Rose, 2004). Como citado anteriormente, os recentes avanços na técnica da 2-DE tornou-a uma ferramenta robusta para a separação e quantificação de proteínas, sendo necessário para tanto, a obtenção de amostras livres de interferentes (Natarajan *et al.*, 2005).

Neste cenário, se faz necessário a aplicação de métodos de extração que viabilizem uma diminuição dos interferentes contidos nas amostras vegetais, visando a otimização na obtenção de resultados e viabilizando a reprodutibilidade da técnica. Sendo portanto, de fundamental importância a análise de diferentes protocolos de extração protéica, em calos de cana-de-açúcar, visando otimizar a futura análise protéica com a utilização da associação de técnicas como a 2-DE e a espectrometria de massas (MS/MS), uma vez que a solubilização e extração parcial das proteínas, podem comprometer o estudo do proteoma de um tecido, órgão ou organismo (Islam, *et al.*, 2004 e Carpentier *et al.*, 2005).

Os protocolos iniciais de extração protéica apresentavam grandes limitações na redução dos interferentes contidos na amostra a ser analisada,

grande parte desses protocolos iniciais, limitava-se a desnaturar a amostra em tampões de extração. Com o passar das décadas e o aprimoramento das técnicas de detecção e de quantificação de proteínas foi sendo evidenciada a necessidade da aplicação de protocolos mais elaborados, que contivessem passos sucessivos do procedimento de extração visando não só a limpeza da amostra, através da redução dos interferentes como a concentração da amostra protéica e sua posterior ressuspensão para realização das etapas seguintes (Jacobs *et al.*, 2001)

De acordo com o descrito na literatura os principais protocolos de extração protéica, apresentam classicamente a utilização para a extração: uréia/tiouréia, fenol, ácido tricloroacético (TCA) e acetona, bem como, a precipitação pós-extração com TCA/acetona (Saravanan e Rose, 2004, Carpentier *et al.*, 2005, Natarajan *et al.*, 2005).

O método de extração ideal precisa atender a necessidade de solubilização completa da amostra protéica para sua posterior desnaturação e redução das proteínas, sem a alteração de suas cargas protéicas, e remoção dos interferentes, para que essas amostras possam ser aplicadas na 2-DE (Valcû e Schlink, 2006).

A ampla utilização da proteômica como técnica na última década, tem sido representada pelas diversas possibilidades de aplicação da mesma em diversas linhas de trabalho como: o estudo das modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, análise protéica estrutural, análise protéica funcional, análise da expressão diferencial e a utilização da técnica como base para o fornecimento de informações para a biologia computacional de proteínas e para os estudos de modelagem e dinâmica protéica.

A principal estratégia de análise proteômica em plantas está baseada na interface 2-DE x MS/MS, que consiste principalmente na separação das proteínas através da 2-DE, identificação e isolamento do gel, digestão e posterior identificação da proteína por espectrometria de massas em tandem (MS/MS) e cruzamento com os bancos de dados disponíveis (Cánovas *et al.*, 2004, Dias *et al.*, 2002).

A utilização da proteômica comparativa em plantas tem se mostrado como uma importante ferramenta para a caracterização de etapas fundamentais do desenvolvimento de estruturas vegetais. Neste contexto, o

estudo dos mecanismos de formação e desenvolvimento embrionário apresentam-se como uma importante estratégia para compreensão dos eventos associados à ontogênese do embrião.

### 1.5. Dehidrinas

O desenvolvimento embrionário é caracterizado pelo aumento do conteúdo protéico, sendo resultado principalmente da síntese de proteínas LEA (“late embryogenesis abundant”) e proteínas de reserva (Bewley e Black, 1994). As proteínas LEA são classificadas em cinco grupos em virtude da similaridade de suas seqüências de aminoácidos, apresentando, baixa complexidade, uma grande afinidade com as moléculas de água atuando na proteção à desidratação da semente (Boudet *et al.*, 2006), representando portanto uma papel fundamental na manutenção da viabilidade dos embriões.

As proteínas de reserva são utilizadas como fonte de nitrogênio no desenvolvimento e germinação do embrião, sendo divididas em quatro classes de acordo com a sua solubilidade: (a) albuminas, solúveis em água ou em tampão de pH neutro, (b) globulinas, solúveis em soluções salinas e insolúveis em água, (c) glutelinas, solúveis em ácido diluído ou em soluções alcalinas e (d) prolaminas, solúveis em álcoois (Shewry *et al.*, 1995).

As proteínas LEA acumulam-se em altos níveis no desenvolvimento de sementes durante a maturação, e na desidratação de tecidos vegetativos de plantas em restabelecimento e são extremamente diversificadas em termos de variabilidade genotípica, regulação e localização em nível celular e tecidual (Bewley e Black, 1994, Boudet *et al.*, 2006).

Dentre as proteínas LEA existe o Grupo 2 de proteínas, conhecidas como dehidrinas. As dehidrinas são altamente hidrófilicas, e são caracterizadas pela presença de um domínio conservado com 15 resíduos rico em lisina (EKKGIMDKIKEKLP), chamado de K-domínio (Close e Lammers, 1993), que pode ser encontrado em uma ou várias cópias. Ismail *et al.* (1999), propôs que o K-domínio forma uma  $\alpha$ -hélice anfipática, que permite interações hidrofílicas e hidrofóbicas, que viabilizariam a estabilização de proteínas em respostas a estresses hídricos e ambientais (Dure, 1993).

As desidrininas são constitutivamente expressas nas fases posteriores de formação do embrião zigótico, no desenvolvimento de sementes e durante a dessecação de sementes (Zimmerman, 1993). Além disso, em órgãos vegetativos, elas são constitutivamente presente durante as condições normais de crescimento (Rorat *et al.*, 2004), embora também se acumulem em resposta ao estresse hídrico provocado pela seca, baixa, temperatura ou salinidade elevada (Ismail *et al.*, 1999, Nylander *et al.*, 2001). Esse acúmulo é atualmente interpretado, como indicador de um papel minimizador dos efeitos de diferentes tipos de estresses, embora ainda não se tenha uma identificação precisa de suas funções (Battaglia *et al.*, 2008).

O local de acúmulo das desidrininas é o citoplasma, podendo também ser localizadas no núcleo. No citoplasma, as desidrininas foram encontradas próximas a membrana plasmática, retículo, mitocôndrias e vacúolo endoplasmático (Houde *et al.*, 1995, Egerton-Warburton *et al.*, 1997, Danyluk *et al.*, 1998, Borovskii *et al.*, 2002, Heyen *et al.*, 2002). De acordo com Battaglia *et al.* (2008), para algumas desidrininas a localização nuclear parece ser independente da fosforilação. Isto sugere que o transporte de diferentes tipos de desidrininas, ao núcleo ocorre através de diferentes vias de localização nuclear.

Até a presente data, os resultados obtidos sobre a presença de desidrininas durante desenvolvimento de embriões somáticos estavam restritos ao cultivo *in vitro* de cenoura e carvalho. Estudos em cenouras relatam a presença de uma desidrina fosforilada chamada ECPP44 durante a embriogênese somática e em embriões somáticos maduros (Tan e Kamada, 2000). ECPP44 está também presente, embora não-fosforilada, em células não-embriogênicas. Em seu estudo, Tan e Kamada (2000) descrevem o isolamento e o cDNA que codifica ECPP44, considerando que a sequência de aminoácidos contém uma poli-serina típica de genes desidrininas. Mais tarde, Ko *et al.* (2006) realizaram ensaios de imunoprecipitação para ECPP44, concluindo que esta proteína pode ter um papel na indução ou manutenção da competência embriogênica.

Outra desidrina, denominada B18, é descrita por Walkers *et al.* (1999), em embriões somáticos de cenoura pré-tratados com ABA. Os autores associam B18 com a aquisição de tolerância a dessecação durante a secagem

lenta e sugerem que esta desidrina, incorporada na matriz vítrea, confere estabilidade aos embriões. Sunderlikova e Wilhelm (2002) ao estudarem os padrões de expressão de duas desidrinas em embriões somáticos de carvalho sob tratamentos de maturação, demonstraram que a regulação de sua expressão está sob controle do desenvolvimento e pode ser influenciada pela manipulação das condições de cultura.

Na embriogênese somática a síntese protéica é influenciada pela adição de agentes de maturação ao meio de cultura. Conseqüentemente o uso de diferentes condições de cultura nas distintas fases da embriogênese somática pode resultar em perfis protéicos distintos, podendo estes, ser utilizados para a melhor compreensão do desenvolvimento dos embriões somáticos.

O uso de proteínas como marcadores para o monitoramento e compreensão de diferentes respostas biológicas apresenta-se como uma alternativa para desenvolvimento de biotecnologias aplicadas a cultura da cana-de-açúcar. Análises proteômicas associadas a capacidade embriogênica de algumas culturas vegetais, indicam a expressão de proteínas ligadas aos processos de divisão celular e do metabolismo energético (Pan *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2010, Takác *et al.*, 2011, Balbuena *et al.*, 2011). Essa expressão proteica se justifica, uma vez que a capacidade de multiplicação celular depende da formação de novas estruturas diferenciadas, e do ciclo celular ser acompanhado por grande demanda energética, sendo portanto, necessária a síntese de proteínas associadas ao metabolismo energético (Takác *et al.*, 2011).

A utilização de proteínas como marcadores para embriogênese somática tem sido estudada no sentido de relacionar os estágios embriogênicos com alterações nos perfis protéicos e com o desenvolvimento embrionário normal (Gifford, 1988, Campalans *et al.*, 2000, Garello *et al.*, 2000). Neste contexto, padrões protéicos vêm sendo utilizados como marcadores da competência das culturas embriogênicas, ocorrendo várias diferenças nos perfis protéicos entre culturas embriogênicas e não embriogênicas (Kormutak e Vookova, 1997).

## 1.6. Metabolismo de carboidratos durante a embriogênese somática

A manifestação da totipotencialidade das células vegetais, definida pela capacidade que uma célula apresenta de originar uma planta inteira, passa pela desorganização celular e posterior reorganização celular, finalizada com a regeneração de indivíduos íntegros (Martin *et al.*, 2007). O desenvolvimento embrionário envolve distintos, porém integrados processos como: mitose, estabelecimento de polaridade, diferenciação celular, síntese de metabólitos complexos e estoque de substâncias de reserva (Pescador *et al.*, 2008).

Em sistemas de cultura *in vitro* faz-se necessário o fornecimento de uma fonte externa de carbono, uma vez que as culturas embriogênicas são mantidas no escuro, apresentando metabolismo basicamente heterotrófico. Neste contexto, os processos de síntese e armazenamento de compostos relacionados com a embriogênese ocorrem de forma diferenciada nos sistemas de embriogênese somática e zigótica, que possui uma relação fonte-dreno com a planta matriz até a maturação fisiológica do embrião (Sghaier-Hammami *et al.*, 2009).

Para a obtenção de embriões somáticos em cana-de-açúcar, bem como em outras espécies o fornecimento externo de carbono, ocorre normalmente por meio da adição de sacarose ao meio de cultivo inicial ao qual o explante será exposto (Mordocco *et al.*, 2009). Parte da sacarose contida no meio de cultura pode sofrer degradação extracelular, sendo convertida em glicose, frutose ou esqueletos de carbono que são disponibilizadas para as células. As moléculas de sacarose interiorizadas representam uma importante fonte de armazenamento, e após sua hidrólise pela ação de invertases, apresenta-se, em grande parte dos sistemas biológicos, como a principal fonte de carbono para a síntese de carboidratos metabolicamente ativos, polissacarídeos estruturais e de armazenamento (Martin *et al.*, 2007).

Os carboidratos são fontes de energia para células e de estruturas de carbono para os processos de biossíntese (Pescador *et al.*, 2008). O metabolismo desses compostos apresenta-se como fator determinante para o desenvolvimento embrionário, uma vez que a presença de uma fonte externa de carbono no meio de cultivo, pode diferenciar as culturas celulares, quanto a



capacidade de processamento do carbono disponível, propiciando o acúmulo de açúcares em tecidos embrionários de origem somática (Cailloux *et al.*, 1996).

A alocação dos carboidratos para o interior das células vegetais em culturas de calos com potencial embriogênico tem recebido especial atenção, uma vez que os tecidos que normalmente efetuam esse transporte em plantas, como o floema e as células parenquimáticas, ainda não se encontram diferenciados nos calos. As células parenquimatosas de cana-de-açúcar podem acumular até 20% de sua matéria fresca ou 60% de sua matéria seca na forma de sacarose, em seus entrenós maduros, indicando dessa forma a importância do transporte e armazenamento desses compostos para a espécie em questão. (Gutiérrez-Miceli *et al.*, 2005).

A variação dos carboidratos solúveis e do amido na embriogênese somática pode fornecer informações importantes sobre a conversão de embriões somáticos em plântulas. Estudos em *Acca sellowiana* demonstraram altas quantidades de sacarose, frutose e outros carboidratos em diferentes estágios do desenvolvimento de embriões somáticos, sendo caracterizado um acúmulo diferencial desses compostos ao longo do desenvolvimento embrionário (Pescador *et al.*, 2008).

Um fator importante relacionado ao estudo da embriogênese somática em cana-de-açúcar é a análise de diferenças metabólicas entre calos embriogênicos e não-embriogênicos, no que se refere à determinação dos açúcares totais, açúcares redutores, amido e teor de sacarose nos calos, com a finalidade de identificar uma possível relação entre os teores de açúcar e o desenvolvimento da embriogênese somática.

O conhecimento do metabolismo e dos mecanismos de acúmulo de carboidratos mostra-se de fundamental importância para o controle da embriogênese somática em cana-de-açúcar. Experimentos preliminares do grupo de pesquisa, em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar (Fim, 2009), sugeriram o envolvimento de diferentes tipos de açúcares no crescimento e desenvolvimento dos embriões. Foi identificada uma correlação direta entre os conteúdos de frutose e glicose, nas culturas mantidas nos tratamentos que promoveram os melhores índices de maturação.

O uso de culturas de calos pode ser preferível no estudo do metabolismo de acúmulo de sacarose, por representar uma grande possibilidade de controle e manipulação do meio de cultivo, facilitando o controle das condições ambientais e viabilizar o uso de diferentes cultivares simultaneamente (Gutiérrez-Miceli *et al.*, 2005).

A utilização do cultivo *in vitro* de calos de cana-de-açúcar apresenta-se dessa forma, como um modelo experimental apropriado para o a caracterização qualitativa e quantitativa do metabolismo de carboidratos em calos embriogênicos e não-embriogênicos, e a identificação de possíveis marcadores bioquímicos para a embriogênese, conforme estudado em outras espécies (Martin *et al.*, 2007).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Objetivo geral do trabalho foi a identificação de proteínas expressas diferencialmente e a determinação de carboidratos durante a embriogênese somática em cana-de-açúcar, visando a compreensão deste processo morfogênético e a otimização de protocolos de embriogênese somática em cana-de-açúcar.

### **2.2. Objetivos específicos**

- I. Estudo do padrão de expressão de proteínas durante a maturação de culturas embriogênicas,
- II. Identificação e determinação do padrão de acúmulo de dehidrinas em culturas embriogênicas e não-embriogênicas de cana-de-açúcar,
- III. Determinação dos efeitos de diferentes agentes de maturação na progressão dos embriões somáticos e no padrão de expressão de proteínas durante as diferentes etapas da maturação,

**IV.** Determinação quantitativa e qualitativa dos carboidratos sintetizados em culturas embriogênicas e não-embriogênicas durante a maturação.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material vegetal**

As culturas foram iniciadas a partir de toletes de cana-de-açúcar da variedade SP803280 (variedade usada no projeto SUCEST), gentilmente cedidos pela UFRRJ- Campus Leonel Miranda e pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). Os toletes foram retirados de touceiras, identificados e levados para o laboratório para o posterior plantio em bandejas, contendo substrato comercial esterilizado PlantMax<sup>®</sup>.

Após o plantio, o material foi mantido em condições naturais de temperatura e luminosidade e foram irrigadas diariamente, para a promoção da brotação das gemas e posterior crescimento e desenvolvimento das plantas. Após aproximadamente 70 dias de cultivo, as plantas atingiram a altura de 30 cm, em média, e encontraram-se aptas a serem utilizadas como fonte de explante.

#### **3.2. Indução das culturas**

Os explantes utilizados foram obtidos a partir das plantas cultivadas nas bandejas (figura 1 A-B), conforme descrito acima. Após o desenvolvimento, as plantas foram individualizadas para a retirada das folhas externas mais velhas, com esse procedimento, foi selecionado apenas o cilindro central, formado por folhas jovens, chamado de palmito (figura 1C). Após a obtenção do palmito deu-se início ao processo de assepsia em câmara de fluxo laminar, com a submersão do material em etanol 70% por 1 min e em 30 min em água sanitária comercial 50% (hipoclorito de sódio ativo entre 1 e 1,25%), seguindo-

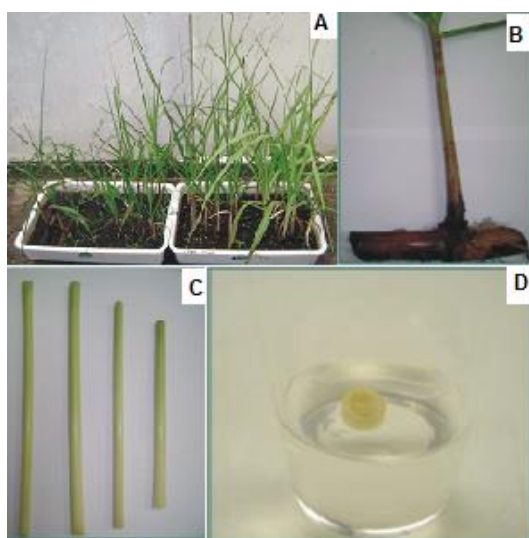
se de três lavagens sucessivas de 5 minutos com água esterilizada para a finalização do protocolo de assepsia.

Os palmitos foram seccionados transversalmente, com lâmina de bisturi, para a obtenção de discos de aproximadamente 3-4 mm, que foram utilizados como explantes (figura 1D).

A determinação do meio de cultura de indução foi estabelecida com base em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, sendo utilizada a composição que apresentou os melhores índices de indução para referida cultura (De Vita, 2008, Freitas, 2008, Fim, 2008)

Os explantes foram inoculados individualmente em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 20 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $10 \mu\text{M}$  ácido diclorofenoxiacético (2,4-D). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a  $121^\circ\text{C}$  por 15 min.

Após a inoculação dos explantes, os tubos de ensaio foram mantidos em estufas de crescimento com temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro, durante aproximadamente 45 dias. Decorrido esse período, as culturas induzidas foram transferidas para o meio de cultura de multiplicação.



**Figura 1.** Obtenção dos explantes primários- A- Plantas crescidas em substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>, B- Planta germinada, C- Palmito formado pelas folhas jovens e D- Secção transversal em meio de cultura como explantes na indução de calos.

### **3.3. Multiplicação das culturas**

As culturas induzidas foram transferidas para placas de petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL do meio de cultura de multiplicação composto por meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), Phytigel ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e 2,4-D ( $10 \text{ }\mu\text{M}$ ). As culturas obtidas foram mantidas em estufas de crescimento com temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro, sendo subcultivadas para o mesmo meio de cultura em intervalos de 21 dias até a obtenção de material suficiente para a implantação dos experimentos.

Culturas embriogênicas e não embriogênicas entre a quinta e a sétima repicagens foram utilizadas para a montagem dos experimentos de maturação. Adicionalmente, amostras de culturas embriogênicas e não-embriogênicas foram congeladas a  $-20^\circ\text{C}$  para utilização na análise proteômica comparativa e determinação de carboidratos.

### **3.4. Experimento de maturação**

As culturas foram submetidas a quatro tratamentos conforme apresentados na tabela 1. Após a inoculação, as placas contendo as culturas (com exceção do tratamento T3), foram mantidas nas condições de multiplicação em câmara de crescimento com temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro nos primeiros 7 dias e posteriormente, em fotoperíodo de 16 h de luz com aproximadamente  $60 \text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de luz direta .

**Tabela 1-** Composição química dos tratamentos utilizados

<b>Tratamento</b>	<b>Composição</b>
<b>T1</b>	Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L <sup>-1</sup> ) e phytigel <sup>®</sup> (2,0 g L <sup>-1</sup> ) e 1,5 g L <sup>-1</sup> de carvão ativado
<b>T2</b>	Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L <sup>-1</sup> ) e phytigel <sup>®</sup> (2,0 g L <sup>-1</sup> ) e 10 µM de 2,4 D
<b>T3</b>	Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L <sup>-1</sup> ) e phytigel <sup>®</sup> (2,0 g L <sup>-1</sup> ) e 10 µM de 2,4 D no escuro
<b>T4</b>	Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L <sup>-1</sup> ) e phytigel <sup>®</sup> (2,0 g L <sup>-1</sup> )

Como material vegetal utilizado, foram selecionadas, cinco colônias de 200 mg de matéria fresca (MF) para serem inoculadas em cada placa de Petri contendo 25 mL do meio de cultura do respectivo tratamento.

Foram preparadas 25 placas de petri para cada tratamento e no 7°, 14°, 21°, 28° e 35° dias de período experimental, foram utilizadas cinco placas de petri de cada tratamento contendo as culturas para a coleta de amostras para a análise proteômica e de carboidratos. Amostras de culturas utilizadas para implantação do experimento foram utilizadas como controle no tempo 0.

### **3.5. Deteminação do crescimento celular**

A análise no crescimento das culturas embriogênicas foi realizada através da comparação entre a matéria fresca inicial (200 mg), e a matéria fresca obtida nas amostras coletadas semanalmente (0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo). Inicialmente, as culturas foram fotografadas e comparadas quanto a sua evolução morfogenética. Posteriormente, as cinco colônias de cada repetição foram pesadas, sendo a média delas o resultado de crescimento de cada repetição.

Após a pesagem, as colônias de cada repetição foram divididas em amostras de 300 mg e armazenadas a -20°C para utilização na análise proteômica comparativa e determinação de carboidratos.

### **3.6. Análise proteômica**

A identificação de proteínas por 2-DE x MS/MS foram conduzidas somente para as amostras de culturas embriogênicas submetidas aos tratamentos T1 e T2. Sendo o tratamento T1 o tratamento de maturação, aquele que resultou na formação de embriões somáticos e o tratamento T2, o tratamento de manutenção.

As etapas de espectrometria de massas MS/MS e identificação de proteínas foram realizadas em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Jonas Perales do Laboratório de Toxinologia da FIOCRUZ/RJ.

As análises de desidrinas foram conduzidas em culturas embriogênicas e não-embriogênicas submetidas ao tratamento T1, que promoveu a maturação em culturas embriogênicas.

As etapas de determinação das desidrinas foram conduzidas em colaboração com o grupo de pesquisa da Profa. Sara Maldonado do Laboratorio de Anatomía y Embriología Vegetal do Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental da Univesidad de Buenos Aires (DBBE/FCEN/UBA).

#### **3.6.1. Extração de proteínas para análise de desidrinas**

A extração de proteínas para determinação de desidrinas foi conduzida conforme descrito por Burrieza *et al.* (2012). Amostras (300 mg) de culturas embriogênicas e não-embriogênicas submetidas ao tratamento T1 foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas durante 90 min a 4°C em tampão de extração contendo 50 mM Tris-HCl, (pH 7,6), NaCl 500 mM, MgCl 25 mM, e um coquetel inibidor de protease (Sigma®). Após duas

centrifugações a 10.000 g, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi imerso em banho-maria a 96°C durante 10 minutos e posteriormente centrifugado a 10.000 g durante 10 min a 4°C a fim de isolar as proteínas termoestáveis.

Para a quantificação, foi utilizado o Platform Qubit Quantitation Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

### **3.6.2. Determinação de desidrinas**

A determinação de desidrinas foi conduzida conforme descrito por Burrieza *et al.* (2012). As proteínas foram separadas por eletroforese a uma voltagem constante de 100 V durante 120 minutos utilizando um Kit Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories). Após a eletroforese, as proteínas fracionadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose a 100 V durante 60 minutos utilizando uma eletroforese Mini Trans-Blot (Bio-Rad).

Após bloqueio e incubação com o anticorpo policlonal anti-dehidrina primário com uma diluição 1:1000 em TTBS (TBS-Tween a 0,05%). Todas as incubações e lavagens foram realizadas com agitação suave à temperatura ambiente.

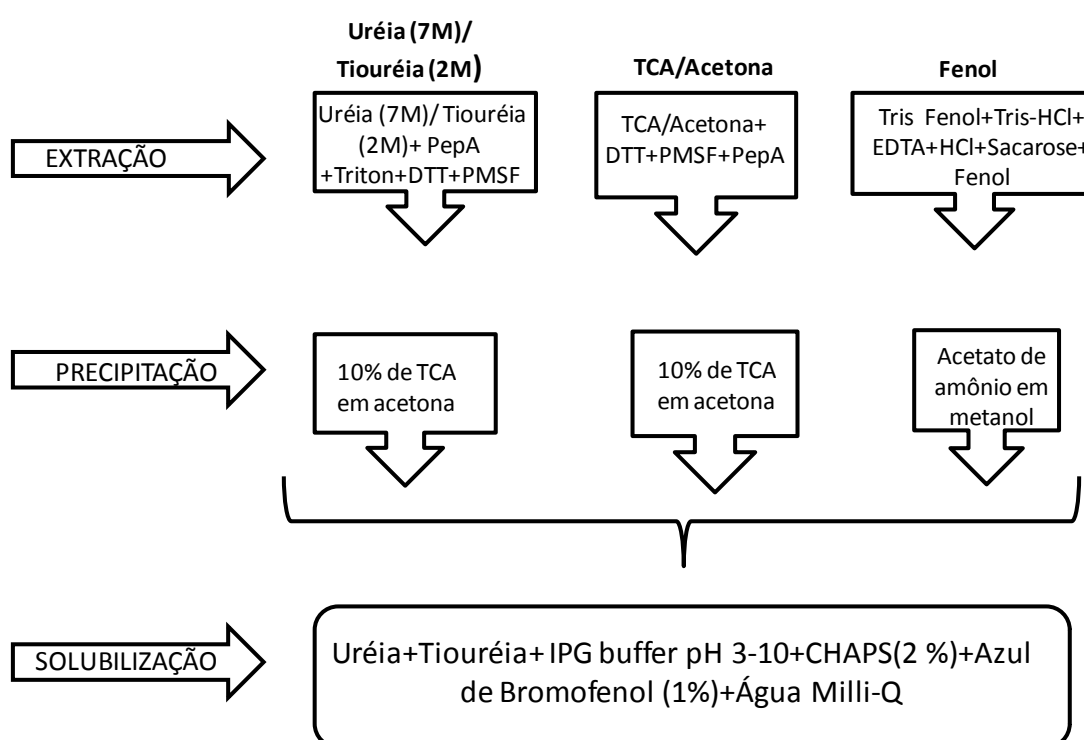
As quantidades relativas de proteína foram quantificadas por densitometria, conforme proposto por Retamal *et al.* (1999), utilizando programa computacional a partir de uma imagem TIFF, que calcula a mobilidade relativa de cada banda corada e sua intensidade correspondente, bem como a produção de um diagrama de representação das bandas de proteínas.

### **3.6.3. Extração de proteínas para 2-DE**

Estudos preliminares foram realizados para otimização de protocolos de extração para culturas embriogênicas e não-embriogênicas de cana-de-açúcar, com base em três métodos distintos: uéria/tiouréia (Balbuena *et al.*, 2009), TCA/acetona (Carpentier *et al.*, 2005) e Fenol (Natarajan *et al.*, 2005) (figura 2).



Após testes com os protocolos de extração (TCA/Acetona, Uréia/Tiouréia e Fenol), o protocolo de extração com a utilização de Uréia/Tiouréia, foi selecionado para as análises proteômicas baseado no proposto por Balbuena *et al.*, 2009, em razão do mesmo atender plenamente as necessidades experimentais para o prosseguimento da identificação de proteínas por espectrometria de massas pela plataforma 2DE-MSxMS.



**Figura 2.** Esquema demonstrativo das metodologias de extração proteica utilizadas.

A extração com tampão uréia/tiouréia selecionado, apresenta a seguinte descrição: amostras de 600 mg de MF foram maceradas na presença de nitrogênio líquido com posterior com a adição de 1,0 mL de tampão de extração uréia/tiouréia, composto por uréia (7M), tiouréia (2M), e dithiohreitol (DTT)(1%), triton(2%), pharmalyte<sup>®</sup>(0,5%), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) (1mM).

Após a etapa de maceração, o macerado obtido, foi coletado para um microtubo de 1,5 mL, sendo agitado em agitador de tubos, por 1 minuto, e posteriormente incubado por 1 hora em gelo.

Em sequência, após a incubação a amostra foi submetida a centrifugação a 12.000g por 10 minutos, sendo coletado o sobrenadante que contém a fração protéica e armazenado à -80°C para posterior quantificação de proteínas e utilização na preparação da 2-DE. As concentrações protéicas das amostras foram determinadas com o uso do 2D-Quant Kit<sup>®</sup> (GE HealthCare).

#### **4. Eletroforese bidimensional (2-DE)**

Para o experimento de identificação de proteínas foram utilizadas alíquotas de 600 µg proteína e coloração com comassie coloidal. As amostras de proteínas foram precipitadas com TCA (ácido tricloacético) 10% e o pellet resultante foi ressuspenso em 375 µL de tampão de reidratação composto por uréia (7M), tiouréia (2M), CHAPS (2%), IPG Buffer (0,5%), azul de bromofenol (0,002%) e DTT (1%) (Balbuena *et al.*, 2009).

A focalização isoelétrica (IEF) foi conduzida numa unidade IPGPhor 3 (GE HealthCare). Foram utilizadas tiras de gel IPG de 18 cm, com diferentes gradientes de pH (4-7 e 3-10). A reidratação da tira de gel IPG (strip) e o carregamento da amostra foi realizado simultaneamente, com a aplicação direta das amostras solubilizadas no tampão de reidratação.

A reidratação da tira de gel IPG foi conduzida por 12 h, a 20°C. A IEF ocorreu de acordo com recomendações do fabricante da unidade IPGPhor 3 para as tiras de gel IPG com pH de 4-7 e 3-10 lineares. A corrida ocorreu a 20°C, com corrente de 50 µA por strip, seguido por etapas sucessivas de incremento de voltagem, até o alcance da voltagem final de 20000 Volts-horas, totalizando aproximadamente 18 horas de isofocalização de acordo com testes preliminares. Antes do início da segunda dimensão, as tiras de gel IPG foram reduzidas (125 mM ditioneína) e alquiladas (125 mM iodoacetamida).

A segunda dimensão foi conduzida num sistema Protean II XI cell (BIO-RAD<sup>®</sup>), com a utilização de uma fonte modelo Power Pac Universal (BIO-RAD<sup>®</sup>), para geração de corrente elétrica. Onde cada tira de gel foi disposta horizontalmente na extremidade superior do gel de poliacrilamida 12% e a

separação eletroforética foi conduzida com corrente constante por gel de 12,5 mA nos primeiros 30 min e 25 mA até atingir o final da corrida.

Com o término da segunda dimensão os géis foram retirados da cuba, para a lavagem e o início dos procedimentos de coloração.

As proteínas foram visualizadas pela coloração com coomassie coloidal, proposta por Neuhoff *et al.* (1985), que propõe, a coloração, após seguidas etapas de exposição a três soluções, aplicadas na sequência: solução de fixação (40% de etanol, 10% de ácido acético e 50% de água), solução de trabalho (80% da solução estoque de Coomassie (0,1% (w/v) Coomassie Brilhante Blue G250, 1,2% (v/v) ácido orto-fosfórico (85%), 10% (w/v) sulfato de amônio) e 20% de metanol) e solução de ácido acético (1% de ácido acético (V/V)).

## **5. Análise de imagens**

Os géis corados foram digitalizados e analisados no programa Image Master Platinum v.7.0 (GE Healthcare<sup>®</sup>). Foram utilizados géis em triplicata para cada amostra biológica. A autenticidade e o contorno de cada “spot” de proteína foram validados por inspeção visual. A identificação e seleção de proteínas expressas diferencialmente foram obtidas através de análises comparativas dos diferentes géis. Após a digitalização, os géis foram acondicionados em embalagens plásticas contendo solução de 1% de ácido acético (v/v), para serem utilizados posteriormente na identificação de massas.

## **6. Identificação de proteínas**

Após a análise dos géis no software, Image Master Platinum v.7 (GE Healthcare<sup>®</sup>) e seleção dos spots, foi baseada no critério de seleção comparativo de presença/ausência de spots detectados em géis de culturas embrionárias, submetidas aos tratamentos de maturação (T1) e manutenção (T2).

Os spots foram excisados dos géis, e cortados em pedaços menores de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup>. Os spots selecionados foram digeridos com tripsina de acordo com a metodologia proposta por Silveira *et al.* (2008). Após a excisão os spots foram submetidos à adição de 350 µl de água por 5 minutos, procedendo-se a remoção da água e adição de 190 µl de acetonitrila por 20 minutos. Decorrida esta etapa retirou-se o excesso de acetonitrila, e iniciou-se a secagem no concentrador (Speed vac Plus-SC210A-Savant), por 15 minutos. Após a secagem adicionou-se 15 µl de uma solução de tripsina (Promega, Madison, WI) com uma concentração final de 33 ng/µl, a fim de que a mesma cobrisse os pedaços de gel, e permanecesse em contato com estes por 60 minutos no gelo. Após esse período, removeu-se o excesso de tripsina com a utilização de micropipeta e iniciou-se a incubação em banho-maria a 58°C por 30 minutos.

Decorrida a digestão pela ação da tripsina, adicionou-se 30 µl de uma solução de ácido fórmico 5%/acetonitrila 50%, sendo a mesma agitada por 20 segundos, ultassonicada por 10 minutos e novamente vortexada por 20 segundos. Esse procedimento foi repetido a fim de que ao final do mesmo obtivéssemos uma solução de peptídeos, que foi concentrada até o volume aproximado de 10 µl. Os peptídeos contidos na solução resultante foram concentrados e dessalinizados com o uso de ponteiros do tipo Zip Tip C18 (Millipore<sup>®</sup>) anteriormente à espectrometria de massas.

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

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

A classificação funcional e determinação da função molecular das proteínas, identificadas pelo programa MASCOT, foram obtidas com a utilização do programa Blast2go ([www.blast2go.com](http://www.blast2go.com)), utilizado com os parâmetros descritos na tabela 2.

**Tabela 2-** Parâmetros utilizados do programa Blast2go.

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

## 7. Determinação de carboidratos

A metodologia utilizada para a determinação de carboidratos foi baseada na proposta por Filson *et al.* (2009), com modificações.

Foram utilizadas amostras de calos embriogênicos e não-embriogênicos de cana-de-açúcar na fase de multiplicação e submetidos aos 4 tratamentos de maturação.

Para a determinação dos carboidratos foram utilizados amostras de 300 mg de matéria fresca de cana-de-açúcar, que foram maceradas com a adição de 1 mL de solução de extração composta por etanol (ETOH) 80%, polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 3% (p/v) e ácido ascórbico 1% (p/v), a 4 °C.

Após a maceração a amostra procedeu-se uma breve agitação em vórtex, e os microtubos foram levados ao banho-maria a 70°C por 90 min.

Após a retirada dos microtubos do banho-maria, os mesmos foram submetidos a centrifugação por 12000g por 10 min. Sendo procedida a coleta e o armazenamento do sobrenadante, e ressuspendido o pellet em 1 mL de solução de extração, resubmetida a centrifugação nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes resultantes foram adicionados aos provenientes da primeira centrifugação e armazenados a -20°C. Os carboidratos foram identificados e quantificados por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Pressão) usando um detector de espalhamento de luz (ELSD-LT II), com configuração do detector de: temperatura de 40 °C, pressão de N<sub>2</sub> em 350 mPa, com ganho 9 e filtro 4.

A coluna utilizada, que representa a fase estacionária (FE), foi uma coluna Prevail Carbohydrate ES 5 µm (250 x 4,6 mm), com uma pré coluna do tipo Prevail Carbohydrate ES 5 µm (7,5 x 4,6 mm). Sendo a temperatura do forno de colunas mantida a 25°C.

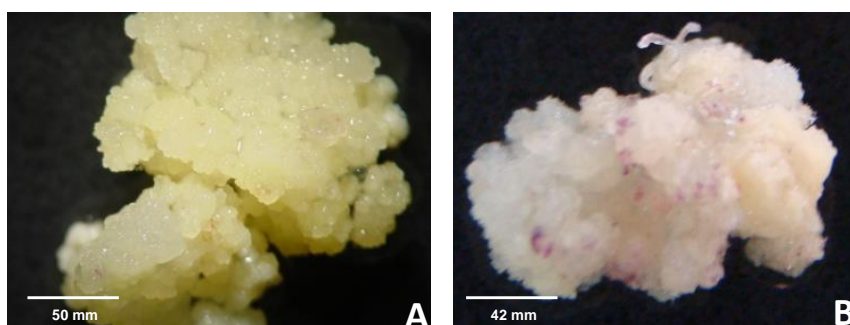
Como solventes, que representam a fase móvel (FM) foram utilizados: Água Milli`Q, como solvente A, e acetonitrila 100%, como solvente B, sendo ambas as soluções submetidas a filtração prévia, em filtros de 0,2 µm. A corrida foi realizada em gradiente isocrático ajustado para 85% de solvente B durante 50 min. O fluxo de corrida foi determinado em vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

As áreas e tempos de retenção dos carboidratos foram avaliados por comparação com padrões em diferentes concentrações (Kit CARB 10 -SIGMA-ALDRICH®).

## 8. Resultados e discussão

### 8.1. Maturação de culturas

Durante a multiplicação as culturas induzidas em meio de cultura do tratamento T2, na presença de 2,4-D, foram obtidas culturas classificadas como embriogênicas e não embriogênicas de acordo com Lakshmanan (2006). As culturas embriogênicas são caracterizadas por apresentarem aspecto nodular opaco, não-friável e facilmente destacável, enquanto que as culturas não-embriogênicas são friáveis e translúcidas (figura 3). Também podem ser observadas culturas mistas com porções embriogênicas e não-embriogênicas no mesmo calo.



**Figura 3-** Aspectos morfológicos de culturas de cana-de-açúcar. A- culturas embriogênicas e B culturas não-embriogênicas.

A indução e multiplicação de culturas embriogênicas são etapas essenciais para desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por embriogênese somática. Nesse sentido, o uso de auxinas em meios de cultura para a propagação massal de culturas celulares tem representado uma importante estratégia em diferentes espécies (Balbuena *et al.*, 2011, Viera, *et al.*, 2012, Phulwaria *et al.*, 2013, Aslam *et al.*, 2013).

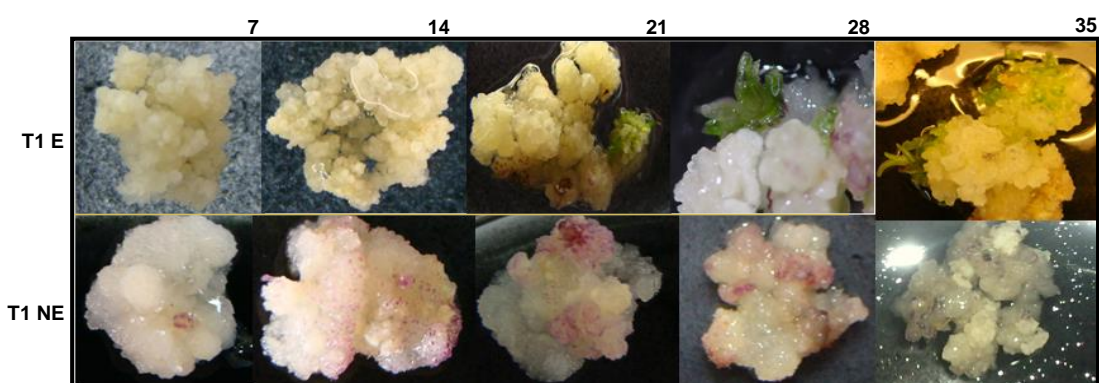
A ação de auxinas na indução e manutenção do crescimento e desenvolvimento celular em culturas celulares ocorre por duas principais rotas: a relacionada à promoção do crescimento por acidificação da parede celular, resultando em aumento de sua extensibilidade e consequente crescimento, e

outra relacionada à indução da transcrição de mRNAs responsáveis pela codificação de proteínas associadas ao crescimento celular (Richard *et al.*, 2002). Em cana-de-açúcar, a ação do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), uma auxina forte, é apresentada como importante fitorregulador em diversas espécies da família Poaceae (Lakshmanan *et al.*, 2006).

Para a entrada na fase de maturação é necessária a retirada da auxina do meio de cultura e concomitantemente a adição de um agente de maturação. Em cana-de-açúcar, trabalhos anteriores mostram que o carvão ativado (CA) apresenta um papel indutor do processo de maturação de culturas embriogênicas de cana-de-açúcar (Macedo, 2010, De Vita, 2011, Fim, 2012).

O CA tem sido utilizado para promover a micropropagação, germinação de sementes, embriogênese somática, cultura de anteras, produção de sementes sintéticas, cultura de protoplastos e a formação de bulbos, entre outros (Thomas, 2008), sendo utilizado na cultura de tecidos principalmente para estimular o enraizamento, restaurar a capacidade embriogênica em calos envelhecidos e diminuir a intoxicação de explantes pelos fenóis oxidados, produzidos pelos próprios tecidos *in vitro* (Torres *et al.*, 1998).

Os tratamentos testados mostram a ação do CA na formação de embriões somáticos a partir do 21º dia em culturas embriogênicas mantidas no tratamento de maturação (T1) (figura 4).

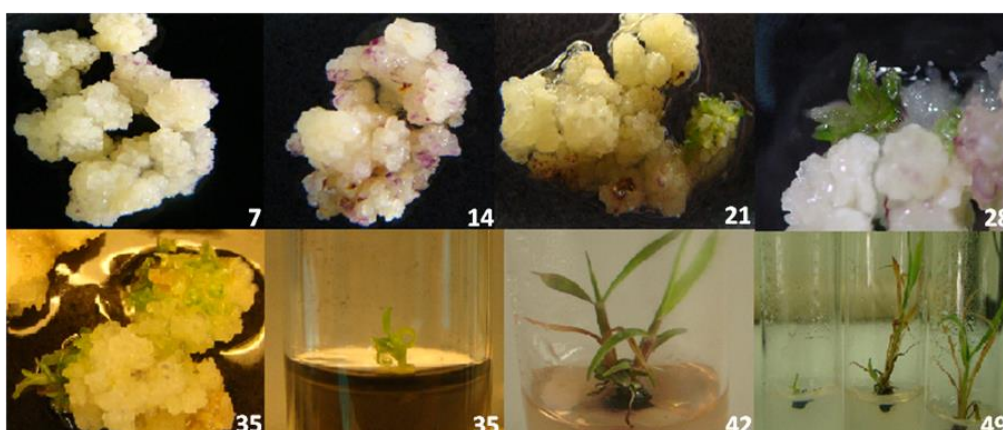


**Figura 4-** Efeito do carvão ativado (CA) em culturas embriogênicas (E) e não-embriogênicas (NE) de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento de maturação (T1) contendo MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, durante o 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dias de desenvolvimento.



Os resultados obtidos indicam a ação potencializadora do carvão ativado (CA) nas respostas de maturação de culturas embriogênicas de cana-de-açúcar. Embora o CA não seja um regulador de crescimento, vem sendo utilizado com frequência para otimizar ou regular a morfogênese *in vitro* (Lameira *et al.*, 1997, Pan e Staden, 1999, Nhut *et al.*, 2001). Os solutos em contato com o CA em uma solução, seriam adsorvidos até que um equilíbrio entre as moléculas adsorvidas e as não-adsorvidas seja estabelecido (Thomas, 2008). O seu efeito benéfico é atribuído à adsorção de substâncias inibitórias do crescimento e desenvolvimento vegetal (Thomas, 2008) como: reguladores de crescimento residuais, vitaminas, etileno (Van Winkle *et al.*, 2003) e compostos fenólicos (Perera *et al.*, 2008) presentes no meio de cultura.

Os resultados obtidos indicam a ação do carvão ativado sob o processo de diferenciação de embriões somáticos em cana-de-açúcar conforme descrito por De Vita, 2008, para diferentes variedades de cana-de-açúcar. Essa ação fica claramente evidenciada a partir do 21º dia de cultivo, onde observa-se o surgimento de brotos e posteriormente, dando seguimento aos processo de diferenciação celular, a partir do 28º dia de cultivo, culminando com a formação e o desenvolvimento de plântulas a partir do 35º dia de cultivo até o 49º dia de cultivo (figura 5).



**Figura 5-** Maturação de culturas embriogênicas de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento de maturação contendo MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel® ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado (claro), durante o 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º e 49º dias de desenvolvimento, plantas regeneradas a partir de calos embriogênicos.

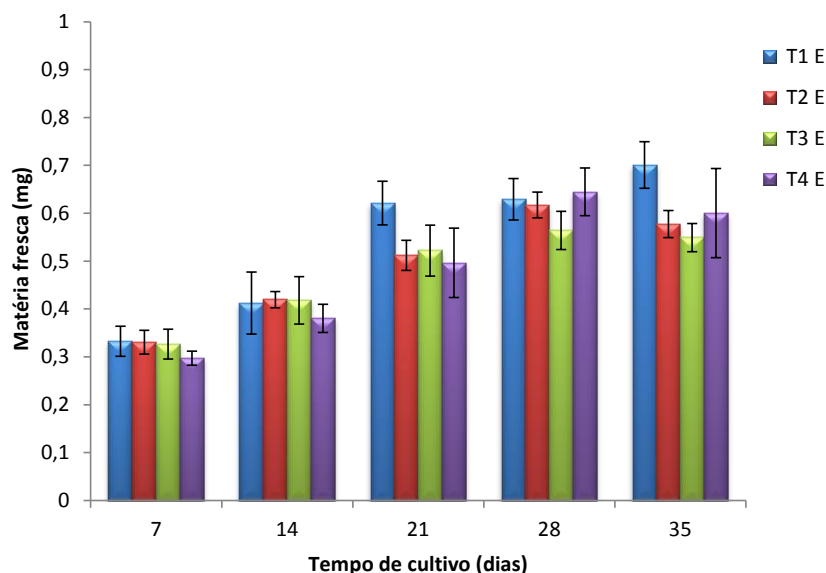
A determinação do crescimento das culturas embriogênicas e não embriogênicas, foram obtidas ao longo das datas de coletas estipuladas no início do experimento, sendo caracterizadas por 0, 7, 14, 21, 28, 35 dias de cultivo após a inoculação das culturas nos 4 diferentes meios de culturas selecionados sendo eles: tratamento 1- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado, tratamento 2- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $10 \mu\text{M}$  de 2,4 D, no claro, tratamento 3- Meio de cultura MS, phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $10 \mu\text{M}$  de 2,4 D no escuro, tratamento 4- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ), sendo diferenciadas culturas embriogênicas e não-embriogênicas.

A determinação do incremento de matéria fresca de um modo geral, não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos propostos até o 14º dia após o início do experimento, em culturas embriogênicas e não-embriogênicas (figuras 6 e 7). Surgindo, no entanto, diferenças significativas no incremento de matéria fresca, em culturas embriogênicas, no do 21º dia do período experimental para as culturas embriogênicas submetidas ao tratamento de maturação (T1-Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado), sendo essa diferença novamente significativa no 35º de cultivo para o mesmo tratamento (figura 6).

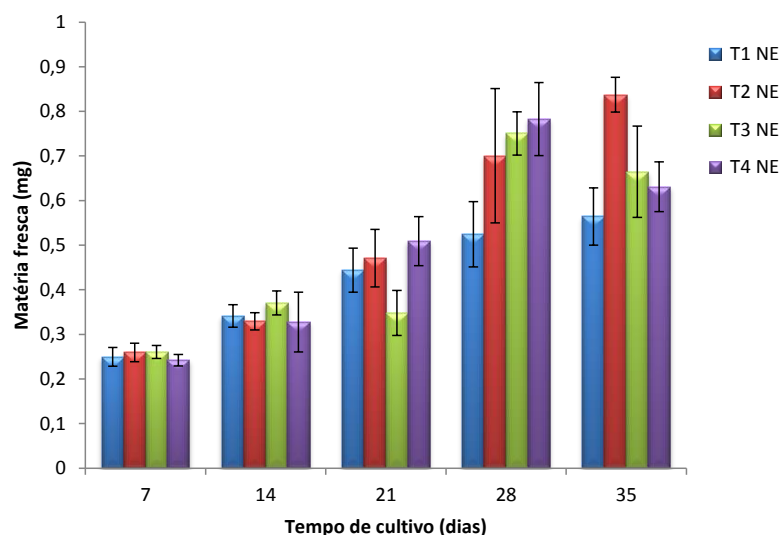
As diferenças significativas detectadas no tratamento de maturação no 21º e 35º dia do período experimental, podem estar associada à supressão de 2,4D do meio de cultura representada nesse tratamento, e conseqüentemente ao processo de diferenciação celular, promovido pela ausência da auxina (Lakshmanan *et al.*, 2006, Zimmerman, 1993, Cecarelli *et al.*, 2000, Jimenez, 2001, Sharma *et al.*, 2008, Su *et al.*, 2009) e ao início do processo de diferenciação celular, induzido pela ação do carvão ativado presente no referido tratamento.

Culturas não-embriogênicas não apresentaram diferenças significativas em relação ao incremento de matéria fresca ao longo do tempo de cultivo (figura 7). As taxas reduzidas de incremento de matéria fresca de culturas não-embriogênicas quando comparadas a culturas embriogênicas, estão relacionadas a menores taxas de crescimento características de calos não-embriogênicos.

A exceção do 21° dia, para o tratamento T3 (Meio de cultura MS, phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 µM de 2,4 D no escuro e 35° dia de cultivo, para o tratamento T2 (Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>), phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 µM de 2,4 D, no claro), as diferenças significativas pontuais detectadas em culturas não-embriogênicas de cana-de-açúcar nos tratamentos acima citados, podem estar relacionadas à presença de auxina 2,4 D, uma vez que a mesma tem sido associada a um grande número de vias regulatórias do processo de crescimento vegetal em diferentes espécies (Sharma *et al.*, 2008, Phulwaria *et al.*, 2013, Raza *et al.*, 2010).

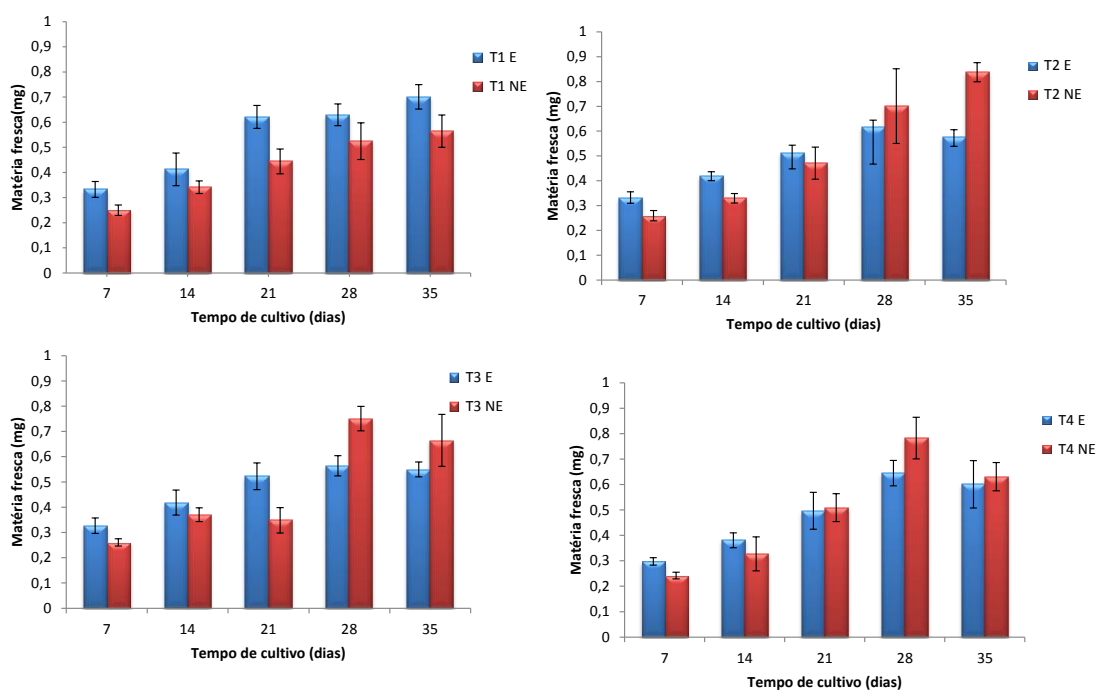


**Figura 6**-Incremento de matéria fresca em mg em culturas embriogênicas (E): T1- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, tratamento T2- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>), phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 µM de 2,4 D, no claro, tratamento T3- Meio de cultura MS, phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 µM de 2,4 D no escuro, tratamento T4- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir das médias de 3 placas contendo 5 culturas por placa).



**Figura 7-** Incremento de matéria fresca em mg em culturas não-embriogênicas (NE): T1- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado, tratamento T2- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $10 \mu\text{M}$  de 2,4 D, no claro, tratamento T3- Meio de cultura MS, phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $10 \mu\text{M}$  de 2,4 D no escuro, tratamento T4- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir das médias de 3 placas contendo 5 culturas por placa).

A análise comparativa dos dados de incremento de matéria fresca de culturas embriogênicas e não-embriogênicas submetidas aos 4 tratamentos propostos evidencia a diferença significativa entre as culturas para o tratamento T1 no 7°, 21° e 35° dias de cultivo, para o tratamento T2 no 7°, 14° e 35°, no tratamento T3 no 7°, 21° e 28° e para o tratamento T4 apenas no 7° dia de cultivo. Os resultados obtidos indicam a resposta diferenciada entre culturas embriogênicas e não-embriogênicas de cana-de-açúcar submetidas à ausência de 2,4D e presença de carvão ativado (T1) e a presença de 2,4D (T2 e T3), e ausência de ambos os promotores de crescimento representados pelo tratamento T4 (figura 8).



**Figura 8-** Incremento de matéria fresca em mg, a partir de 300 mg por colônia, aplicadas em 4 diferentes tratamentos: T1- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado, tratamento T2- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $10 \mu\text{M}$  de 2,4 D, no claro, tratamento T3- Meio de cultura MS, phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $10 \mu\text{M}$  de 2,4 D no escuro, tratamento T4- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) em culturas embriogênicas (E) e não embriogênicas (NE) (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir das médias de 3 placas contendo 5 culturas por placa).

Os maiores incrementos de matéria fresca em culturas embriogênicas quando comparadas a culturas não-embriogênicas submetidas a tratamento com carvão ativado e 2,4D, também foram identificados por Macedo (2010) e De Vita (2011) em variedades correlatas de cana-de-açúcar, indicando uma resposta recorrente de culturas de cana-de-açúcar, a exposição aos referidos fatores de crescimento.

Segundo os dados obtidos existem diferenças significativas entre os índices de matéria fresca entre culturas embriogênicas e não-embriogênicas, para o tratamento T1 de maturação das culturas (Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado), fato justificado pelo maior desenvolvimento das culturas embriogênicas, com o surgimento de brotos e embriões a partir do 21º dia de

experimento, caracterizando o processo de diferenciação celular determinado pela maturação das culturas.

A regeneração completa de plantas a partir de calos embriogênicos de cana-de-açúcar pode ser verificada a partir do 35º dia de cultivo, completando-se no 49º dia de experimento conforme demonstrado na figura 5. Os resultados relacionados maturação das culturas e diferenciação celular podem estar relacionados a presença no meio de cultura do composto de carvão ativado, que apresenta conhecida ação de eficiente adsorção de compostos fenólicos comumente produzidos em culturas vegetais submetidas a repetidos ciclos de multiplicação e repicagem (Perera *et al.*, 2008).

A referida capacidade de adsorção do carvão ativado se deve em parte pela sua alta micro porosidade e grande área de superfície de absorção (Thomas, 2008). O efeito adsortivo apresentado pelo carvão ativado, embora ainda não caracterizado como promotor de crescimento vegetal tem sido relacionado a resultados positivos relacionados com o crescimento de culturas vegetais em diversas espécies, em razão da remoção de substâncias inibidoras do crescimento vegetal, comumente produzidas após o processo de autoclavagem, e decorridos sucessivos períodos de subcultivo das culturas vegetais (Lameira *et al.*, 1997, Pan e Van Staden, 1998, Pan e Staden, 1999, Nhut *et al.*, 2001)

O surgimento de brotos e posteriormente plântulas apenas em culturas embriogênicas submetidas ao tratamento T1 (Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado), vem corroborar os dados científicos que sugerem a ação do carvão ativado como promotor auxiliar do crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular em culturas de cana-de-açúcar, conforme anteriormente descrito para outras espécies.

As culturas submetidas aos tratamentos T2 Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>), phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 µM de 2,4 D, no claro e T3- Meio de cultura MS, phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 µM de 2,4 D, apresentaram diferenças significativas apenas em datas de coletas específicas no início (dia 7 e 14) e no fim (dia 35), para o tratamento T2 e nas coletas dos dias 7, 21 e 28 para o tratamento T3. Esse fato pode estar associado à

presença de 10  $\mu\text{M}$  de 2,4 D uma auxina que impede o desenvolvimento diferenciado das culturas embriogênicas mantendo as taxas de crescimento próximas a das culturas não-embriogênicas (Sharma *et al.*, 2008, Phulwaria *et al* 2013 e Raza *et al.*, 2010).

O tratamento representado por T4- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>), apresentou os menores índices de incremento de matéria fresca, quando comparado aos outros três tratamentos proposto, não apresentando diferença significativa entre as culturas embriogênicas e não-embriogênicas (figura 8), a não diferenciação e os menores índices no tocante as taxas de incremento de matéria fresca, para o referido tratamento, podem estar relacionadas a ausência de promotores de crescimento e de diferenciação celular como os representados pela auxina 2,4D e pelo carvão ativado, ausentes nesse tratamento (Gubisová *et al.*,2013, Phulwaria *et al.*, 2013)

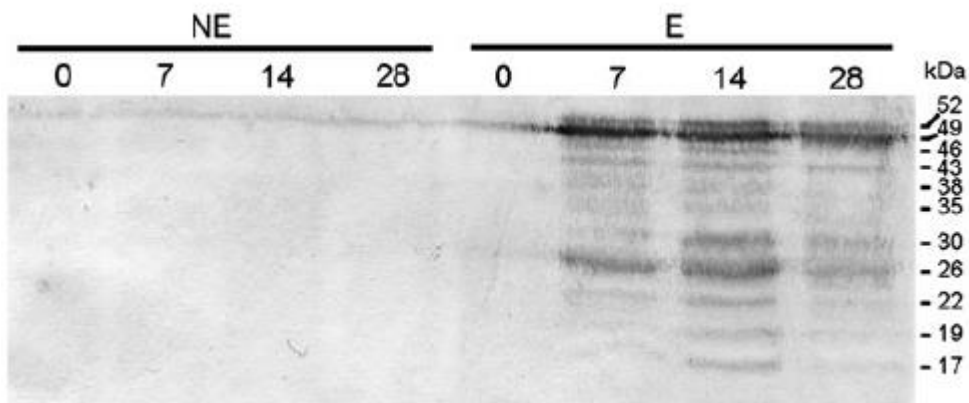
## **8.2. Análise proteômica**

### **8.2.1. Identificação de desidrinas**

Para a identificação de desidrinas e determinação de seu padrão de acúmulo durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar, foi realizada uma análise de Western blot da fração de proteína estável ao calor, em culturas embriogênicas e não-embriogênicas de cana-de-açúcar, submetidas ao tratamento de maturação. Foram coletadas amostras aos 0, 7, 14 e 28 dias de cultivo.

Como principal resultado foi observada a ausência de desidrinas em culturas não-embriogênicas de cana-de-açúcar (figura 9).

Já nas culturas embriogênicas foram identificadas 11 bandas de desidrinas, com massas moleculares correspondentes a: 52, 49, 46, 43, 38, 35, 30, 26, 22 kDa, que apresentam um sítio de fosforilação característico.



**Figura 9-** Western blot para a análise da expressão de desidrinas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar- identificação de desidrinas em culturas não-embriogênicas (NE) e embriogênicas (E).

Nas culturas embriogênicas, o acúmulo máximo de desidrinas totais atingiu maior nível no 14º dia de cultivo (figura 9). A banda de 49 kDa apresentou maiores níveis de acúmulo aos 7 e 14 dias de cultivo. As demais bandas atingiram os mais altos níveis de acúmulo no 14º dia de cultivo. Essas bandas também estavam presentes no 28º dia, embora os seus níveis de expressão, com exceção da banda de 52 kDa, diminuíram significativamente (figura 9A). Estudos em eletroforese SDS-PAGE, em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar variedade CP 5243 mostraram a presença de uma proteína marcadora, sugerindo uma potencial associação entre esta proteína e a capacidade regenerativa potencial de uma cultura embriogênica (Blanco *et al.*, 1997). Em culturas embriogênicas *Quercus robur* foi observado que o aumento na expressão de dois genes homólogos para desidrina, Dhn1a Dhn1b, durante a maturação, estava relacionado com o aumento na frequência de conversão de embriões somáticos (Sunderlíkova e Wilhelm, 2002).

Resultados similares foram observados durante a embriogênese somática de *Daucus carota*, onde foi constatado que desidrinas-ECPP44 apresentaram um padrão diferente de fosforilação em culturas embriogênicas e não-embriogênicas (Ko *et al.*, 2006).

Nossos resultados indicam que em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280, a síntese de desidrinas está caracterizada nos primeiros dias de cultivo em tratamento de maturação, aumentando gradualmente até atingir valores máximos por volta do 14º dia de



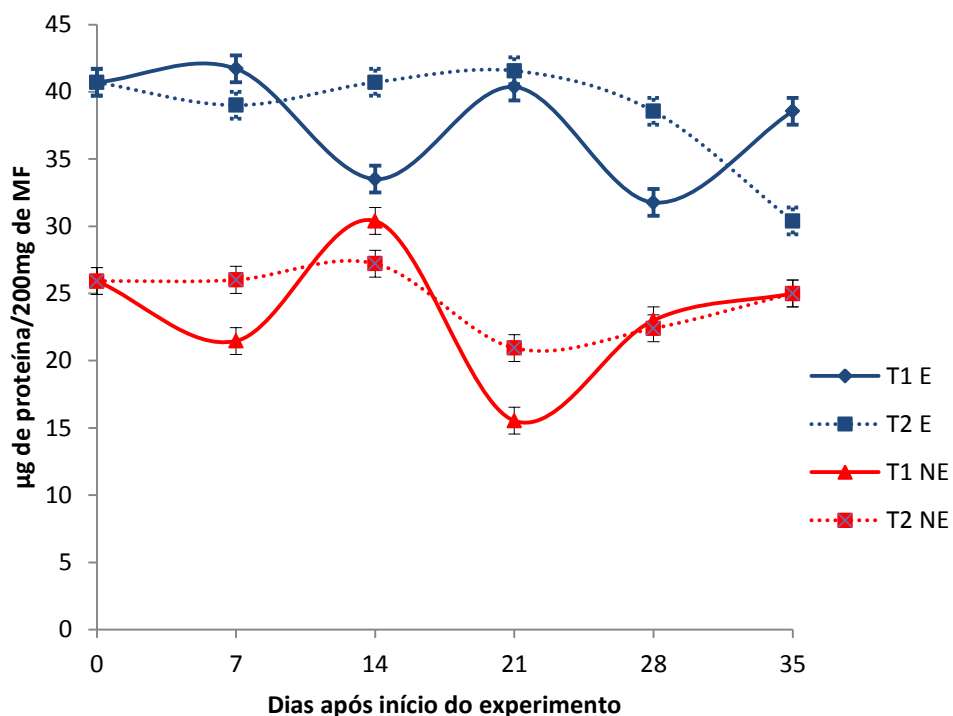
desenvolvimento, sendo esse período sucedido de uma gradual redução de síntese da referida proteína, sendo esta redução potencialmente associada ao início de surgimento de brotos nas referidas culturas.

Finalmente, a ausência de desidrinas em culturas não-embriogênicas e presença destas proteínas somente nas culturas embriogênicas, após submissão ao tratamento de maturação, indicam que estas proteínas podem estar associadas com aquisição da competência embriogênica e capacidade de formação dos embriões somáticos. Durante a maturação os níveis detectados de desidrinas apresentaram um padrão de acúmulo associado ao desenvolvimento e surgimento dos embriões somáticos e evolução para plântulas somáticas em culturas embriogênicas (figura 9). Estudos complementares para caracterização das sequências, localização, padrão de acúmulo das desidrinas, podem fornecer um ponto de partida para novos estudos sobre o papel dessas proteínas na indução e/ou manutenção da competência embriogênica em cana-de-açúcar.

### **8.2.2. Quantificação de proteínas**

Inicialmente, foi realizada a determinação dos conteúdos protéicos entre as culturas embriogênicas e não-embriogênicas de cana-de-açúcar nos tratamentos T1 e T2. Foi observado um maior conteúdo de proteínas nas culturas embriogênicas quando comparado às culturas não-embriogênicas (figura 10), nos dois tratamentos.

Os maiores teores de proteína encontrados em culturas embriogênicas, podem estar relacionados ao maior crescimento das culturas embriogênicas submetidas ao meio de maturação (figura 6), quando comparados a culturas não-embriogênicas submetidas aos mesmos tratamentos descritos, em razão da maior taxa de multiplicação e desenvolvimento e diferenciação celular características das culturas embriogênicas.



**Figura 10-** Conteúdo protéico ( $\mu\text{g}/200\text{mg}$  de matéria fresca (MF)) em culturas embriogênicas (E) e não-embriogênicas (NE) de cana-de-açúcar. T1- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado, e T2 Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $10 \mu\text{M}$  de 2,4 D após 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir das médias de 3 placas contendo 5 culturas por placa).

Estudos que relatam o conteúdo de proteína em sistemas promotores da embriogênese somática indicam que a presença no meio de cultura de promotores de crescimento, incrementam significativamente os teores totais de proteínas, em concordância com os resultados obtidos no presente estudo (Sghaier *et al.*, 2008, Sghaier *et al.*, 2009, Sghaier-Hammami *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos permitem uma inferência indireta entre a matéria fresca acumulada e o conteúdo de proteína, em culturas embriogênicas e não-embriogênicas submetidas ao tratamento com carvão ativado, sugerindo a real ação do referido composto como agente promotor de crescimento e desenvolvimento celular em sistemas de cultivo de *in vitro* com o desenvolvimento de embriogênese somática conforme indicação de literatura

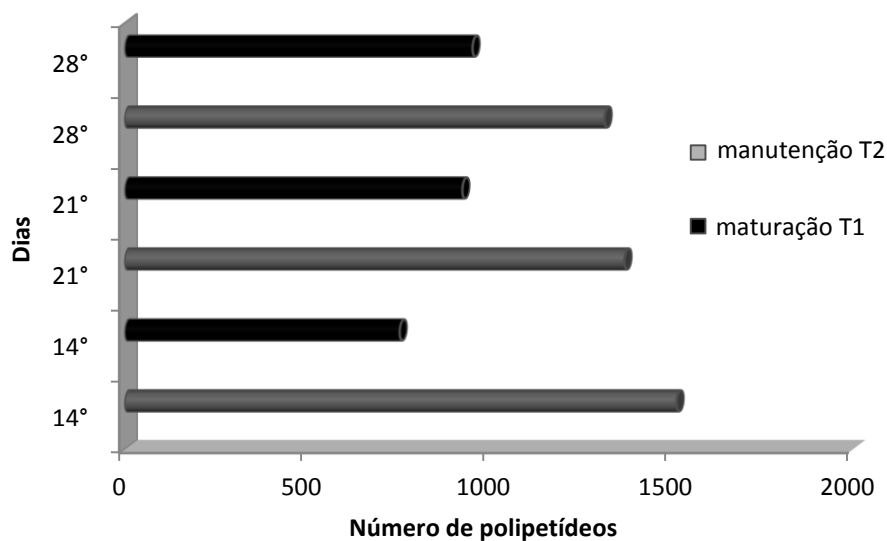
científica (Lameira *et al.*, 1997, Zaghmout e Torello, 1988, Perera *et al.*, 2008, Thomas, 2008,).

### **8.2.3. Identificação de Proteínas**

Conforme citado anteriormente, os resultados obtidos no presente estudo indicam a manifestação da capacidade embriogênica nas culturas embriogênicas de cana-de-açúcar quando submetidas ao tratamento de maturação utilizado (T1-meio de cultura MS suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,0 g L<sup>-1</sup> de phytigel® e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado). Foi possível a observação de várias fases do cultivo desde o início da cultura passando pela obtenção de embriões somáticos até a conversão de plantas (figura 5).

O início da formação de embriões somáticos ocorreu após 14 dias de cultivo das culturas embriogênicas no tratamento de maturação. Decorridos 21 dias de exposição ao meio de maturação, a formação completa de embriões somáticos é evidenciada, sendo posteriormente identificadas, no 28° dia de exposição ao meio de maturação, a formação de plântulas somáticas a partir de embriões somáticos (figura 5).

A análise comparativa dos géis 2-DE a partir, de amostras de extratos proteicos de culturas embriogênicas submetidos aos meios de maturação (T1) e manutenção (T2), aos 14, 21 e 28 dias de cultivo, revelou uma diferença significativa no número de polipeptídeos observados em entre os tratamentos, para todas as datas de cultivo analisadas. Além da maior quantidade de polipeptídeos (spots), o conteúdo de proteína total das culturas embriogênicas mantidas no meio de manutenção (T2) também foram superiores nestes tempos de cultivo (figura 11).

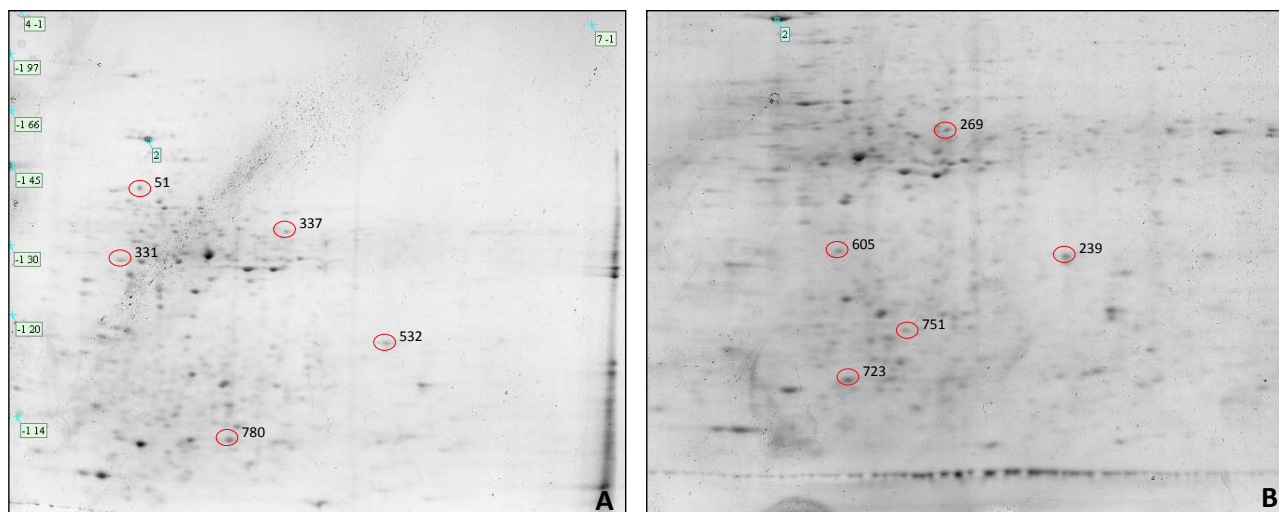


**Figura 11-** Número de polipeptídeos identificados pelo programa Image Master Platinum V.7, nos tratamentos de manutenção (meio de cultura MS, suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,0 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e 10 µM 2,4-D) e maturação (meio de cultura MS suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,0 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado).

A identificação de proteínas pela plataforma 2-DE/MSxMS, mostrou-se satisfatória uma vez que, dos 350 spots selecionadas para a análise por espectrometria de massas, cerca de 138 foram selecionados para discussão, após análise *in silico*, e estabelecimento de score mínimo de 50.

Dos 138 polipeptídeos com identificação positiva com a utilização do MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), 30 proteínas foram identificadas como homólogas em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), sendo as demais proteínas homólogas observadas em espécies correlatas como *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, dentre outras (tabela 6).

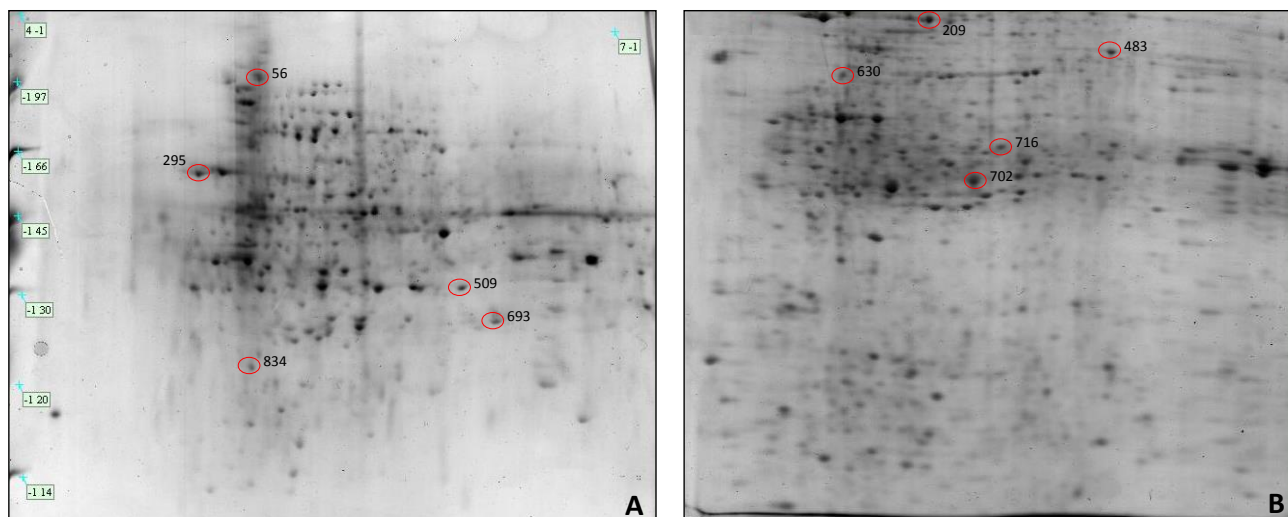
Conforme demonstram os dados apresentados pelas figuras 12, 13 e 14, e as identificações apresentadas nas tabelas 3, 4 e 5, a expressão protéica diferencial entre calos embriogênicos de cana-de-açúcar crescidos em meio de maturação e manutenção, pode ser comprovada após análise das imagens digitais geradas pela plataforma 2DE.



**Figura 12-** Análise proteômica comparativa feita pelo Image Master Platinum v.7. A- calos embriogênicos submetidos ao tratamento de maturação, B- calos embriogênicos submetidos ao meio de manutenção, no dia 14º dia de desenvolvimento.

**Tabela 3-** Polipetídeos identificados por espectrometria de massas aos 14 dias de desenvolvimento, em calos embriogênicos submetidos ao tratamento de maturação e calos embriogênicos submetidos ao meio de manutenção.

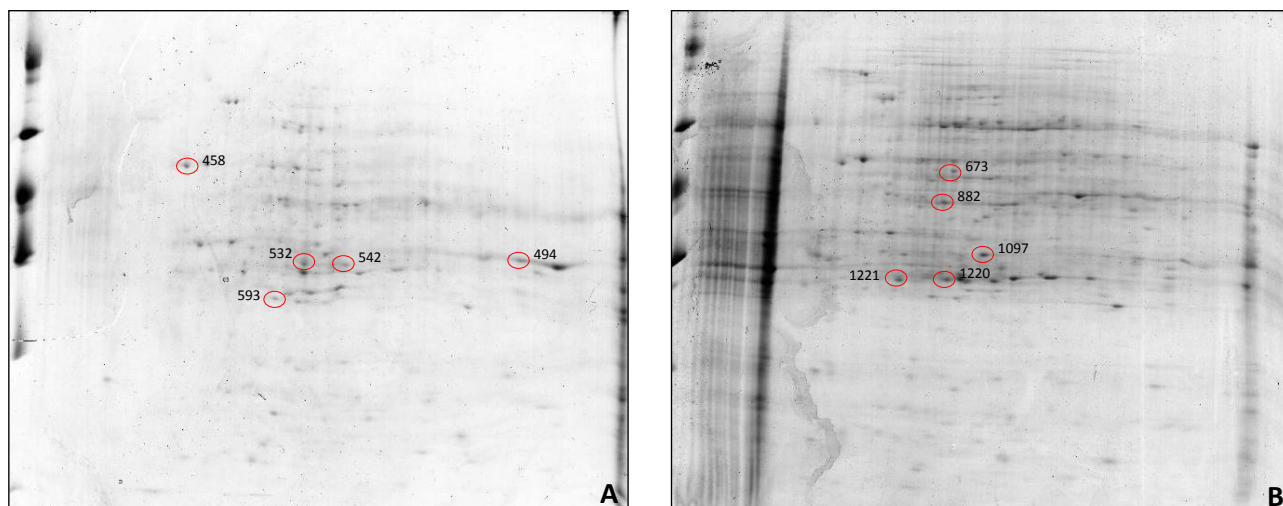
Nºspot/score	Tratamento	Proteína
51/195	maturação	hypothetical protein SORBIDRAFT_08g016560
331/165	maturação	hypothetical protein SORBIDRAFT_02g030620
337/136	maturação	hypothetical protein SORBIDRAFT_02g030620
532/354	maturação	uncharacterized protein LOC100383492 precursor
780/124	maturação	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial
239/470	manutenção	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g038760
269/136	manutenção	UDP-glucose pyrophosphorylase
605/391	manutenção	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
723/212	manutenção	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g038760
751/124	manutenção	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g038760



**Figura 13-** Análise proteômica comparativa feita pelo Image Master Platinum V.7, entre A- calos embriogênicos submetidos ao tratamento de maturação, B- calos embriogênicos submetidos ao meio de manutenção, no dia 21º dia de desenvolvimento.

**Tabela 4-** Polipetídeos identificados por espectrometria de massas calos embriogênicos submetidos ao tratamento de maturação e calos embriogênicos submetidos ao meio de manutenção, no dia 21º dia de desenvolvimento.

Nºspot/score	Tratamento	Proteína
56/226	maturação	enolase-like
295/166	maturação	predicted protein
509/152	maturação	uncharacterized protein LOC100216599
693/144	maturação	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g019280
834/338	maturação	putative glycine-rich RNA binding protein 3
209/185	manutenção	triosephosphate isomerase
483/429	manutenção	alpha-amylase precursor
716/417	manutenção	enolase 1
702/156	manutenção	actina
630/193	manutenção	14-3-3-like protein GF14-6



**Figura 14-** Análise proteômica comparativa feita pelo Image Master Platinum V.7, entre A- calos embriogênicos submetidos ao tratamento de maturação, B- calos embriogênicos submetidos ao meio de manutenção, no dia 28º dia de desenvolvimento.

**Tabela 5-** Polipetídeos identificados por espectrometria de massas em calos embriogênicos submetidos ao tratamento de maturação e calos embriogênicos submetidos ao meio de manutenção, no dia 28º dia de desenvolvimento.

Nºspot/score	Tratamento	Proteína
458/76	maturação	stress response
532/354	maturação	enolase
542/33	maturação	predicted protein
494/249	maturação	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g036580
593/39	maturação	unnamed protein product
1221/24	manutenção	hypothetical protein SORBIDRAFT_03g014866
1097/29	manutenção	predicted protein
673/25	manutenção	maturase K
882/6	manutenção	hypothetical protein Osl_29865
1220/33	manutenção	phosphoenolpyruvate carboxylase

A identificação das proteínas após análise por espectrometria de massas, indicou a ligação das proteínas expressas com os mais diversos processos metabólicos, tanto em culturas embriogênicas mantidas em meio de maturação, quanto as mantidas em meio de manutenção (figuras 12, 13 e 14, tabelas 3, 4 e 5).

Dentre os 138 spots selecionados para identificação proteica, 20,2% estão presentes nos tratamentos de manutenção e maturação, 38,5% presentes somente no tratamento de manutenção e 41,3% expressas somente no tratamento de maturação (tabela 6).

As proteínas identificadas no presente estudo, que apresentaram expressão comum aos tratamentos de manutenção e maturação estão relacionadas aos processos metabólicos basais de desenvolvimento celular como os representados pelo: metabolismo de carboidratos precursor de alfa amilase, pela glicólise (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), biossíntese de proteínas (fator de iniciação da transcrição em eucariotos-) e divisão celular (actina) (tabela 6).

Após a classificação funcional das referidas proteínas a relação com os processos biológicos de divisão celular, metabolismo energético, resposta a diferentes tipos de estresses, e metabolismo respiratório, nas culturas embriogênicas submetidas aos tratamentos de manutenção e maturação (figuras 15 e 17).

A classificação funcional e a identificação da função molecular das proteínas do presente estudos, determinada pelo programa Blast2go ([www.blast2go.com](http://www.blast2go.com)), apresenta como objetivo principal a possibilidade de melhor compreensão da expressão proteica diferencial, identificada em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar submetidas aos tratamento de maturação e manutenção, determinando dessa forma a quais processos metabólicos as proteínas expressas diferencialmente em culturas de cana-de-açúcar submetidas aos tratamentos de maturação e manutenção estão vinculadas.

Em culturas embriogênicas submetidas ao tratamento de manutenção a classificação funcional indicou a presença de proteínas associadas aos processos metabólicos como: oxi-redução, metabolismo



primário, metabolismo de macromoléculas, respostas a estresses, processos catabólicos, de biossíntese e de regulação de processos biológicos (figura 15).

A determinação da função molecular das proteínas identificadas também obtida pelo programa Blast2go ([www.blast2go.com](http://www.blast2go.com)), possibilita uma análise detalhada do metabolismo celular basal, indicando dessa forma a participação das proteínas identificadas em processos como atividade de oxirredução, transporte transmembrana, fatores de alongação e de ligação de diversos nucleotídeos, dentre outras funções identificadas (figura 16).

**Tabela 6-** Proteínas identificadas em calos embriogênicos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*- Var. SP8032-80), em meio de manutenção e maturação.

Spot	Dia	Trat.	gi	score	n° de pep.	pl teórico/ exp.	MW kDa teórico/exp.	coverage	proteína	biological process	espécie
212	21	man/mat	gi 114421	624	7	5,95/5,99	59,81/74,00	18%	ATP synthase subunit beta	ATP synthesis	[ <i>Zea mays</i> ]
344	14	man/mat	gi 195605636	525	6	5,53/4,99	27,05/28,00	30%	triosephosphate isomerase	Gluconeogenesis	[ <i>Zea mays</i> ]
239	14	man	gi 254030	470	9	7,11/4,62	25,56/36,00	5%	superoxide dismutase	superoxide metabolic process	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
798	21	mat	gi 254030	470	9	6,71/6,64	25,21/20,00	35%	superoxide dismutase	superoxide metabolic process	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
532	14	mat	gi 220682974	437	8	5,35/5,92	51,96/18,00	19%	UDP-glucose pyrophosphorylase	UDP-glucose metabolic process, biosynthetic process	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
506	21	man/mat	gi 220682974	437	8	5,20/5,02	51,61/53,00	3%	UDP-glucose pyrophosphorylase	UDP-glucose metabolic process, biosynthetic process	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
790	28	mat	gi 220682974	437	8	5,42/5,53	17,80/14,00	6%	UDP-glucose pyrophosphorylase	UDP-glucose metabolic process, biosynthetic process	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
483	21	mat	gi 242039369	429	5	5,76/6,13	35,44/41,00	21%	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g019280	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
388	14	man/mat	gi 53759189	423	8	5,85/5,33	27,41/26,00	10%	actina	cell division	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
335	21	man/mat	gi 53759189	423	8	5,24/5,47	41,69/55,00	20%	actina	cell division	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
183	21	mat	gi 53759189	423	8	5,38/5,66	53,56/80,00	15%	actina	cell division	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
386	14	man/mat	gi 242041317	420	5	5,55/5,19	27,20/26,00	24%	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g038760	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
716	21	mat	gi 162458207	417	5	5,20/5,71	48,03/26,00	13%	enolase 1	glycolysis	[ <i>Zea mays</i> ]
549	21	man	gi 226530773	403	5	5,18/5,65	47,32/51,00	15%	alpha-amylase precursor	carbohydrate metabolism	[ <i>Zea mays</i> ]
808	14	man	gi 226492818	399	6	5,67/5,20	32,60/15,00	18%	uncharacterized protein LOC100272648	-----	[ <i>Zea mays</i> ]
305	21	man/mat	gi 26985221	398	6	5,10/5,26	71,39/68,00	8%	non-cell-autonomous heat shock cognate protein 70	stress response	[ <i>Cucurbita maxima</i> ]
797	14	man/mat	gi 293887	394	3	8,44/6,07	24,93/15,00	18%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	[ <i>Zea mays</i> ]
605	14	man	gi 115451911	391	3	5,32/4,83	47,94/23,00	14%	Os03g0248600	glycolysis	[ <i>Oryza sativa Japonica Group</i> ]
79	21	mat	gi 242041317	367	4	5,55/5,50	27,20/129,00	20%	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g038760	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
811	21	man	gi 120680	367	3	6,67/6,37	36,49/37,00	18%	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	
532	28	mat	gi 780372	354	5	5,42/5,47	47,95/27,00	18%	enolase	glycolysis	[ <i>Oryza sativa Japonica Group</i> ]
890	14	man	gi 327179627	338	15	8,44/5,03	24,93/13,00	20%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	[ <i>Saccharum hybrid cultivar</i> ]
911	14	man	gi 327179627	338	15	8,44/4,78	24,93/13,00	20%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	[ <i>Saccharum hybrid cultivar</i> ]
556	21	man/mat	gi 327179627	338	15	6,67/5,72	36,49/51,00	14%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	[ <i>Saccharum hybrid cultivar</i> ]
560	21	man/mat	gi 327179627	338	15	7,05/6,88	36,47/36,00	19%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	[ <i>Saccharum hybrid cultivar</i> ]
545	21	man/mat	gi 327179627	338	15	8,30/6,70	36,66/37,00	8%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	[ <i>Saccharum hybrid cultivar</i> ]
890	21	mat	gi 327179627	338	15	6,46/5,16	36,50/14,00	8%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	[ <i>Saccharum hybrid cultivar</i> ]
839	21	man	gi 327179627	338	15	6,67/6,37	36,49/35,00	18%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	[ <i>Saccharum hybrid cultivar</i> ]
834	21	man	gi 327179627	338	15	6,95/6,58	22,53/36,00	11%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	[ <i>Saccharum hybrid cultivar</i> ]
792	28	mat	gi 327179627	338	15	6,46/5,25	36,87/14,00	7%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	[ <i>Saccharum hybrid cultivar</i> ]
810	21	mat	gi 242041317	316	2	5,55/6,08	27,20/19,00	15%	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g038760	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
127	21	man	gi 226492818	315	3	5,67/5,14	32,60/95,00	9%	uncharacterized protein LOC100272648	-----	[ <i>Zea mays</i> ]
531	28	mat	gi 162458207	313	4	5,20/5,15	48,03/27,00	15%	enolase 1	glycolysis	[ <i>Zea mays</i> ]
906	14	man	gi 357145900	308	3	5,56/6,75	47,97/13,00	9%	enolase-like	glycolysis	[ <i>Brachypodium distachyon</i> ]
250	14	man	gi 357145900	308	3	5,56/5,08	47,97/47,00	9%	enolase-like	glycolysis	[ <i>Brachypodium distachyon</i> ]
524	28	mat	gi 217855	302	3	4,97/4,98	80,59/27,00	6%	81kDa heat-shock protein	stress response	[ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
964	14	man	gi 120680	289	3	6,67/4,57	36,49/11,00	10%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	glycolysis	
237	14	man	gi 242057073	272	4	7,75/6,73	23,02/48,00	21%	hypothetical protein SORBIDRAFT_03g011590	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
628	21	mat	gi 226499840	259	4	4,76/4,88	25,96/31,00	27%	proteasome subunit alpha type 5	ubiquitin-dependent protein catabolic process	[ <i>Zea mays</i> ]

**Tabela 6-** Proteínas identificadas em calos embriogênicos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*- Var. SP8032-80), em meio de manutenção e maturação.

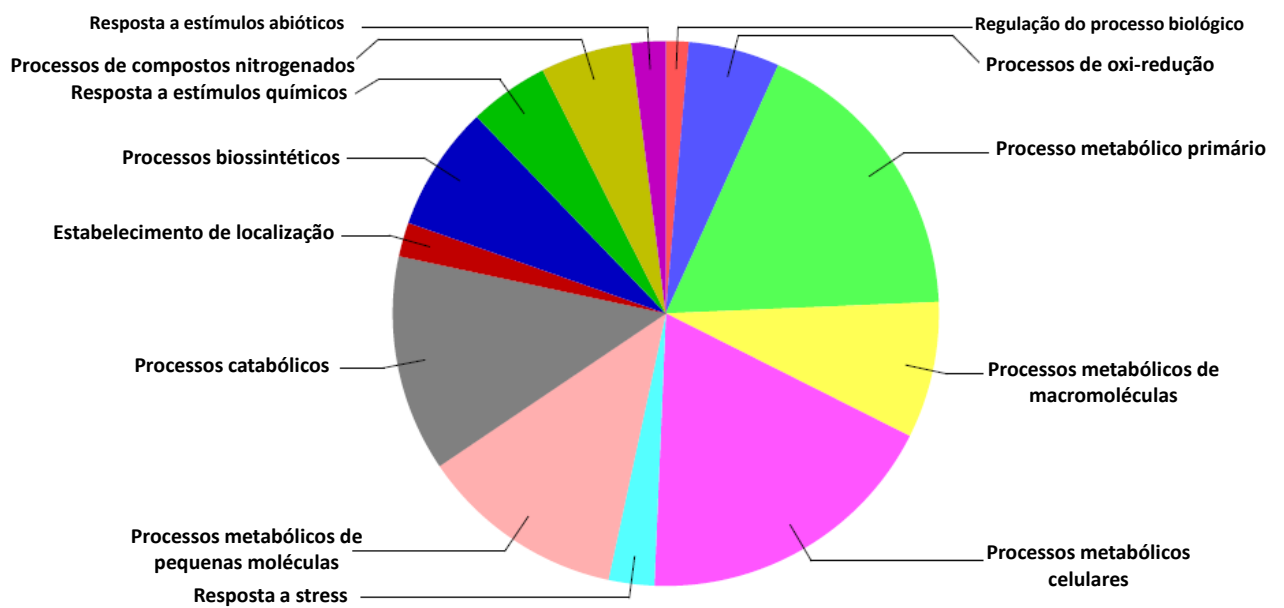
Spot	Dia	Trat.	gi	score	n° de pep.	pl <sub>teórica/ exp.</sub>	MW kDa <sub>teórica/exp.</sub>	coverage	proteína	biological process	espécie
36	14	mat	gi 780372	257	3	5,42/5,78	47,95/50,67	9%	enolase	glycolysis	[ <i>Oryza sativa Japonica Group</i> ]
494	28	mat	gi 242035869	249	3	6,27/6,01	39,31/29,00	18%	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g036580	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
343	14	man/mat	gi 357145900	245	4	5,56/4,63	47,97/36,00	10%	enolase-like	glycolysis	[ <i>Brachypodium distachyon</i> ]
895	21	mat	gi 293887	230	2	8,44/4,96	24,93/13,00	14%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	glycolysis	[ <i>Zea mays</i> ]
56	21	man	gi 242092006	226	2	4,61/5,71	14,03/116,00	22%	hypothetical protein SORBIDRAFT_10g003670	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
317	21	man/mat	gi 59799993	224	4	4,78/4,90	40,95/17,00	16%	heat shock protein 70	stress response	[ <i>Zea mays</i> ]
723	14	man	gi 357966933	212	3	6,00/4,90	93,86/17,00	7%	elongation factor	protein biosynthesis	[ <i>Ziziphus jujuba</i> ]
869	21	man	gi 195605636	205	3	5,53/5,45	27,05/34,00	15%	triosephosphate isomerase, cytosolic	gluconeogenesis	[ <i>Zea mays</i> ]
594	21	man/mat	gi 162461576	203	3	5,59/6,86	32,33/49,00	12%	glyoxylase1	gluconeogenesis, glycolysis, pentose shunt	[ <i>Zea mays</i> ]
664	21	man	gi 219911712	203	11	5,32/4,87	47,94/43,00	18%	unnamed protein product	----	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
586	28	man/mat	gi 219911712	203	11	4,84/6,25	30,81/60,00	17%	unnamed protein product	----	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
90	14	man/mat	gi 226500876	195	2	5,21/4,75	61,65/84,00	5%	LOC100283417	----	[ <i>Zea mays</i> ]
51	14	mat	gi 242085674	195	3	5,62/4,41	48,3/90,00	4%	hypothetical protein SORBIDRAFT_08g016560	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
501	28	mat	gi 21664287	194	2	5,17/5,16	70,95/28,00	7%	heat shock protein 70	stress response	[ <i>Oryza sativa Indica Group</i> ]
630	21	mat	gi 145666464	193	5	5,01/5,98	56,69/31,00	11%	protein disulfide isomerase	redox homeostasis, glycerol ether metabolic proces	[ <i>Zea mays</i> ]
364	14	man/mat	gi 59799993	192	4	4,78/4,76	40,95/27,00	15%	heat shock protein 70	stress response	[ <i>Zea mays</i> ]
249	14	man	gi 114411	186	4	6,51/5,91	55,31/47,00	9%	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP synthesis, hydrogen ion transport, ions transport	
371	14	mat	gi 326497219	185	4	5,14/5,59	71,86/27,00	7%	predicted protein	----	[ <i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i> ]
209	21	mat	gi 114421	185	2	5,95/5,49	59,81/74,00	7%	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP synthesis, hydrogen ion transport, ions transport	
671	14	mat	gi 162461296	184	3	4,59/4,40	14,10/14,00	24%	profilin-5	actin cytoskeleton organization	[ <i>Zea mays</i> ]
88	14	man/mat	gi 242041317	183	4	5,55/4,95	27,20/84,00	18%	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g038760	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
599	28	man/mat	gi 37903393	178	2	5,38/5,54	47,90/23,00	4%	14-3-3-like protein	----	[ <i>Saccharum hybrid cultivar CP65-357</i> ]
858	28	mat	gi 16225	177	2	4,20/4,67	15,59/12,00	23%	calmodulin	calcium ion binding	[ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
800	14	man/mat	gi 284822212	175	2	6,34/5,51	36,62/15,00	7%	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	[ <i>Phyllostachys edulis</i> ]
506	21	man/mat	gi 37903393	174	3	4,84/5,02	30,81/53,00	21%	14-3-3-like protein GF14-6 [Zea mays]	----	[ <i>Saccharum hybrid cultivar CP65-357</i> ]
821	14	mat	gi 226503399	172	4	6,00/4,67	93,86/11,00	5%	LOC100285098	----	[ <i>Zea mays</i> ]
340	14	mat	gi 242045368	171	3	7,71/5,55	35,15/29,00	9%	hypothetical protein SORBIDRAFT_02g030620	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
937	14	man	gi 162458009	169	4	5,61/4,24	17,48/12,00	21%	eukaryotic translation initiation factor 5A	protein biosynthesis	[ <i>Zea mays</i> ]
553	21	man/mat	gi 37903393	167	2	4,79/5,08	28,86/36,00	11%	14-3-3-like protein	----	[ <i>Saccharum hybrid cultivar CP65-357</i> ]
295	21	man	gi 20559	166	1	5,07/4,79	70,73/68,00	3%	hsp70	stress response	[ <i>Petunia x hybrida</i> ]
331	14	mat	gi 493725	165	3	4,68/6,02	50,07/30,00	10%	beta tubulin	microtubule-based movement, protein polymerization	[ <i>Oryza sativa Japonica Group</i> ]
278	21	man	gi 20559	165	1	5,07/4,86	70,73/71,00	3%	hsp70	stress response	[ <i>Petunia x hybrida</i> ]
627	21	mat	gi 195605636	164	4	5,53/5,52	27,05/31,00	20%	triosephosphate isomerase, cytosolic	gluconeogenesis	[ <i>Zea mays</i> ]
702	21	mat	gi 242041317	156	2	5,55/5,57	27,20/27,00	15%	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g038760	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
509	21	man	gi 226530773	152	1	5,18/5,62	47,32/53,00	6%	alpha-amylase precursor	carbohydrate metabolism	[ <i>Zea mays</i> ]
97	21	mat	gi 242039369	147	2	5,76/6,54	35,44/53,00	10%	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g019280	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
693	21	man	gi 242050870	144	2	4,42/4,57	24,52/43,00	15%	hypothetical protein SORBIDRAFT_02g039166	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
26	21	man	gi 147789055	140	1	5,56/5,10	30,19/130,00	11%	hypothetical protein VITISV_021574	protein biosynthesis	[ <i>Vitis vinifera</i> ]
337	14	mat	gi 242080811	136	4	6,41/5,34	10,78/29,00	5%	hypothetical protein SORBIDRAFT_07g005390	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
269	14	man	gi 6469314	136	6	6,46/5,46	36,5/45,00	4%	alcohol dehydrogenase	oxidoreductase	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]

**Tabela 6-** Proteínas identificadas em calos embriogênicos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*- Var. SP8032-80), em meio de manutenção e maturação.

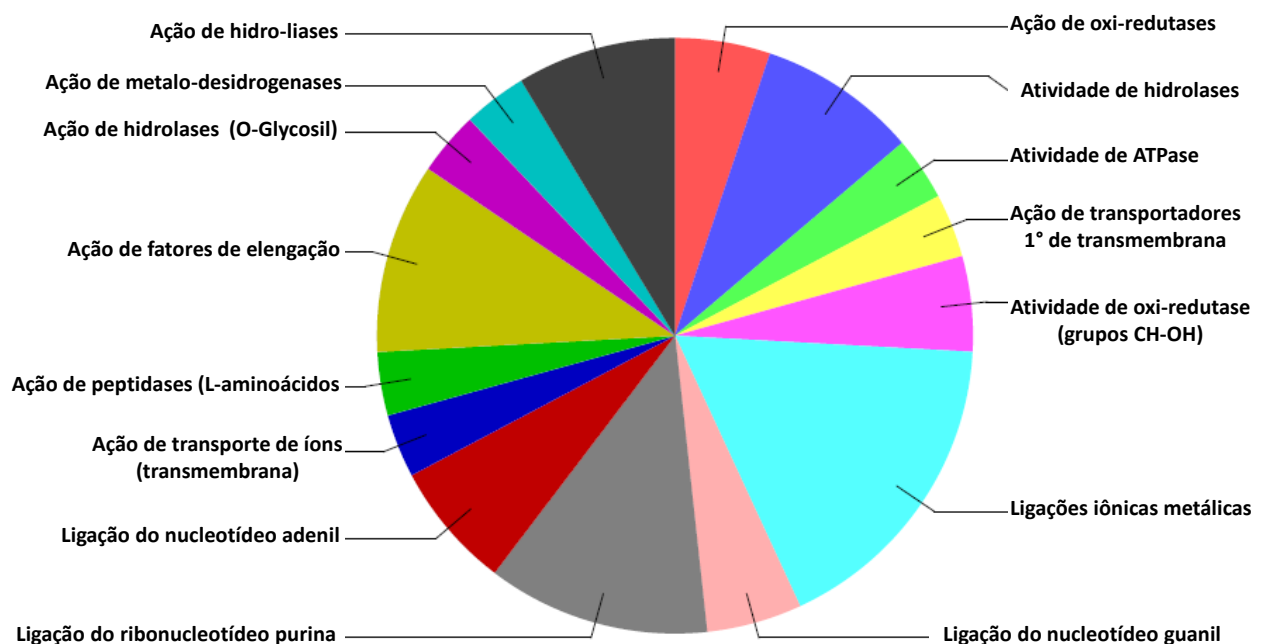
Spot	Dia	Trat.	gi	score	n° de pep.	pl <sub>teórica/ exp.</sub>	MW kDa <sub>teórica/exp.</sub>	coverage	proteína	biological process	espécie
223	14	man	gi 6469314	136	6	6,20/6,40	25,93/50,00	9%	alcohol dehydrogenase	oxidoreductase	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
228	14	man	gi 6469314	136	6	6,20/5,63	25,93/49,00	9%	alcohol dehydrogenase	oxidoreductase	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
332	14	mat	gi 242080811	127	4	6,41/4,86	10,78/30,00	3%	hypothetical protein SORBIDRAFT_07g005390	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
1188	28	man	gi 226503019	127	1	5,76/5,24	35,5/29,00	12%	malate dehydrogenase	glyoxylate bypass, tricarboxylic acid cycle	[ <i>Zea mays</i> ]
43	14	man/mat	gi 6056373	125	1	5,89/5,23	94,18/94,67	3%	elongation factor EF-2	protein biosynthesis	[ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
780	14	mat	gi 9230743	124	5	4,64/5,20	32,28/12,00	6%	sucrose synthase	sucrose metabolic process, biosynthetic process	[ <i>Saccharum hybrid cultivar F36-819</i> ]
751	14	man	gi 9230743	124	5	5,96/5,16	92,05/16,00	2%	sucrose synthase	sucrose metabolic process, biosynthetic process	[ <i>Saccharum hybrid cultivar F36-819</i> ]
885	14	man	gi 464848	123	2	4,58/5,21	12,56/13,00	23%	Tubulin alpha chain	microtubule cytoskeleton organization	
174	21	man	gi 3676296	122	3	5,73/4,38	59,52/87,00	7%	mitochondrial ATPase beta subunit	ATP synthesis, hydrogen ion transport, ions transport	[ <i>Nicotiana sylvestris</i> ]
873	21	mat	gi 226503399	121	1	6,00/5,21	93,86/15,00	3%	LOC100285098	-----	[ <i>Zea mays</i> ]
629	21	mat	gi 238013782	121	1	5,49/5,81	26,42/31,00	9%	unknown	-----	[ <i>Zea mays</i> ]
371	21	man/mat	gi 56681313	120	2	5,31/5,67	39,10/51,00	14%	glutamina sintetase	glutamine biosynthetic process	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
535	28	mat	gi 293887	118	1	8,44/6,70	24,93/27,00	8%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	glycolysis	[ <i>Zea mays</i> ]
135	21	man	gi 20559	117	1	5,07/5,67	70,73/94,00	3%	hsp70	stress response	[ <i>Petunia x hybrida</i> ]
210	21	man/mat	gi 21630092	116	2	5,39/5,04	48,20/81,00	15%	enolase	glycolysis	[ <i>Musa acuminata</i> ]
410	28	mat	gi 114421	116	1	5,95/5,65	59,81/38,00	3%	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP synthesis, hydrogen ion transport, ions transport	
19	21	man	gi 115466256	115	1	5,38/4,61	47,9/140,00	4%	Os06g0136600	glycolysis	glycolysis
984	14	man	gi 9802384	113	2	9,24/5,62	49,27/11,00	2%	Elongation factor	protein biosynthesis	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
271	14	man	gi 226493908	113	3	5,55/4,88	33,24/45,00	14%	uncharacterized protein LOC100277287	-----	[ <i>Zea mays</i> ]
219	21	man	gi 9802384	113	2	4,76/4,66	64,73/79,00	4%	Elongation factor	protein biosynthesis	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
879	21	mat	gi 48716382	112	1	6,77/5,38	49,35/14,00	5%	putative 2-oxoglutarate dehydrogenase E2 subunit	glycolysis	[ <i>Oryza sativa Japonica Group</i> ]
874	21	man	gi 219363213	112	3	5,88/6,01	61,77/34,00	10%	uncharacterized protein LOC100216599	-----	[ <i>Zea mays</i> ]
130	21	mat	gi 115448989	111	3	5,49/5,54	72,85/95,00	7%	Os02g0774300	glycolysis	[ <i>Oryza sativa Japonica Group</i> ]
411	21	man	gi 212274681	102	3	4,92/4,96	35,25/59,00	10%	uncharacterized protein LOC100191638	-----	[ <i>Zea mays</i> ]
586	21	man/mat	gi 242045368	97	3	7,71/5,25	35,15/34,00	7%	hypothetical protein SORBIDRAFT_02g030620	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
673	28	mat	gi 195605636	97	3	5,53/5,39	27,05/18,00	14%	triosephosphate isomerase, cytosolic	gluconeogenesis	[ <i>Zea mays</i> ]
908	14	man	gi 135398	96	1	5,49/5,05	26,42/13,00	8%	Alpha-1-tubulin	microtubule cytoskeleton organization	
677	21	man	gi 533474	95	1	5,62/5,03	48,30/43,00	6%	2-phospho-D-glycerate hydrolase	glycolysis	[ <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> ]
82	21	mat	gi 53801486	93	1	6,59/4,41	26,73/127,00	5%	triose phosphate isomerase	gluconeogenesis	[ <i>Sclerotinia sp. ex Simulium jonesii</i> ]
1468	21	man	gi 293887	92	1	8,44/4,79	24,93/12,00	8%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	[ <i>Zea mays</i> ]
900	14	man	gi 10334493	90	3	5,92/6,24	35,47/13,00	9%	cytosolic malate dehydrogenase	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Cicer arietinum</i> ]
813	21	mat	gi 242094726	89	2	5,56/5,14	30,19/19,00	13%	hypothetical protein SORBIDRAFT_10g003770	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
358	14	mat	gi 115448989	87	3	5,49/4,91	72,85/28,00	7%	Os02g0774300	glycolysis	[ <i>Oryza sativa Japonica Group</i> ]
182	21	mat	gi 115440691	86	2	5,42/5,58	60,75/51,00	3%	Os01g0817700	glycolysis	[ <i>Oryza sativa Japonica Group</i> ]
508	28	mat	gi 226530773	86	1	5,18/5,69	47,32/28,00	6%	alpha-amylase precursor	carbohydrate metabolism	[ <i>Zea mays</i> ]
936	14	man	gi 242091217	85	1	4,64/5,31	32,28/12,00	6%	hypothetical protein SORBIDRAFT_09g026730	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
351	14	mat	gi 1169534	82	2	5,62/5,87	48,3/52,87	4%	enolase	glycolysis	
1180	28	man	gi 20559	82	1	5,07/5,87	70,73/29,00	3%	hsp70	stress response	[ <i>Petunia x hybrida</i> ]
484	28	mat	gi 221255555	80	1	6,18/6,42	11,55/29,00	12%	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	[ <i>Populus balsamifera</i> ]
458	28	mat	gi 20559	76	1	5,07/4,92	70,73/32,00	3%	hsp70	stress response	[ <i>Petunia x hybrida</i> ]

**Tabela 6-** Proteínas identificadas em calos embriogênicos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*- Var. SP8032-80), em meio de manutenção e maturação.

Spot	Dia	Trat.	gi	score	n° de pep.	pl <sub>teórico/ exp.</sub>	MW kDa <sub>teórica/exp.</sub>	coverage	proteína	biological process	espécie
126	21	man	gi 242094726	74	2	5,56/4,55	30,19/96,00	11%	hypothetical protein SORBIDRAFT_10g003770	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
528	28	mat	gi 221255555	74	1	6,18/6,18	11,55/27,00	12%	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	glycolysis	[ <i>Populus balsamifera</i> ]
743	14	mat	gi 1206668	73	1	6,20/4,84	33,21/13,00	2%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	glycolysis	
86	14	man	gi 162462211	71	2	6,55/6,23	30,70/34,67	10%	prohibitin2	mitochondrion inheritance,negative regulation of proteol	[ <i>Zea mays</i> ]
544	28	man/mat	gi 3777447	71	1	4,76/6,83	28,18/62,00	6%	14-3-3 protein	-----	[ <i>Solanum tuberosum</i> ]
818	21	mat	gi 6911144	70	1	7,82/5,59	16,69/19,00	8%	putative glycine-rich RNA binding protein 3	A duplex unwinding,RNA secondary structure unwind	[ <i>Catharanthus roseus</i> ]
137	21	man	gi 293334595	68	2	6,35/4,98	48,38/94,00	7%	uncharacterized protein LOC100383492 precursor	-----	[ <i>Zea mays</i> ]
367	14	mat	gi 498775	66	2	4,63/5,41	24,00/27,00	15%	heat shock protein 70 kDa	stress response	[ <i>Zea mays</i> ]
48	21	man	gi 56182370	66	31	9,04/4,98	24,09/118,00	16%	tioredoxina peroxidase 1	deoxyribonucleotide synthesis,electron transport	[ <i>Saccharum officinarum</i> ]
867	21	man	gi 238013782	66	1	5,49/5,65	26,42/34,00	9%	unknown	-----	[ <i>Zea mays</i> ]
885	21	mat	gi 20162190	64	1	5,40/6,14	27,54/14,00	43%	nucleoside-diphosphate kinase-like protein	nucleotide metabolism	[ <i>Zea mays</i> ]
131	21	man	gi 20162190	64	1	5,40/5,34	27,54/95,00	43%	nucleoside-diphosphate kinase-like protein	nucleotide metabolism	[ <i>Zea mays</i> ]
896	21	mat	gi 242041317	58	1	5,55/5,37	27,20/13,00	7%	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g038760	tricarboxylic acid cycle	[ <i>Sorghum bicolor</i> ]
430	21	man	gi 18390634	56	1	7,51/4,34	37,74/57,00	4%	cysteine proteinase-like protein	proteolysis	[ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
847	21	mat	gi 20162190	55	1	5,40/6,84	27,54/17,00	43%	nucleoside-diphosphate kinase-like protein	nucleotide metabolism	[ <i>Zea mays</i> ]
633	21	mat	gi 302847787	54	1	6,88/5,21	30,70/31,00	4%	hypothetical protein VOLCADRAFT_109969	triose-phosphate isomerase activity	[ <i>Volvox carteri f. nagariensis</i> ]
813	28	mat	gi 307949519	53	1	5,06/4,84	12,78/13,00	7%	thioredoxin h	electron transport	[ <i>Vitis vinifera</i> ]
183	0	man/mat	gi 326503470	51	1	8,62/4,88	12,99/55,00	19%	predicted protein	-----	[ <i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i> ]
54	21	man	gi 15224174	51	1	5,85/4,39	69,31/115	1%	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit 2	electron transport	[ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]



**Figura 15-** Classificação funcional realizada pelo programa Blast2Go de proteínas identificadas pelo programas MASCOT, em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*- Var. SP 8032-80), submetidas ao tratamento de manutenção.



**Figura 16-** Determinação da função molecular realizada pelo programa Blast2Go de proteínas identificadas pelo programa MASCOT, em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*- Var. SP 8032-80), submetidas ao tratamento de manutenção.

A presença de proteínas ligadas aos processos de multiplicação e diferenciação celular, como as representadas, pelo grupo de proteínas associados ao desenvolvimento de estruturas anatômicas e de organização de moléculas (figura17), reforça a hipótese do meio em que as culturas se desenvolveram (meio de maturação), promoveu a competência celular para a diferenciação de estruturas e conseqüentemente e a diferenciação celular.

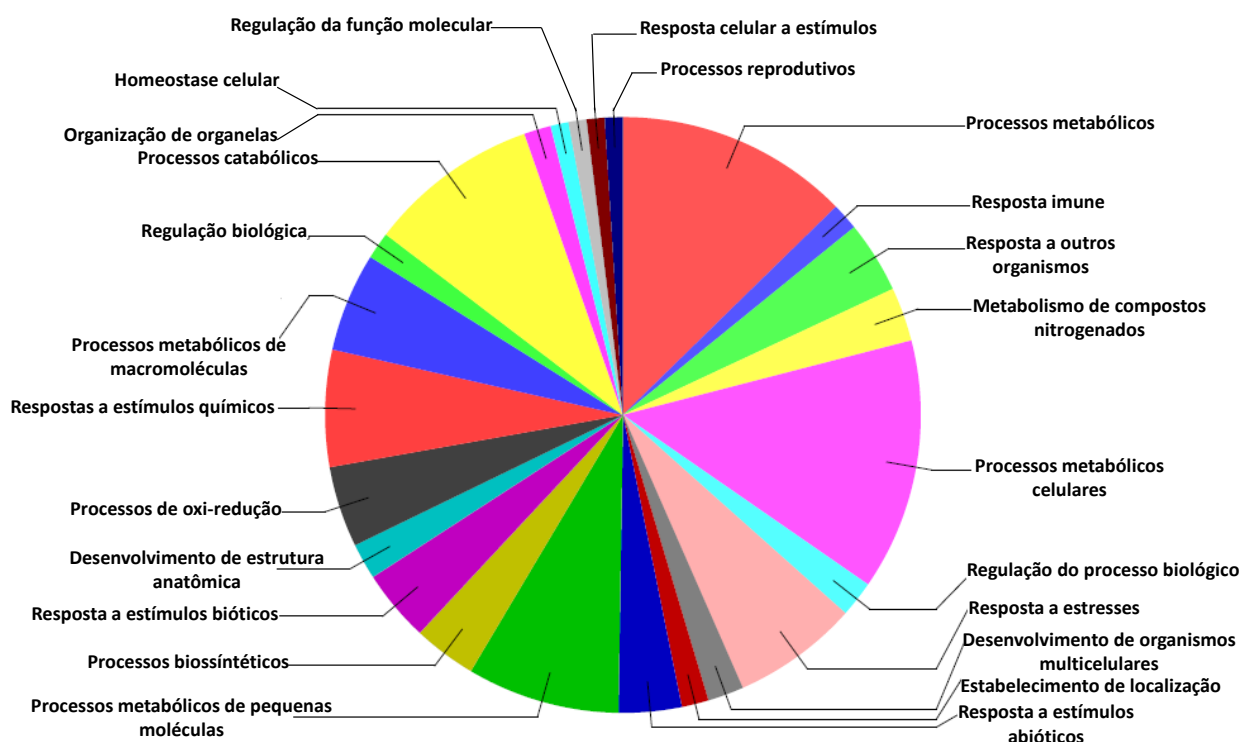
A análise das proteínas identificadas em culturas embriogênicas submetidas ao meio de maturação, pela plataforma 2DE x MS/MS, pelo programa Blast2go, identificaram como classificação funcional a relação prioritária das mesmas aos processos de: regulação biológica, respostas a estímulos, processos de organização celular, processos de desenvolvimento, processos associados a resposta do sistema imune e respostas metabólicas em geral, organização de organelas e desenvolvimento de estruturas anatômicas (figura 17).

Já a classificação da função molecular determinada pelo programa Blast2go, para as proteínas identificadas como expressas em culturas embriogênicas submetidas ao tratamento de maturação, estão majoritariamente relacionadas aos processos de: ligação de nucleotídeos, ubiquitinação, atividade de oxi-redução intramolecular, atividade de hidrolases e ação de proteases (figura 18).

Em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento de maturação a classificação funcional das proteínas identificou a relação das proteínas identificadas majoritariamente aos processos metabólicos de regulação, resposta a estímulos e de desenvolvimento celular (figura 17). As funções moleculares identificadas nas proteínas expressas no tratamento de maturação, assim como no tratamento de manutenção estão associadas aos processos metabólicos primários de síntese proteica e metabolismo energético (figuras 16 e 18).

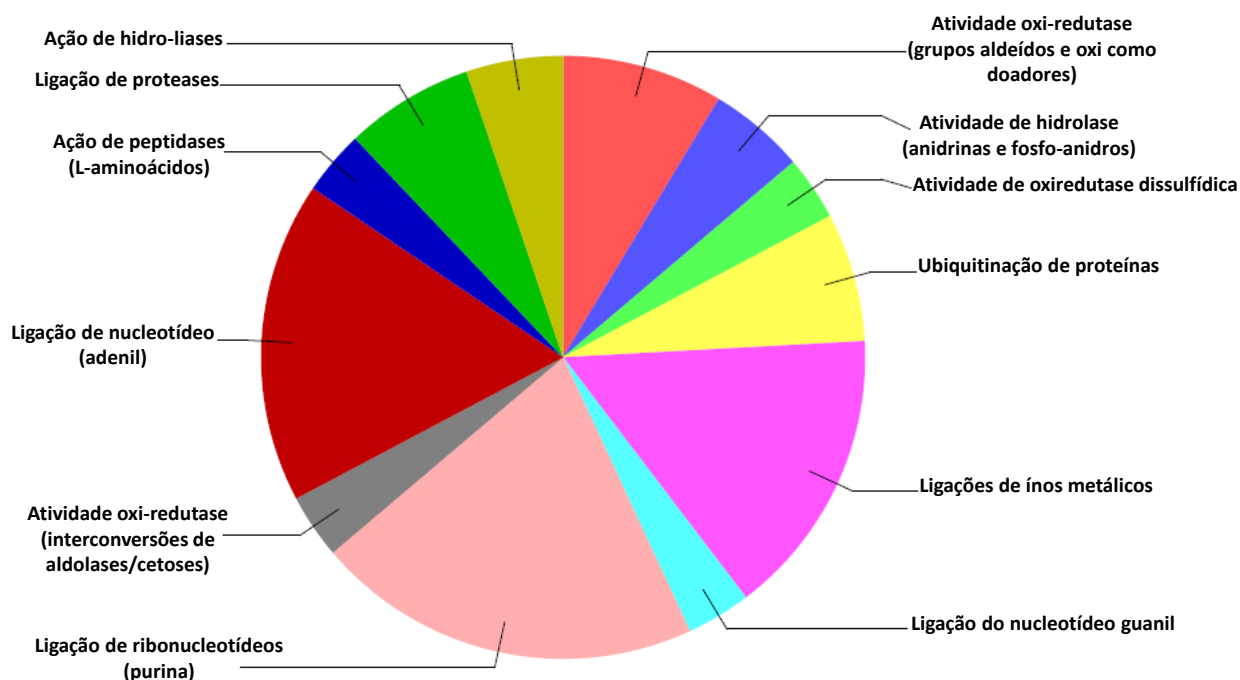
A identificação do número total de spots ao longo do período experimental, e do conteúdo de proteínas totais, indica um maior número de spots detectados e um maior teor de proteínas totais, em calos embriogênicos submetidos ao tratamento de manutenção, em todos os dias de cultivo, quando comparados a calos embriogênicos submetidos ao meio de maturação (figura 10 e 11).

No entanto o maior número de spots identificados em calos embriogênicos submetidos ao tratamento de manutenção, após análise *in silico* mostrou-se com uma identificação redundante de proteínas associadas aos processos basais do metabolismo celular como o energético e de multiplicação celular. A presença redundante da expressão de proteínas como: actina, gliceraldeído-3-fosfato, glyoxilase e ATPsintase e enolase associadas aos referidos processos, poderia estar relacionada com a maior taxa de divisão celular, apresentada por essas culturas quando submetidas a presença de uma auxina forte como o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D), hormônio que estimula a multiplicação e diferenciação celular (Chitteti e Peng, 2008, Pan *et al.*, 2010, Takác *et al.*, 2011, Snyman *et al.*, 2011, Rode *et al.*, 2012).



**Figura 17-** Classificação funcional realizado pelo programa Blast2Go de proteínas identificadas pelo programa MASCOT, em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*- Var. SP 8032-80), submetidas ao tratamento de maturação.





**Figura 18-** Determinação da função molecular realizada pelo programa Blast2Go de proteínas identificadas pelo programa MASCOT, em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*- Var. SP 8032-80), submetidas ao tratamento de maturação.

A manipulação de meios onde ocorre o desenvolvimento de embriões somáticos com a adição de promotores de crescimento e agentes osmóticos ao meio de cultura, parece influenciar a síntese protéica e, podendo os efeitos destes compostos, provavelmente aditivos (Attree e Fowke, 1993). A alteração do padrão de expressão protéica pode propiciar a identificação de proteínas específicas, candidatas à marcadores, para embriogênese somática, e promover uma relação entre os estágios embriogênicos de embriões somáticos e os perfis protéicos do desenvolvimento embrionário normal (Gifford, 1988, Campalans *et al.*, 2000, Garello *et al.*, 2000).

Nas análises proteômica visando a caracterização proteica da embriogênese somática, a utilização de eletroforese bidimensional, combinada com a espectrometria de massas, tem se mostrado como uma estratégia de trabalho, com a obtenção de resultados satisfatórios de identificação e caracterização proteica, quando submetidas a diferentes estratégias de análise *in silico*.

A caracterização proteica da embriogênese somática, representa a possibilidade do conhecimento da expressão proteica diferencial nos diferentes estágios da embriogênese, propiciando assim, a identificação de possíveis

proteínas associadas ao desenvolvimento do potencial embriogênico apresentado pelas culturas vegetais (Li *et al.*, 2010).

O estudo da expressão proteica diferencial em diversas espécies vegetais, indica que o desenvolvimento vegetal é controlado por um complexo programa genético endógeno que responde a alterações do meio (Hochholdinger *et al.*, 2006), sendo as alterações externas representadas em sua maioria por mudanças nas concentrações de fatores de crescimento contidos no meio de cultura.

Análises proteômicas associadas a capacidade embriogênica de algumas culturas vegetais, indicam a expressão de proteínas ligadas aos processos de divisão celular, e do metabolismo energético (Takác *et al.*, 2011, Balbuena *et al.*, 2011, Li, *et al.*, 2010, Pan *et al.*, 2009). Essa expressão proteica se justifica, uma vez que da capacidade de multiplicação celular depende a formação de novas estruturas diferenciadas, e do ciclo celular ser acompanhado por grande demanda energética, sendo, portanto necessário à síntese de proteínas associadas ao metabolismo energético (Takác *et al.*, 2011).

Os resultados de identificação proteica indicam uma forte ligação das proteínas identificadas, com os processos do ciclo celular e de alongação celular. Proteínas como: actina, e heat shock protein, gliceraldeído-3-fosfato, sacarose sintase, malato desidrogenase, alfa amilase, e glioxilase foram identificadas em calos embriogênicos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos de maturação e manutenção (tabela 5). Resultados similares foram descritos por Pan *et al.* (2009), Takác *et al.* (2011), Xu *et al.* (2012), e Chen *et al.* (2012), ao mapearem a expressão diferencial proteica do desenvolvimento de plantas, que associam as classes de proteínas citadas acima como associadas aos processos desenvolvimento de embriões somáticos, diferenciação celular e desenvolvimento de sementes.

Sendo o ciclo celular um processo fundamental para o crescimento e desenvolvimento de plantas, esses mecanismos são controlados por mecanismos altamente conservados ao longo da evolução (Takác, 2011), justificando a identificação simultânea de proteínas associadas aos processos

de divisão e alongação celular, em calos embriogênicos submetidos aos tratamentos de manutenção e maturação.

Os fatores de alongação, outra classe de proteína associada ao processo de divisão celular foram identificados em calos embriogênicos de cana-de-açúcar submetidos ao meio de manutenção, nas etapas iniciais e intermediárias (14° e 21° dias de cultivo) do período experimental (spots 984 e 219), sendo esses fatores associados ao processo de divisão celular, processo crucial para o crescimento e desenvolvimento de plantas, regulado por diferentes vias hormonais e pela reorganização do citoesqueleto (Takác, 2011) (tabela 5).

Em calos embriogênicos submetidos ao meio de maturação, onde a partir do 21° dia de experimento foi possível identificar o surgimento de plântulas (figura 5), foram identificadas as seguintes classes de proteínas associadas aos processos de divisão celular: beta-tubulina (spot 858) e calmodulina (spot 331) (tabela 5), podendo essas proteínas estar estreitamente relacionadas aos processos de multiplicação e diferenciação celular, requeridos para a formação de plântulas.

Corroborando as identificações proteicas feitas no presente estudo, Li *et al.* (2010), identificaram no desenvolvimento de embriões somáticos, plântulas e brotos radiculares, proteínas associadas aos processos de estruturação celular (actina e alfa tubulina), ao metabolismo energético e de carboidratos (enolase, malato desidrogenase, ATPsintase) e ao processo de biossíntese protéica (fator de alongação).

A identificação em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar submetidas aos meios de maturação e manutenção, de um grande número de proteínas associadas ao metabolismo energético como as ATPases, enolases, triose-isomerasas, sacarose sintase, malato desidrogenase, glioxilases e alfa-amilases, se justifica, uma vez que os processos metabólicos envolvidos no ciclo celular são acompanhados por um alto fluxo energético, necessário para o suprimento da demanda energética gerada por esse processo (Shi *et al.*, 2008). Sendo as referidas proteínas identificadas na embriogênese somática de diversas espécies (Baba *et al.*, 2008, Pan *et al.*, 2009, Marsoni *et al.*, 2009, Almaralraj *et al.*, 2010).

O agrupamento e a determinação da classificação funcional, realizados pelo programa Blast2Go possibilitou a identificação de duas classificações: uma relacionada a função desempenhadas pelas proteínas identificadas e outra relacionada a função molecular das mesmas.

A classificação funcional das proteínas identificadas pelo programa MASCOT, e classificadas pelo programa Blast2Go, presentes nos calos embriogênicos submetidos ao meio de manutenção indicam em sua grande maioria a associação dessas proteínas com os processos metabólicos energéticos e de multiplicação e divisão celular (figura 15). Essa relação pode estar associada ao intenso processo de multiplicação celular identificados nas culturas submetidas a esse meio, indicando uma maior taxa de proteínas totais, na referida cultura, quando comparadas a culturas embriogênicas mantidas em meio de maturação (figura 10).

Em calos embriogênicos submetidos ao tratamento de maturação, a classificação funcional indicou majoritariamente associação das proteínas identificadas, com os processos de regulação celular, respostas a estímulos, processos celulares diversificados, e processos de regulação metabólica (figura 17).

A vinculação das proteínas identificadas aos processos acima citados, pode estar relacionada com a maior taxa de multiplicação celular quando comparadas com calos embriogênicos desenvolvidos em meio de manutenção, e a maior taxa de diferenciação celular e surgimento de estruturas diferenciadas completas, como os embriões somáticos identificados a partir do 14º dia de cultivo e das plântulas identificadas a partir do 21º dia de cultivo (figura 5).

A determinação da função molecular das proteínas identificadas em calos embriogênicos submetidos ao tratamento de manutenção, apresenta uma associação a processos metabólicos diversificados, todos associados aos processos de ciclo e multiplicação celular, metabolismo energético e oxidativos e mecanismos de resposta a estímulos, indicando a relação dessas funções metabólicas com as classes proteicas identificadas (figura 16).

A função molecular das proteínas identificadas em calos embriogênicos submetidos ao tratamento de maturação, apresenta uma

associação a processos metabólicos diversificados, todos associados aos processos metabólicos energéticos e oxidativos, de ubiquinação de proteínas e de síntese de proteases indicando a relação dessas funções metabólicas com as classes proteicas identificadas (figura 18). As proteínas identificadas e agrupadas em distintas classificações funcionais e funções moleculares, também encontram-se presentes nos estudos de caracterização proteica da embriogênese somática em diversas espécies, propostos por Pan *et al.*, 2009, Marsoni *et al.*, 2009, Baba *et al.*, 2008, Almaralraj *et al.*, 2010, sendo no entanto as mesmas pertencentes em sua grande maioria a processos metabólicos constitucionais e portanto fundamentais para a manutenção do desenvolvimento celular.

As proteínas identificadas no presente estudo pela plataforma MASCOT e classificadas pelo programa Blast2Go, relacionam o processo de formação de embriões somáticos, presente em culturas embriogênicas desenvolvidas no meio de maturação, majoritariamente aos processos biológicos de: processos celulares, processos metabólicos e resposta a estímulos, podendo esses processos ser correlacionados com a capacidade embriogênica apresentada pelas referidas culturas de cana-de-açúcar, desenvolvidas em meio de maturação. E as proteínas identificadas em culturas embriogênicas desenvolvidas em meio de manutenção, associadas aos processos de catabolismo celular, metabolismo celular e metabolismo celular primário, sendo as mesmas proteínas fundamentais a tais processos como também identificado por Almalraj (2010), Snyman *et al.* (2011), Takác *et al.* (2011) e Li *et al.* (2010), indicando dessa forma a indispensável expressão proteica de grupos de proteínas constitucionais para a manutenção e o desenvolvimento de embriões somáticos e sua conversão em plântulas.

### 8.3. Determinação de carboidratos

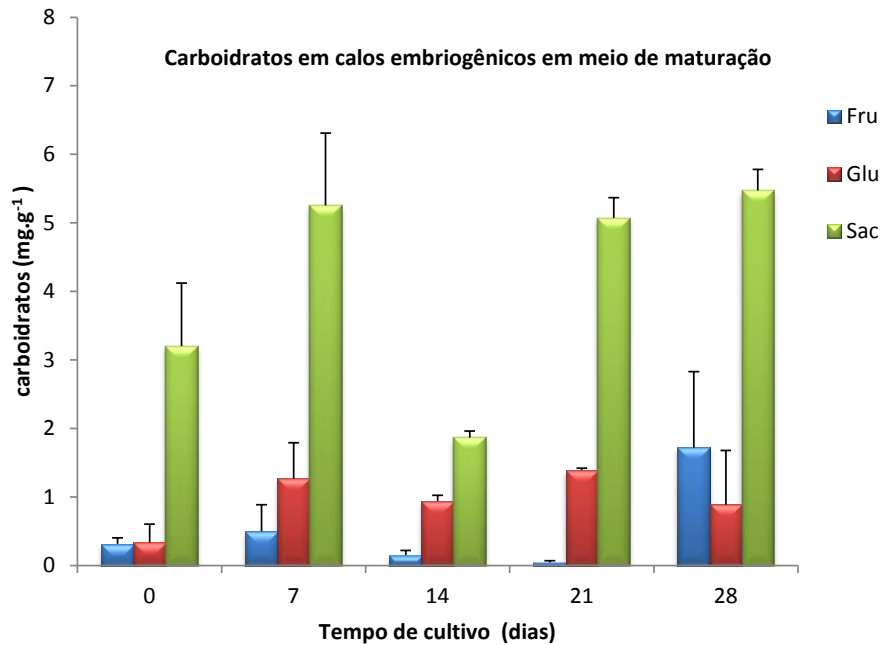
Para o presente estudo foram utilizadas amostras de culturas embriogênicas (E) e culturas não-embriogênicas (NE) de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos T1 [maturação- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado] e T2 [manutenção- Meio de cultura MS suplementado com sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), phytigel<sup>®</sup> ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $10 \text{ }\mu\text{M}$  de 2,4 D]. Os resultados obtidos indicam um padrão diferenciado de acúmulo e degradação dos três carboidratos analisados em culturas embriogênicase não-embriogênicas nestes dois tratamentos (figuras 19 e 20).

As culturas embriogênicas submetidas aos tratamentos propostos apresentaram a sacarose como o carboidrato de maior concentração ao longo de todo o cultivo (figura 19 e 20). Isso se deve em parte por ser esse o carboidrato utilizado como fonte de carbono extracelular fornecida pelo meio de cultura utilizado. Blanc *et al.*, 2002, relata diferenças nos teores de carboidrato, sendo os mesmos variando de acordo com a fonte inicialmente disponibilizada pelo meio de cultura, sendo que em meio contendo sacarose como fonte externa de carbono, os teores do referido açúcar apresentaram acréscimo de 1,8 vezes no período inicial do experimento.

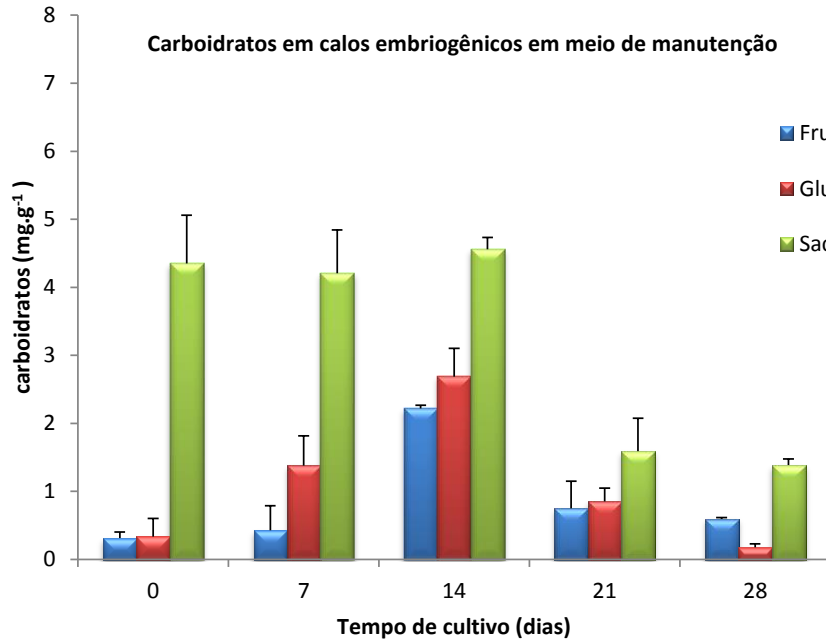
Após a disponibilização de sacarose as células pelo meio de cultura, a mesma sofre degradação extracelular, é convertida, disponibilizada para as células, após a hidrólise pela ação de invertases, e passa a ser uma das principais fontes de carbono, para a síntese de polissacarídeos estruturais, carboidratos metabolicamente ativos e para o armazenamento (Martin *et al.*, 2007).

As maiores concentrações de sacarose em culturas embriogênicas submetidas ao tratamento de maturação (figura 19), quando comparados às mesmas culturas submetidas ao tratamento de manutenção (figura 20), podem estar relacionados ao processo de morfogênese e diferenciação celular ocorrido em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento de maturação, processos esses identificados a partir do 21º dia de cultivo (figura 5). Resultados semelhantes para diferentes espécies são

relatados em diferentes espécies, indicando que as elevadas concentrações de sacarose, podem estar relacionadas com os processos de diferenciação celular e posterior morfogênese (Schaeven *et al.*, 1990, Borisjuk *et al.*, 2004 e Pavokov, *et al.*, 2011).



**Figura 19-** Conteúdo de carboidratos em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar mantidas no tratamento T1 (maturação) [Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir da média de três repetições).



**Figura 20-** Conteúdo de carboidratos em culturas embriogênicas- tratamento T2 (manutenção)- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>), phytigel<sup>®</sup> (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 μM de 2,4 D, no claro após 0, 7, 14, 21, 28 dias de cultivo (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir da média de três repetições).

De acordo com os resultados obtidos as menores concentrações de sacarose e sua constância, observados até o 14º dia de cultivo (figura 20), detectados em culturas embriogênicas submetidas ao tratamento de manutenção, podem estar relacionados com os menores índices de multiplicação celular apresentados por culturas de cana-de-açúcar, inferidos indiretamente pelos resultados de matéria fresca obtidos no presente estudo. Uma vez que teores reduzidos de sacarose e elevados de frutose e glicose, podem ser associados ao processo de desdiferenciação e crescimento celular (Schaeven *et al.*, 1990, Borisjuk *et al.*, 2004), comumente registrados em culturas celulares submetidas ao tratamento de manutenção.

Os níveis de frutose em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar apresentaram padrão diferenciado de acúmulo quando expostas aos tratamentos propostos. Nas culturas embriogênicas submetidas ao tratamento de maturação os níveis de frutose apresentaram-se reduzidos em toda fase inicial do experimento, mostrando um relativo incremento no último dia de cultivo (figura 19). Já em culturas embriogênicas submetidas ao tratamento de



manutenção os níveis de frutose se mostraram crescentes até a metade do período experimental, e depois do mesmo os referidos níveis voltam aos índices iniciais período experimental (figura 20).

Enquanto os níveis de glicose detectados para culturas embriogênicas expostas aos tratamentos de maturação e manutenção apresentaram padrão semelhante de acúmulo, com acúmulo crescente seguido de degradação (figuras 19 e 20), esse padrão pode estar relacionado a dinâmica metabólica celular de alocação de carboidratos para reserva e disponibilização dos mesmos para o metabolismo energético. Carboidratos como frutose e glicose quando em elevadas concentrações intracelulares, podem ser convertidos em amido e iniciarem o processo de sinalização para o crescimento celular (Blanc *et al.*, 2002).

Diferentemente do observado em culturas embriogênicas submetidas aos meios de maturação e manutenção, onde o carboidrato que apresentou maior índice foi a sacarose (figura 19 e 20), culturas não-embriogênicas crescidas nos mesmos meios, os carboidratos de maiores índices foram a frutose e a glicose (figura 23 e 24).

Em culturas não-embriogênicas de cana-de-açúcar submetidas ao meio de maturação os índices de frutose e glicose apresentaram um padrão de acúmulo e degradação similar durante todo o período de cultivo, sendo os maiores carboidratos sintetizados no 7º e 14º dias de cultivo (figura 23). Os resultados obtidos podem estar relacionados com a associação de níveis elevados dos referidos carboidratos aos processos de divisão mitótica e desdiferenciação indentificados por Schaewen *et al.*, 1990, Borisjuk, *et al.*, 2004, Blanc *et al.*, 2002).

A associação dos referidos carboidratos de maior síntese a processos como desdiferenciação e divisão mitótica, podem estar associados à incapacidade apresentada por essas culturas de manifestar diferenciação celular, mesmo em meio de maturação (figura 4), característica essa inerente a culturas classificadas como sendo não-embriogênicas.

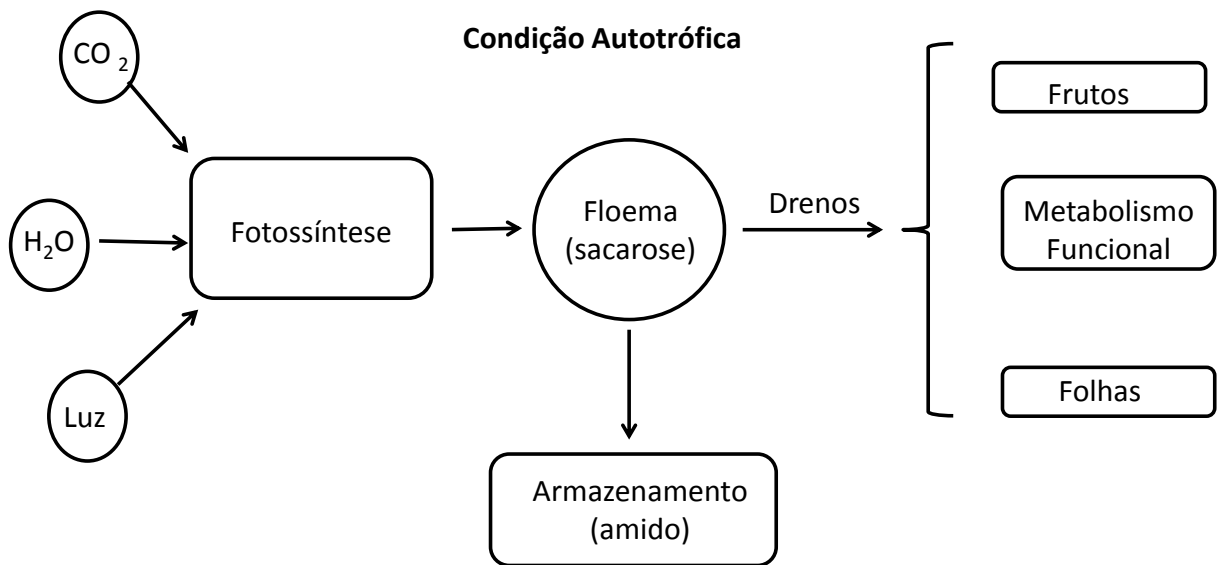
As concentrações de sacarose identificadas em culturas não-embriogênicas submetidas aos tratamentos de maturação e manutenção (figuras 23 e 24) apresentaram-se reduzidas quando comparados a culturas embriogênicas submetidas aos mesmos tratamentos (figuras 19 e 20). Nas

referidas culturas índices de sacarose reduzidos podem estar associados a menor atividade metabólica apresentada por culturas não-embriogênicas quando comparadas culturas embriogênicas de cana-de-açúcar, uma vez não sendo as mesmas capazes de originar embriões somáticos, que é um processo caracterizado por elevada alocação de energia (Martin *et al.*, 2000, Cangahuala-Inocente *et al.*, 2009).

Em culturas não-embriogênicas submetidas ao meio de manutenção a relação descrita acima fica mais evidente (figura 24), uma vez que a presença da auxina 2,4D, induz o processo de multiplicação celular, sem a ocorrência de diferenciação celular (Gandonou, 2005, Rashid *et al.*, 2009, Ather *et al.*, 2009, Raza *et al.*, 2010), ficando dessa forma a síntese de carboidratos associados a sinalização dos processos de desdiferenciação e divisão mitótica, como a frutose e a glicose, exacerbada, quando comparado aos índices de sacarose, carboidrato associado no cultivo *in vitro* aos processos de morfogênese e diferenciação celular (Schaewen *et al.*, 1990, Blanc *et al.*, 2002, Borisjuk, *et al.*, 2004,).

Nas plantas, as moléculas de carboidratos são sintetizadas a partir do processo fotossintético, como moléculas de monossacarídeos, que são posteriormente metabolizadas em açúcares álcoois, dissacarídeos e trissacarídeos (Gómez-González *et al.*, 2010). A principal forma de transporte dos açúcares sintetizados pelo processo fotossintético é sob forma de sacarose, sendo o principal açúcar de reserva o amido (Geigenberger *et al.*, 2004). Sendo por essa razão as rotas de síntese dos carboidratos frutose, glicose e sacarose são relativamente bem estudadas e estabelecidas (Gibson, 2005, Tanaka *et al.*, 2008, Pavokov, *et al.*, 2011).

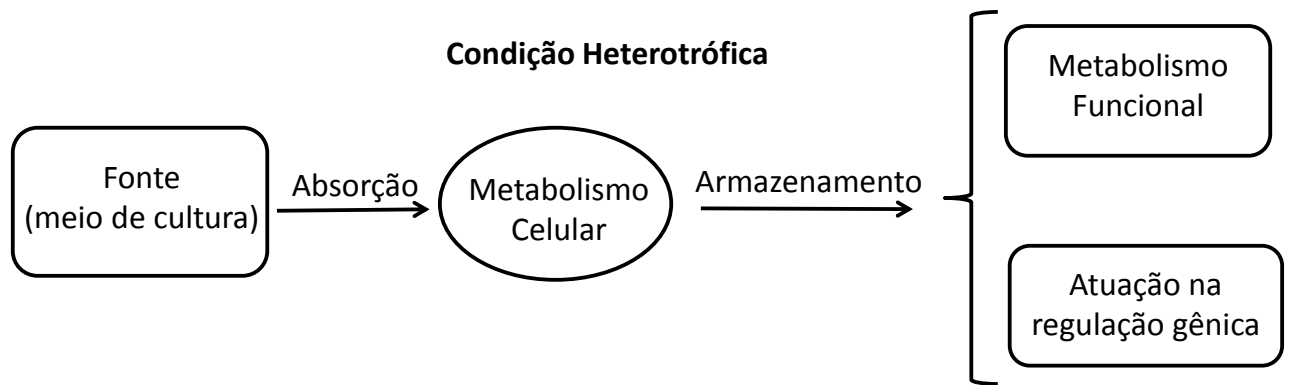
Como função principal e primária os açúcares servem de fonte de energia para reações metabólicas e atuam como precursores moleculares na biossíntese de lipídios, proteínas, antioxidantes e polissacarídeos, fornecendo moléculas de carbono (Gómez-González *et al.*, 2010), sendo as fontes iniciais para o desenvolvimento do metabolismo autotrófico (figura 21).



**Figura 21-** Esquema de atuação do metabolismo celular em condições autotróficas (elaborado a partir de Nelson e Cox, 2012)

Em condições heterotróficas conforme ascomumente representadas pelo cultivo *in vitro*, onde a adição de carboidratos como a sacarose, ao meio de cultura, interfere diretamente no metabolismo primário celular no tocante a absorção, acúmulo e degradação de carboidratos, conforme demonstrado na figura 22.

O metabolismo particularmente apresentado pela cana-de-açúcar, no tocante a acúmulo de carboidratos como a sacarose, dentre outros e suas características concentrações elevadas dos mesmos, tem sido o foco de uma extensa pesquisa sobre a bioquímica e fisiologia do acúmulo de carboidratos na referida espécie (McCormick *et al.*, 2009). Uma vez que a espécie é responsável por cerca de 70% da produção mundial (Lakshmanan *et al.*, 2005) e uma das principais fontes para a produção de biocombustíveis (Dias Oliveira *et al.*, 2005).



**Figura 22-** Esquema de atuação do metabolismo celular em condições heterotróficas (elaborado a partir de Nelson e Cox, 2012)

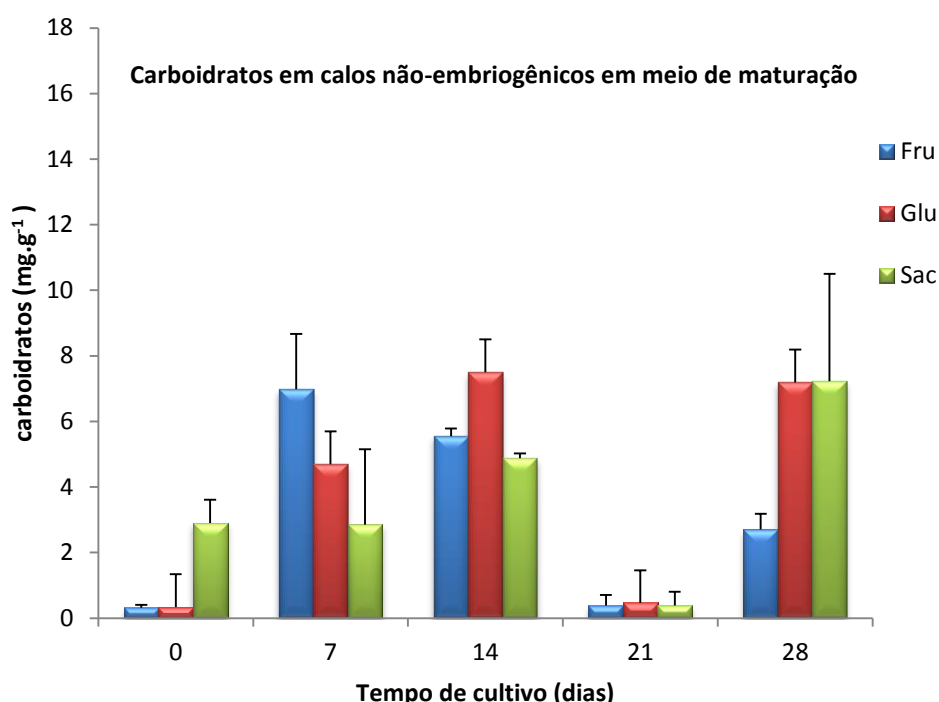
O metabolismo diferenciado de células vegetais em condições de crescimento *in vitro*, estabelece condições de atuação heterotróficas das mesmas, uma vez que os meios de culturas celulares vegetais apresentam como suplemento em sua grande maioria, a sacarose como principal açúcar (Mordocco *et al.*, 2009).

A condição de crescimento das células vegetais apresenta influência direta no metabolismo celular alterando as relações de fonte e dreno normalmente apresentadas por células em condições *in vivo* (Sghaier-Hammami *et al.*, 2009), razão pela qual a compreensão do nível de variação dos carboidratos solúveis na embriogênese somática pode embasar o entendimento da conversão de embriões somáticos em plântulas (Pescador *et al.*, 2008).

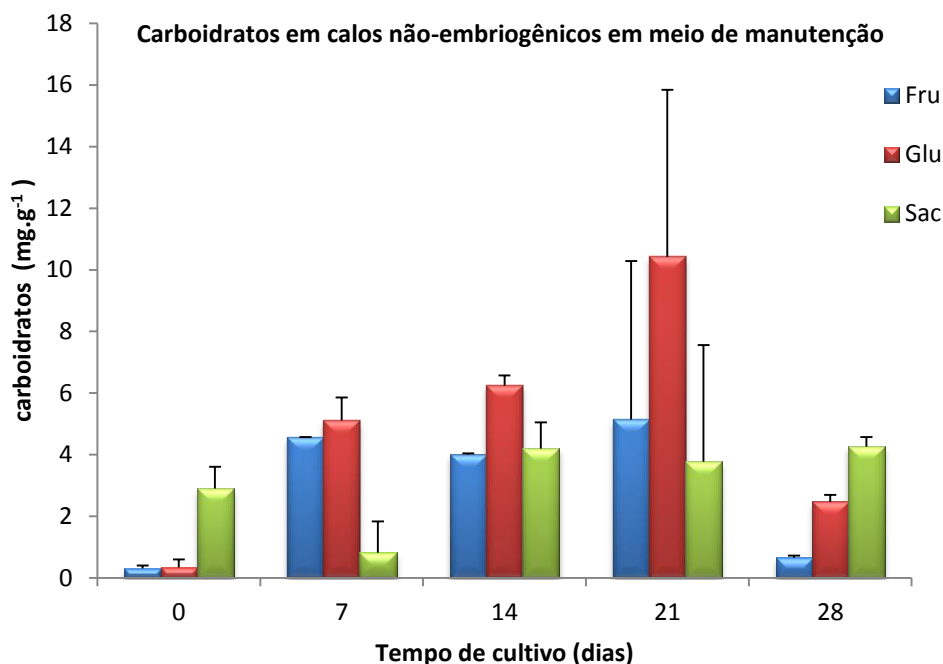
Além das importantes funções com atuação no metabolismo energético e síntese de biomoléculas, os carboidratos apresentam uma importante atuação na regulação da morfogênese e a diferenciação celular nos vegetais (Smeekens, 2000), motivo de especial interesse do referido estudo, uma vez que estudos indicam que carboidratos podem atuar na regulação da expressão de genes envolvidos em processos como a floração, fotossíntese, glicólise, metabolismo do nitrogênio e regulação do ciclo celular (Smeekens, 2000), podendo, esta regulação, ocorrer nos níveis transcricionais, traducionais e pós-traducionais (Delrot, 2000, Rapaka *et al.*, 2008).

Dentre as possíveis linhas de compreensão do metabolismo diferencial de carboidratos em sistemas *in vitro* e *in vivo*, deve-se levar em consideração que a alocação dos carboidratos para o interior das células vegetais em culturas de calos com potencial embriogênico tem recebido especial atenção, uma vez que os tecidos que efetuam esse transporte em plantas, como o floema e as células parenquimáticas, ainda não se encontram diferenciados nos calos (Gutiérrez-Miceli *et al.*, 2005).

A atividade metabólica reduzida em culturas não-embriogênicas de cana-de-açúcar quando comparadas a culturas embriogênicas, podem ainda proporcionar uma ação metabólica diferenciada no tocante síntese de carboidratos de reserva como o amido, uma vez que taxas reduzidas de metabolismo celular, características de culturas não-embriogênicas, demandam aumento de síntese de carboidratos (Blanc *et al.*, 2002), sendo uma das vias possíveis para essa síntese a de interconversão glicose (carboidrato de maior síntese em culturas não-embriogênicas submetidas ao meio de manutenção até o 28º dia de cultivo (figura 24) (Lehninger e Cox, 2011).



**Figura 23-** Conteúdo de carboidratos em culturas não-embriogênicas- tratamento T1 (maturação)- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado (as barras indicam o desvio padrão calculado a partir da média de três repetições).



**Figura 24-** Conteúdo de carboidratos em culturas não-embriogênicas- tratamento T2 (manutenção)- Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>), phytigel<sup>®</sup> (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 μM de 2,4 D, no claro após 0, 7, 14, 21, 28 dias de cultivo (as barras indicam o desvio padrão, calculado a partir da média de três repatições).

Os padrões de acúmulo, síntese e degradação diferenciados entre os três carboidratos analisados (glicose, frutose e sacarose), identificados em culturas embriogênicas e não-embriogênicas submetidas aos tratamentos de maturação e manutenção durante todo o período experimental (figura 25), sugerem que os carboidratos analisados desempenham diferentes papéis ao longo do processo de diferenciação e multiplicação celular.

Estudos relacionados com o metabolismo de carboidratos em espécies diversas, indicam que a variação diferenciada no acúmulo de carboidratos como glicose, frutose e sacarose estão estritamente relacionados com a composição do meio de cultura, no qual as culturas se desenvolvem, no tangente a disponibilidade de carboidratos externos. A fonte externa de carboidratos representada pelo meio de cultura, estaria relacionada com a alteração dos níveis de armazenamento de carboidratos como a glicose, frutose e a sacarose (Pescador *et al.*, 2008, Cangahuala-Inocente *et al.*, 2009).

O metabolismo dos carboidratos estudados está fortemente ligado a regulação dos processos relacionados a embriogênese somática, podendo

portanto seu conhecimento ser utilizado para a compreensão desses processos. Estudos desenvolvidos por Krajňáková *et al.*, 2009, Iraqi e Tremblay, 2001, Blanc *et al.*, 2002, indicam a relação dos carboidratos citados acima, como participantes da sinalização e conseqüentemente da regulação da embriogênese somática, através dos processos de síntese, degradação e hidrólise.

A análise isolada da síntese dos três carboidratos analisados na presente proposta, permite uma observação mais clara dos padrões apresentados de síntese apresentados pelas culturas embriogênicas e não-embriogênicas (figura 25). Os resultados obtidos indicam uma relação entre os conteúdos de frutose e glicose (figura 25 A e B), entre culturas embriogênicas e culturas não-embriogênicas, uma vez que esses carboidratos apresentam ligação estreita entre seus respectivos metabolismos, de hidrólise, síntese e degradação (Santos *et al.*, 2010),

Para a síntese de frutose os padrões apresentaram-se coincidentes em culturas não-embriogênicas para os meios de maturação e manutenção, não ocorrendo o mesmo em culturas embriogênicas onde os índices de síntese apresentaram um padrão incremento de síntese até o 14º dia de cultivo, e decréscimo após essa data (figura 25 A).

Os padrões de síntese de glicose em culturas embriogênicas e não-embriogênica submetidas aos meios de maturação e manutenção apresentam-se coincidentes em culturas não-embriogênicos, caracterizado por um aumento considerável na síntese do referido carboidrato no 7º e 28º dia de cultivo (figura 25 B).

Em culturas embriogênicas crescidas nos referidos tratamentos a coincidência dos padrões ocorre até o 7º dia de cultivo, e após essa data culturas embriogênicas submetidas ao meio de maturação apresentam redução na síntese de glicose, seguida de aumento de síntese no 28º dia de cultivo. Padrão esse diferenciado quando comparada a mesma cultura embriogênica crescida em meio de manutenção, onde o padrão de síntese de glicose foi caracterizado pelo decréscimo gradual a partir do primeiro dia de cultivo até último dia de cultivo (figura 25 B).

A síntese de sacarose em culturas embriogênicas e culturas não-embriogênicas submetidas aos meios de maturação e manutenção não

apresentou padrão coincidente entre as culturas, sendo culturas embriogênicas quando submetida ao meio de maturação caracterizada pelo padrão de síntese e degradação sucessiva na fase inicial do período experimental, seguido de tendente estabilização da síntese na fase final do período experimental (figura 25 B). A mesma cultura apresenta padrão inverso de síntese quando submetida ao tratamento de manutenção, com tendência a estabilização na fase inicial do período experimental, e redução de síntese na fase final do período experimental (figura 25 B).

Os referidos padrões descritos estão relacionados com a relação dos carboidratos estudados com os processos de síntese de amido, diferenciação celular, desdiferenciação celular, atividade mitótica, crescimento e desenvolvimento celular (Schäewen *et al.*, 1990, Martin *et al.*, 2000, Blanc *et al.*, 2002, Borisjuk *et al.*, 2004, Cangahuala-Inocente *et al.*, 2009), característicos de cultivo *in vitro* e desenvolvimento de embriões somáticos.

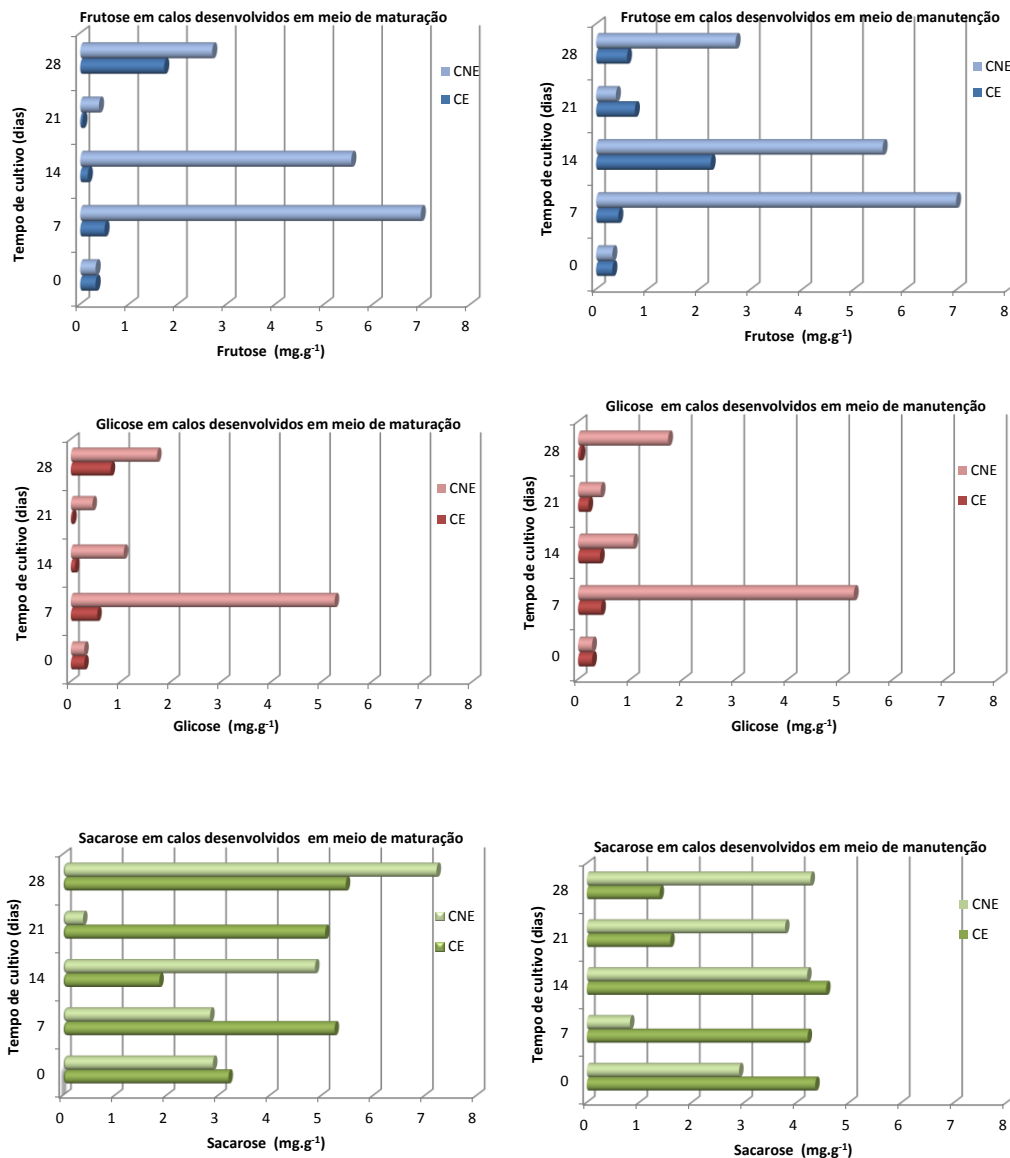
A coincidência dos padrões de frutose e glicose aqui apresentada (figura 25 A e B), também foi identificada em *Acca sellowiana* (Pescador *et al.*, 2008) e em sementes de *Pinus taeda* (Pullman e Buchanan, 2008), onde essa correlação também foi encontrada no desenvolvimento embrionário.

Os padrões de síntese dos carboidratos analisados no presente estudo: frutose, glicose e sacarose, indicam uma relação direta com os índices de sacarose detectados e os processos de diferenciação celular e morfogênese identificados em culturas embriogênicas quando submetidas ao tratamento de maturação (figura 5), uma vez que culturas embriogênicas submetidas ao referido tratamento, a partir do 21º dia de cultivo, apresentaram estruturas identificadas como brotos e que posteriormente se desenvolveram em plântulas, caracterizando dessa forma o processo de morfogênese. Resultados similares indicam que a relação direta dos teores do carboidrato sacarose, na sinalização e indução do processo de multiplicação e diferenciação celular em sistemas de cultivo *in vitro* (Schäewen *et al.*, 1990, Blanc *et al.*, 2002, Borisjuk, *et al.*, 2004, Cangahuala-Inocente *et al.*, 2009, Pescador *et al.*, 2008, Fim, 2012).

Os carboidratos frutose e glicose (figura 25 A e B) apresentaram padrões de síntese que podem ser relacionados aos processos de atividade mitótica e desdiferenciação celular, quando associados a presença no meio de



cultura da auxina 2,4-D (Gandonou 2005, Rashid *et al.*, 2009, Ather *et al.*, 2009, Raza *et al.*, 2010), uma vez que os maiores índices foram detectados em culturas não-embriogênicas. Os fenômenos de alta atividade mitótica associado ao processo de desdiferenciação são característicos de culturas não-embriogênicas submetidas ao meio de manutenção contendo 2,4-D. Podendo ainda esses carboidratos ser relacionados com a síntese de amido, conforme identificado por Fim (2012), que relata que culturas não-embriogênicas submetidas ao tratamento de manutenção apresentam maior conteúdo de amido, quando comparadas a culturas embriogênicas. Essa relação pode ser inferida de forma indireta uma vez que os referidos carboidratos apresentam relação direta com a síntese de amido (Lehninger e Cox, 2011), relacionando dessa forma elevados índices de frutose e glicose ao aumento da síntese de amido como identificado por Fim (2012).



**Figura 25-** Conteúdo de Frutose, Glicose e Sacarose em calos embriogênicos e não-embriogênicos-Taxas de carboidratos obtidas em culturas embriogênicas e não-embriogênicas submetidas ao tratamento maturação (Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 1,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado), e manutenção (Meio de cultura MS suplementado com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>), phytigel® (2,0 g L<sup>-1</sup>) e 10 µM de 2,4 D), no claro após 0, 7, 14, 21, 28 dias de desenvolvimento.- A- teores de frutose, B- teores de glicose, C- teores de sacarose.

## 9. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir:

- 1- O meio utilizado na fase de maturação da embriogênese somática em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar, contendo carvão ativado, resultou na formação de embriões somáticos, podendo portanto o carvão ativado ser considerado como um agente promotor da capacidade embriogênica no cultivo *in vitro* de calos de cana-de-açúcar.
- 2- Identificação da síntese de desidrinas em culturas embriogênicas de cana-de-açúcar e ausência das mesmas em culturas não-embriogênicas.
- 3- As desidrinas podem estar associadas com aquisição da competência embriogênica e capacidade de formação dos embriões somáticos, uma vez que estas proteínas foram observadas apenas em culturas embriogênicas submetidas ao tratamento de maturação.
- 4- A ocorrência de expressão protéica diferencial entre culturas embriogênicas submetidas aos tratamentos de maturação e manutenção, indicam que as proteínas identificadas em culturas embriogênicas desenvolvidas em meio de manutenção, estão associadas aos processos de catabolismo celular, metabolismo celular e metabolismo celular primário.

- 5- As proteínas identificadas no presente estudo relacionam o processo de formação de embriões somáticos, presente em culturas embriogênicas desenvolvidas no meio de maturação, majoritariamente aos processos biológicos de: processos celulares, processos metabólicos e resposta a estímulos, podendo esses processos ser correlacionados com a capacidade embriogênica apresentada pelas referidas culturas de cana-de-açúcar, desenvolvidas em meio de maturação.
- 6- O padrão de síntese dos carboidratos: frutose, glicose e sacarose, apresentam-se diferenciados em culturas embriogênicas e não-embriogênicas submetidas aos tratamentos de maturação e manutenção.

## 10. Referencias bibliográficas

- Ahloowalia, B. S., Maretzki, A. Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. *Plant Cell Rep.* 2:21–25, 1983.
- Amalraj, R.S., Selvaraj N., Veluswamy, G.K., Ramanujan, R.P., Muthurajan, R., Muthurajan, R., Palanlyaindi, M., Agrawal, G.K., Rakwal, R., Viswanathan, R. Sugarcane proteomics: Establishment of a protein extarction method for 2-DE in stalk tissues and initiation of sugarcane proteome reference map. *Electrophoresis* 31: 1959-1974, 2010.
- Araldi, R., Silva, F.M.L., Ono E.O., Rodriguem J.D. Florescimento em caca-de-açúcar. *Ciência Rural.* 403:674-702, 2010.
- Arencibia, A.D., Carmona E.R, Téllez P, Chan M-T, Yu S-M, Trujillo LE, Oramas P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum spp L.*) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transg. Res* 7: 213-222, 1998.
- Arruda, P. Genetically modified sugarcane for bioenergy generation. *Current Opinion in Biotechnology* 23:315–322, 2012
- Arruda, P. Perspective of the sugarcane industry in Brazil. *Tropical Plant Biol.* 4: 3-8, 2011.
- Aslam, J., Mujib A., Sharma, M. P. In vitro micropropagation of *Dracaena sanderiana* Sander ex Mast: An important indoor ornamental plant. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20: 63–68, 2013.
- Ather, A., Khan S., Rehman, A. and Nazir M. Optimization of the protocols for callus induction, regeneration and acclimatization of sugarcane cv. thatta-10. *Pak. J. Bot.* 41(2): 815-820, 2009.
- Attree, S.M., Fowke LC. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 35: 1-35, 1993
- Baba, A., Nogueira F, Pinheiro C, Brasil J, Jereissati E, Jucá T, *et al.*, Proteome analysis of secondary somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Sci* 175:717–23, 2008.
- Balbuena, T.S., Jo, L., Pieruzzi, F.P., Dias, L.L.C, Silveira, V., Santa-Catarina, C., Junqueira, M., Thelen, J. J., Shevchenko, A., and Floh, E. I.S. Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* 72: 302–311, 2011.
- Balbuena, T.S., Silveira, V. Junqueira, Dias M., Carnevalli, L.L., Santa-catarina, Shevchenko A. C., Floh, E.I.S. Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *Journal of Proteomics*, 72: 337-352, 2009.
- Battaglia, M., Olivera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias A The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol* 148:6–24, 2008.

- Bewley, J.D., Black M. Seeds: physiology of development and germination. 2<sup>a</sup> ed., New York: Plenum Press 445,1994.
- Blanc, G., Lardet L., Martin A., Jacob J.L., Carron M.P. Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *Journal of Experimental Botany*.53:1453-1462,2002.
- Blanco, M.A., Nieves N., Sánchez M., Borroto C.G., Castilho R., González J.L., Escalona M., Báez E., Hernández Z., Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugar-cane (*Saccharum sp.*). *Plant Cell Tissue Org Cult* 51:153-158, 1997.
- Borisjuk, L., H. Rolletschek, R. Radchuk, W. Weschke, U. Wobus, H. Weber, Seed development and differentiation: A role for metabolic regulation.*Plant Biol* 6:375–386, 2004.
- Borovskii, G.B., Stupnikova I.V., Antipina A.I., Vladimirova S.V., Voinikov V.K. Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biol* 2:5,2002.
- Boudet, J., Buitink, J, Hoeskstra, FA, Rogniaux, H, Larre, C, Satour, P, Leprince, O. Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiology* 140: 1418-1436, 2006.
- Bower,R.,Birch,R.G.Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant J.* 2:409–416, 1992.
- Burrieza, H.P., Lopez-fernandez, M.P., Chiquieri,T.B., Silveira, V.,Maldonado, S. Accumulation pattern of dehydrins during sugarcane (var.SP803280) somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 31: 2139-2149, 2012.
- Cailloux, F., Julien-Guerrier, J., Linossier, L., Coudret, A.,Long-term embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Science* 120: 185-196, 1996.
- Campalans, A., Pagès, M., Messeguer, R. Protein analysis during almond embryo development. Identification and characterization of a late embryogenesis abundant protein. *Plant Physiology. Bioch.*, 38: 449-457, 2000.
- Cangahuala-Inocente, G.C., Steiner, N. Santos, M., Guerra, M. P. Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma* 224: 33–40, 2004.
- Cánovas, F.M., Dumas-Gaudot E, Recorbe, G, Jorin J, Mock HP, Rossignol M. Plant proteome analysis. *Proteomics* 4: 285–298, 2004.
- Carpentier, S.C., Witter, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., Panis, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* 5: 2497-2507, 2005.
- Ceccarelli, N., Mondin, A., Curadi, M., Lorenzi, R., and Schiavo, F.L. Auxin metabolism and transport in an embryogenic cell line of *Daucus carota* L. *Uni. J. of Plant Physiol.* 157(1):17-23, 2000.

- Chen, S., Harmon A.C., Advances in plant proteomics. *Proteomics* 6: 5504-5516, 2006.
- Chen, K., Wu, H.J., Chen, J.F., Cheng, X.F., Jing, X., Wang, X.Y. Somatic embryogenesis and mass spectrometric identification of proteins related to somatic embryogenesis in *Eruca sativa*. *Plant Biotechnol Rep* 6:113–122, 2012.
- Chitteti, BR., Peng, Z. Comparative analysis of proteome differential regulation during cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Proteomics* 8: 4303-16, 2008.
- Cidade, D.A.P, Garcia R.O, Duarte A.C, , Sachetto-martins G, Mansur, E. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. *Pesq. Agrop. Bras.* 41: 385-391, 2006.
- Close, T.J, Lammers, P.J. An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiol* 101:773–779, 1993.
- Compeán, R.G., Polenske, K.R. Antagonistic bioenergies: Technological divergence of the ethanol industry in Brazil 39:6951-6961, 2011.
- Conab. Acompanhamento da Safra Brasileira:Cana-de-açúcar Safra 2009/2010, Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab, 2010.
- Conab. Acompanhamento da Safra Brasileira:Cana-de-açúcar Safra 2011/2012, Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab, 2012.
- Dal-Bianco, M., Carneiro, M. S, Hotta, C. T., Chapola, R. G., Hoffmann, H. P.,A.A.F., Garcia and Souza,G. M. Sugarcane improvement: how far can we go?. *Current Opinion in Biotechnology* 23:265–270, 2012.
- Danyluk, J., Perron A., Houde M., Limin A., Fowler B., Benhamou N., Sarhan F.Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* 10:623–638, 1998.
- De Vita, A.M. Análise comparativa da histomorfologia e do conteúdo de poliaminas em culturas embriogênicas e não embriogênicas de cana-de-açúcar- Dissertação de Mestrado CBB/UENF. 2011.
- De Vita, A.M. Indução e controle da embriogênese somática em cultivares de cana-de-açúcar: aspectos fisiológicos e bioquímicos. Monografia apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia –UENF, 2008.
- Delrot, S., Atanassova, R., Maurousset, L. Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporter. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 281-306, 2000.
- Dias de Oliveira, M.E, Vaughan BE, Rykiel EJ. Ethanol as fuel: energy, carbon dioxide balances, and ecological footprint.*Bioscience* 55: 593–602 2005.
- Dias, L.L.C, Santa-Catarina C, Floh EIS, Silveira V. Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas. *Rev. Bras. Hort. Ornam* 13: 174-179, 2002.
- Doku, A. and Di Falco, S. Biofuels in developing countries : Are comparative advantages enough? *Energy Policy* 44: 101-117, 2012.
- Dure, L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J* 3:363–369, 1993.

EIA. Energy Information Administration (EIA-Official Energy Statistics from the US Government). [www.eia.gov](http://www.eia.gov). 2011.

Egerton-Warburton, L.M., Balsamo R.A., Close T.J. Temporal accumulation and ultrastructural localization of dehydrins in *Zea mays*. *Physiol Plant* 101:545–555, 1997.

Fehér, A., Pasternak TP, Dudits D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 74: 201–228, 2003.

Filson, P.B., Dawson-Andoh, B.E. Characterization of sugar from model and enzyme-mediated pulp hydrolyzates using high-performance liquid chromatography coupled to evaporative light scattering detection. *Bioresource Technology* 100 (240): 6661-6664, 2009.

Fim, L.G. Metabolismo de proteínas, aminoácidos e carboidratos associados com a maturação de culturas embriogênicas de cana-de-açúcar. Monografia apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense- Dracy Ribeiro- 2009.

Fim, L.G. Estudo do crescimento celular em culturas embriogênicas e não-embriogênicas de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado- USP, 2012.

Furtado, A.T., Scandiffo, m.I.G., Cortez, L.A.B. The Brazilian sugarcane innovation system. *Energy Policy* 19: 156-166, 2011.

Gallo-Meagher, M., English RG, Abouzid A. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36: 37-40, 2000.

Gandonou, C., Errabii, T., Abrinl, J., Idaomar, M., Chibi, F., Senhaji, N. S. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum sp.*). *African Journal of Biotechnology* 11: 1250-1255, 2005.

Garello, G., Barthe, P., Bonelli, M., Bianco-Trinchant, J., Bianco, J., Page-Degivry, M.L. Abscisic acid-regulated responses of dormant and non-dormant embryos of *Helianthus annuus*: role of ABA-inducible proteins. *Plant Physiol. Bioch* 38: 473-482, 2000.

Geigenberger, P., Stitt, M., Fernie, A.R. Metabolic control analysis and regulation of the conversion of sucrose to starch in growing potato tubers. *Plant Cell & Environment* 27:655-673, 2004

Gibson, S.I., Control of plant development and gene expression by sugar signaling, *Curr. Opin. Plant. Biol.* 8: 93–102, 2005.

Gifford, D.J. An electrophoretic analysis of the seed proteins form *Pinus monticola* and eight other species of pine. *Can. J. Bot* 66: 1808-1812, 1988.

Goldberg, R.B., Paiva, G., Yadegari R. Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266: 605-614, 1994.

Goldemberg, J., Coelho, S.T., Guardabassi, P. The sustainability of production from sugarcane. *Energy Policy* 36:2086-2097, 2008.

Gómez-González, S., Ruiz-Jiménez, J., Priego-Capote, F., Castro, M.D.L. Qualitative and quantitative sugar profiling in olive fruits, leaves, and stems by



gas chromatography – tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) after ultrasound-assisted leaching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:12292-12299, 2010.

Görg, A., Obermair, C., Boguth, G., Harder, A., Wildgruber, R., Weiss, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis, Weinheim, Germany* 21: 1037-1053, 2000.

Görg, A., Postel, W., Gunther, S., Weser, J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and a laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis, Weinheim, Germany* 6: 599-604, 1985.

Gubisová, M., J. Gubis, A., Zofajová, D., Mihálka, Kraica, J. Enhanced in vitro propagation of *Miscanthus x giganteus*. *Industrial Crops and Products* 41: 279– 282, 2013.

Guerra, M.P., Torres, A.C., Teixeira, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas, In: Torres AC, Caldas LS, Buso JÁ. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas Brasília: Embrapa* 2: 533-568, 1999.

Gutiérrez-Miceli, F.A., Rodríguez-Mendiola, M.A., Ochoa-Alejo, N., Méndez-Salas, R., Arias-Castro, C., Dendooven, L. Sucrose accumulation and enzyme activities in callus culture of sugarcane. *Biologia Plantarum* 49:475-479, 2005.

Heyen, B.J., Alsheikh, M.K., Smith, E.A., Torvik, C.F., Seals, D.F., Randall, S.K. The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiol* 130:675–687, 2002.

Ho, W. J., Vasil, I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). 1. The morphology and ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma* 118:169–180, 1983.

Houde, M., Danyluk, J., Laliberte, J.F., Rassart, E., Dhindsa, R.S., Sarhan, F. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding a 50-kilodalton protein specifically induced by cold acclimation in wheat. *Plant Physiol* 99:1381–1387, 1995.

Iraqi, D., Tremblay, F.M. Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugar and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *Journal of Experimental Botany* ,52,2301-2311, 2001.

Islam, N., Lonsdale, M., Upadhyaya, N.M., Higgins, T.J., Hirano, H., Akhurst, R. Protein extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis. *Proteomics* 4: 1903-1908, 2004.

Ismail, A.M., Hall, A.E., Close T.J. Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol* 120:237–244, 1999.

Jacobs, D.L., Van Rijssen, M.S., Van der Heijden, R., Verpoorte, R. *Proteomics* 1: 1345-1350, 2001.

Jimenez, V.M. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 13 2:196-223, 2001.

- Kennedy D, Norman C. What don't we know?. *Science* 309 5731: 75, 2005.
- Ko S, Tan S.K, Kamada H. Characterization of a dehydrin-like protein (ECP-44) relating to somatic embryogenesis in carrot. *Plant Mol Biol Rep* 24:253–254,2006.
- Kormuták, A., Salaj, T., Vooková, B. Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir. *Biologia Bratislava* 61: 479-485, 2006.
- Kormuták, A., Vooková, B. Biochemical variation between non-embryogenic and embryogenic calli of silver fir. *Biologia Plantarum* 39: 125-130, 1997.
- Krajňáková, J., Häggman, H., Gömöry, D. Effect of sucrose concentration, polyethylene glycol and activated charcoal on maturation and regeneration of *Abies cephalonica* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 96: 251-262, 2009.
- Lakshmanan, P., Geijskes, R.J., Aitken, K.S., Grof, C.L.P., Bonnett, G.D., Smith, G.R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41: 345–363, 2005.
- Lakshmanan, P. Somatic embryogenesis in sugarcane. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 42: 201-205, 2006.
- Lameira, A.O., Pinto, J.E.B.P., Arrigoni-Blank, M.F., Cardoso, M.G. Efeito de compostos fenólicos, carvão ativado e do meio físico no desenvolvimento de segmento nodal de *Cordia verbenacea* L. *Cienc. Rural* 27(2):189-192, 1997.
- Lee, T.S.G, Bressan, E.A, Corrêa da Silva, A.D, Lee, L.L. Implantação de biofábrica de cana-de-açúcar: riscos e sucessos. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 13 Suplemento 2007.
- Lehninger, D, N., Cox, M, M. *Princípios de Bioquímica*. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 1274 p., 2011.
- Li, K., Zhu, W., Zeng, K., Zhang, Z., Ye, J., Ou, W., Rehman, S., Heuer, B., Chen, S. Proteome characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) somatic embryos, plantlets and tuberous roots. *Proteome Science* 8:10, 2010.
- Liu, M.C., Chen, W.H. Histological on the origin and process of plant differentiation in sugarcane callus mass. *Proc. Int. Soc. Sugarcane Technol.* 15: 118-121, 1974.
- Macedo, A.F. *Metabolismo de poliaminas durante a embriogênese somática de cana-de-açúcar*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, USP. 2010.
- Marsoni, M., Bracale, M., Espen, L., Prinsi, B., Negri, A.S., Vannini, C. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Rep.* 27:347-356, 2008.
- Martin, A.B., Cuadrado, Y., Guerra, H., Gallego, P., Hita, O., Martin, L., Dorado, A, Villalobos, N. Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Science* 154:143-151, 2000.

- Martin, K.P., Beegum, A.S, Zhang, C.L., Slater, A., Madhusoodanan, P.V. In vitro propagation of *Ophirrhiza prostate* through somatic embryogenesis. *Biologia Plantarum* 51: 769-772, 2007.
- McCormick, A.J., Watt., D.A. and Cramer, M. D. Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. *Journal of Experimental Botany* 60 (2): 357–364, 2009.
- Mordhost, A.P., Toonen, M.A.J, De Vries, S.C. Plant embryogenesis. *Rev. Plant Sci* 16:535-576, 1997.
- Mordocco, A.M., Brumbley, J.A, Lakshmanan, P. Development of a temporary immersion system (RITA<sup>®</sup>) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp.). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 45: 450-457, 2009.
- Mozambani, A.E. História e morfologia da cana-de-açúcar in Segato, S.V. *et al* Atualização em produção de cana-de-açúcar. Piracicaba: Cadernos Planalsucar 11-18, 2006.
- Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497, 1962.
- Nadar, H.M., Heinz, D.J. Root and shoot development from sugarcane callus tissue. *Crop Sci.* 17:814–816, 1977.
- Natarajan S., Xu C., Caperna T.J., Garrett W.M. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Analytical Biochemistry* 342: 214-220, 2005.
- Nhut, D.T., Le, B.V., Fukai, S., Tanaka, M., Van, K.T.T. Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. *Plant Growth Regulation* 33: 59-65, 2001.
- Nylander, M., Svensson J., Palva E.T., Welin B.V. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 45:263–279, 2001.
- Pan, M.J., Staden, J.V. Effect of charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. *Plant Growth Regulation* 29: 135-141, 1999.
- Pan, M.J., Van Staden, J. The use of charcoal in in vitro culture – a review. *Plant Growth Regul* 24:65-71, 1998.
- Pan, Z., Guan, R., Zhu, S., Deng, X. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Cell Rep* 28 2:281-9, 2009.
- Pan,Y.B. Biotechnology: Impact on Sugarcane Agriculture and Industry. *Sugar* 14 1:1–2, 2012.
- Pandey, A., Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405: 837-846, 2000.
- Pavokov, D., Omarszad. O., Maury S., Joseph C., Delaunay, A., Krsnik-Rasol M., and D.,Hagège. The Role of Carbohydrate-Metabolizing Enzymes in Sugar Sensing and Differentiation in Sugar Beet Cell Lines Carbohydrate-Metabolizing Enzymes in Sugar Beet, *Food Technol. Biotechnol.* 49 4: 435–446, 2011.

- Perera, L.C.J., Puerta, V.G L., Barrat, T.J.C.P.M, Bagatin, J.C., Battaglia, F.B. Competência X Protecionismo perspectivas das exportações de açúcar brasileiras, face à queda dos subsídios da união europeia. FACEP Pesquisa 2 :6, 2006.
- Perera, P.I.P., Hocher, V., Verdeil, J.L., Bandupriya, H.D.D., Yakandawala, D.M.D., Weerakoon, L.K. Androgenic potential in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 92:293–302, 2008.
- Pescador, R., Kerbauy, G.B., Kraus, J.E., Ferreira, W.M., Guerra. M.P., Figueredo-Ribeiro, R.C.L. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *In Vitro Cell* 44: 289-299, 2008.
- Phulwariaa M., Shekhawata N.S., Rathoreb J.S., Singhc, R.P. An efficient in vitro regeneration and ex vitro rooting of *Ceropegia bulbosa* Roxb.—A threatened and pharmaceutical important plant of Indian Thar Desert. *Industrial Crops and Products* 42: 25–29, 2013.
- Pullman, G.S., Buchanan, M. Identification and quantitative analysis of stage-specific carbohydrates in loblolly pine (*Pinus taeda*) zygotic embryo and female gametophyte tissues. *Tree Physiology* 28:985–996, 2008.
- Rapaka, V.K., Faust, J.E., Dole, J.M., Runkle, E.S. Endogenous carbohydrate status affects postharvest ethylene sensitivity in relation to leaf senescence and adventitious root formation in *Pelargonium* cuttings. *Postharvest Biology and Technology* 48,272-282, 2008.
- Rashid, H., Khan, S.A., Zia., M., M. Chaudhary F., Z. Hanif and Z. Chaudary. Callus induction and regeneration in elite sugarcane cultivar hsf-240. *Pak. J. Bot.* 41 4: 1645-1649, 2009.
- Raza, G., Ali K., Mukhtar, Z., Mansoor, S., Arshad, M. and Asad, S. The response of sugarcane (*Saccharum officinarum* L) genotypes to callus induction, regeneration and different concentrations of the selective agent (geneticin-418). *African Journal of Biotechnology* 9(51): 8739-8747, 2010.
- Reinert, J. Morphogenese und ihre kontrolle an geweberkulturen aus karotten. *Naturwissenschaften* 45:344-345,1958.
- Richard, D., Lescot, M., Inzé, D., De Veylder, L. Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult.*, 69: 167-176, 2002.
- Rode, C., Lindhorst , K., Braun, H.P., Winkelmann, T. From callus to embryo: a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum*. *Planta* 235:995–1011, 2012.
- Rorat T., Grygorowicz W.J., Irzykowski W., Rey P. Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage under vegetative growth. *Planta* 218:878–885, 2004.

Santos, A.L.W, Silveira, V., Steiner, N., Maraschin, M., Guerra, M.P. Biochemical and Morphological Changes during the Growth netics of *Araucaria angustifolia* Suspension Cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53:497-504, 2010.

Saravanan, R.S., Rose, J.K.C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 4: 2522-2532, 2004.

Schaewen, A.V., M. Stitt, R. Schmidt, U. Sonnewald, L. Willmitzer, Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants, *Embo J.* 9: 3033–3044, 1990.

Sghaier, B., Bahloul, M., Bouzid, R.G., Drira, N. Development of zygotic and somatic embryos of *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour: Comparative study. *Scientia Horticulturae* 116:169–175, 2008.

Sghaier-Hammami, B., Jorrín-Novo, J.V., Gargouri-Bouzid, R., Drira, N. Abscisic acid and sucrose increase the protein content in date palm somatic embryos, causing changes in 2-DE profile. *Phytochemistry* 71: 1223–1236, 2010.

Sghaier-Hammami, B., Drira,N. , J.V., Jorrín-Novo, Kriaa W., Bahloul, M. Effect of ABA, arginine and sucrose on protein content of date palm somatic. *Scientia Horticulturae* 120 379–385, 2009a.

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* 73, 161-177, 2009b.

Sharma, A.K., Millam, S., Hedley, P. E., McNicol, J., Bryan, G. J. Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: an auxin led perspective. *Plant Mol Biol* 68: 185-201, 2008.

Shewry, P.R., Napier, J.A., Tatham, A.S. Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. *Plant Cell* 7: 945-956,1995.

Silveira, V., Santa-Catarina, C., Balbuena, T.S., Moraes, F.M.S., Ricart C.A.O, Souza, M.V., Guerra, M.P., Handro, W., Floh, E.I.S. Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. *Biologia Plantarum* 52: 101-104, 2008.

Smeekens, S. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51,49-81,2000.

Snyman, S.J. Gwethlyn, M.M., Koch, A.C., Banasiak, M., Watt, M.P. Applications of in vitro culture systems for commercial sugarcane production and improvement. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 47(2): 234-249, 2011.

Steiner, N., Santa-Catarina, C., Andrade, J.B.R., Balbuena, T.S., Guerra, M.P., Handro, W., Floh, E.I.S, Silveira, V. *Araucaria angustifolia* Biotechnology - Review. *Func.Plant Sci. Biotech.* 2: 20-28, 2008.

- Steward, F.C., Mapes, M.O., Hears, K. Growth and organized development of cultured cells. II Growth and division of freely suspended cells. *American Journal of Botany* 45: 705-708, 1958.
- Shi, J., Chen S., Gollop N., Goren R., Goldschmidt E., Porat R. Effects of anaerobic stress on the proteome of citrus fruit. *Plant Sci.* 175: 478-486 2008.
- Su, Y. H., Zhao, X. Y., Liu, C. L., Zhang, C. L., O'Neill, S. D., Zhang, X. S. Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 59: 448-460, 2009.
- Sunderlíkova, V., Wilhelm E. High accumulation of legumin and LEA-like mRNAs during maturation is associated with increased conversion frequency of somatic embryos from pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *Protoplasma* 220:97–103, 2002.
- TaKác, T., Pechan, T., Samaj, J. Differential proteomics of plant development, *Journal of Proteomics* 74: 577-588, 2011.
- Tan, S.K., Kamada, H. Initial identification of a phosphoprotein that appears to be involved in the induction of somatic embryogenesis in carrots. *Plant Cell Rep* 19:739–747, 2000.
- Tanaka, M., A. Kikuchi, H. Kamada, Sugar signaling is involved in histone deacetylase-mediated repression of embryonic characteristics after germination, *Plant Biotechnol.* 25: 335–340, 2008.
- Taurus, T.E., Fowke, L.C., Dunstan, D.I. Somatic embryogenesis in conifers. *Can. J. Bot.*, 69:1873-1899, 1991.
- Thomas, T.D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol Adv.* 26:618-631, 2008.
- Thorpe, T.A. *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 557, 1995.
- Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA, 1998.
- UNICA-União da indústria de cana-de-açúcar. Setor Sucroenergético – Histórico. 6 - Cultivo da cana hoje. Disponível em: <http://www.unica.com.br> 2008
- Valcû, C., Schlink, M.K. Reduction of proteins during sample preparation and two-dimensional gel electrophoresis of woody plant samples. *Proteomics*, v.6, p.1599-1605, 2006.
- Van Winkle, S.C., Johnson, S. Pullman, G.S. The impact of gelrite and active carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media. *Plant Cell Report* 21:1175-1182, 2003.
- Vasil, I.K. A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Rep* 27:1423–1440, 2008.
- Veiga, C.F.M. Diagnóstico da cadeia produtiva de cana-de-açúcar do Estado do Rio de Janeiro relatórios de pesquisa. Rio de Janeiro: FAPERJ, SEBRAE-RJ, 2006.

Vieira, L.N., Santa-Catarina, C., Fraga, H.P.F, Santos, A.L.W., Steinmacher, D.A., P.S, Schlogl, Silveira, V., Steiner, N., Floh, E.I, Guerra, M.P. Glutathione improves early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze by alteration in nitric oxide emission. *Plant Science* 195: 80-87, 2012.

Vogel, G. How does a single somatic cell become a whole plant? *Science* 309 5731:86 2005.

Walkers, W.F., Tetteroo, A.A., Alberda, M., Hoekstra, F.A. Changed properties of the cytoplasmic matrix associated with desiccation tolerance of dried carrot somatic embryos. An in situ Fourier transform infrared spectroscopic study. *Plant Physiol* 120:153–163, 1999.

Wasinger, V.C., S.J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J.X. Yan, A.A. Gooley, M. R. Wilkins, M.W. Duncan, R. Harris, K.L. Williams, and I. Humphery-Smith. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16: 1090-1094, 1995.

Westermeier, R. *Electrophoresis in practice*, 3 ed., Wiley-VCH, 2000.

Xu, H., Zhang, W., Yi, G., Zhao, Y., Guo, L., Wang, J. Proteomic analysis of embryo development in rice (*Oryza sativa*). *Planta* 235: 687–701, 2012.

Zaghmout, O. M. F., Torello, W. A. Enhanced regeneration in long-term callus culture of red fescue by pretreatment with activated charcoal. *Hort Sci* 23:645-6, 1998.

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