

## **EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DURANTE A MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM *Carica Papaya L.***

*Heringer A.S.<sup>1</sup>, Barroso T.<sup>2</sup>, Silveira V.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> UENF/Laboratório de Biotecnologia, angeloheringer@gmail.com

<sup>2</sup> UENF/Laboratório de Biotecnologia

<sup>3</sup> UENF/Laboratório de Biotecnologia, vanildo@uenf.br

**Resumo** - O objetivo deste estudo foi investigar a expressão diferencial de proteínas durante a maturação de culturas embriogênicas de mamão híbrido UENF/Caliman01. Proteínas solúveis foram extraídas com tampão fosfato (pH 7,5) a partir de culturas submetidas a tratamentos de maturação em meio de cultura MS suplementado com 6% de PEG (polietileno glicol)(PEG6%) ou em meio MS sem PEG (controle). Alíquotas de 500 µg de proteínas foram submetidas à eletroforese bidimensional (2-DE). Para focalização isoeletrica foram utilizadas tiras de gel IPG (gradiente de pH imobilizado) de 18 cm (pH 4-7). A segunda dimensão foi conduzida em gel de poliácridamida 12% (SDS-PAGE) e corados com Coomassie coloidal. O gel do tratamento PEG 6%, onde houve maturação de embriões somáticos, apresentou 166 spots contra 118 spots observados no gel do controle, com 62 spots comuns. Em relação ao peso molecular, houve um maior percentual de proteínas na faixa de 7-33 KDa no controle (29,7%), enquanto a maioria das proteínas do tratamento PEG (82,7%) estava na faixa de 34-140 KDa. Assim, foi possível associar um padrão de expressão diferencial de proteínas com a capacidade de maturação de embriões somáticos de mamoeiro.

**Palavras-chave:** Embriogênese somática, proteômica, eletroforese bidimensional, mamão.

**Área do Conhecimento:** Botânica.

### **Introdução**

O Brasil é o maior produtor mundial de mamão representando cerca de 25% do total produzido no mundo (FAO, 2007).

Nas últimas décadas, diversas técnicas biotecnológicas têm sido empregadas com sucesso em apoio a programas de melhoramento do mamoeiro (ASHOMORE E DREW, 2006). A embriogênese somática (ES) se destaca e é apontada como uma importante ferramenta biotecnológica com potencial para propagação clonal e regeneração de plantas geneticamente modificadas.

Proteínas e genes que atuam nas fases iniciais de diferenciação de calos podem ser

identificados, podendo então obter uma melhor compreensão das vias que regulam a maturação dos embriões somáticos (YIN et al., 2007).

As proteínas podem ser utilizadas como marcadores para a ES, relacionando assim os estágios embriogênicos e suas alterações nos perfis protéicos com o desenvolvimento embrionário (CAMPALANS et al., 2000). Neste contexto, através de análises proteômicas têm sido possível a identificação de marcadores da competência das culturas embriogênicas, com diferenças nos perfis protéicos entre tecidos embriogênicos e não embriogênicos (MARSONI et al., 2008).

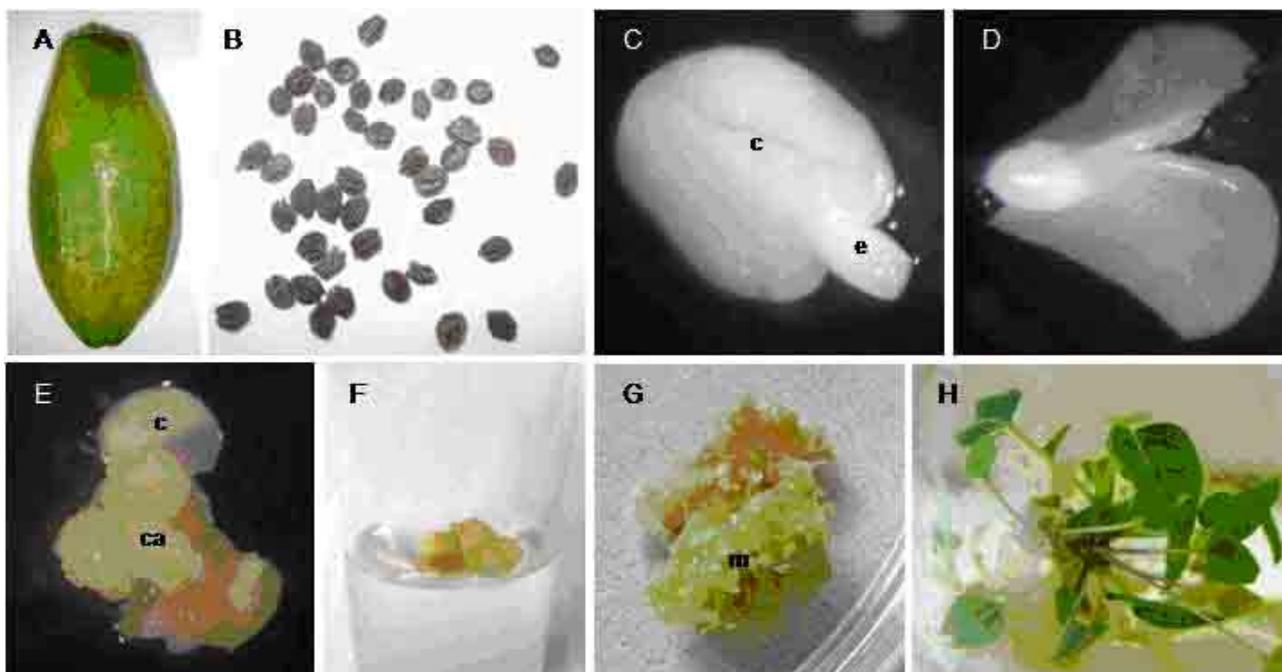
## Metodologia

Culturas embriogênicas foram induzidas a partir de embriões imaturos (Figura 1-C) de mamão Híbrido (UENF/ CALIMAN 01) (Figura 1-A) em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 20  $\mu\text{M}$  de ácido 2,4 diclorofenoxyacético (2,4-D) e 3% de sacarose e foram mantidas no escuro.

A maturação (40 dias) das culturas ocorreu em meio de cultura MS suplementado com 6% de PEG (polietileno glicol)(PEG 6%) ou em meio MS sem PEG (controle).

Os dois tratamentos foram suplementados com mio-inositol 0,005%, sacarose 3% e glutamina 0,04%. As culturas foram mantidas no claro a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (Figura 1-G).

As culturas do tratamento PEG 6% apresentaram maturação dos embriões



**Figura 1. Embriogênese somática em mamoeiro (Híbrido UENF/CALIMAN 01) A) Frutos imaturos; B) Sementes imaturas ; C) Embrião imaturo ; D) Embrião imaturo com os cotilédones abertos (início da indução); E) Formação do calo a partir do embrião imaturo; F) Calo induzido G) Calo no início da maturação. H) Plântulas somáticas regeneradas a partir de embriões somáticos. c) Cotilédone; ca) Calo; e) Embrião zigótico; m) Calo em diferenciação.**

somáticos, diferente das culturas controle. A extração das proteínas solúveis segue o trabalho descrito por SANTA-CATARINA et al (2006). As proteínas solúveis de amostras com 300 mg, dos dois tratamentos, foram extraídas em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  50 mM, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), 10 mM de 2-mercaptoetanol, pH 7,5), a  $4^\circ\text{C}$ . O homogenato foi incubado a  $4^\circ\text{C}$  por 30 min. e centrifugado

a 14000 RPM por 10 min. a  $4^\circ\text{C}$  em que se obteve o sobrenadante com as proteínas solúveis. A quantificação protéica foi realizada de acordo com BRADFORD (1976).

A 2-DE foi realizada de acordo com Balbuena et al. (2009). Alíquotas dos extratos protéicos (500  $\mu\text{g}$  de proteína) de cada tratamento foram precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) 10% e solubilizadas em 375  $\mu\text{L}$  de tampão de reidratação (Uréia 7M,

Tiouréia 2M, CHAPS, IPG Buffer 4-7 0,5%, azul de bromofenol 0,002% e DTT 1%). A solução é aplicada no suporte de tiras em uma tira de gel IPG de 18 cm (pH 4-7) e coberta com 1250 µL de óleo mineral. O suporte foi levado então ao isofocalizador da GE Healthcare®, onde ocorreu a reidratação (12h) e a isofocalização nas condições determinadas pelo fabricante.

Posteriormente as tiras foram reduzidas em 3 mL de tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, 6M de uréia, glicerol a 30% (v/v), SDS a 4% (p/v)) contendo DTT (125 mM) e alquiladas em outros 3mL, porém agora contendo iodoacetoamida (125 mM)(20 min. cada etapa).

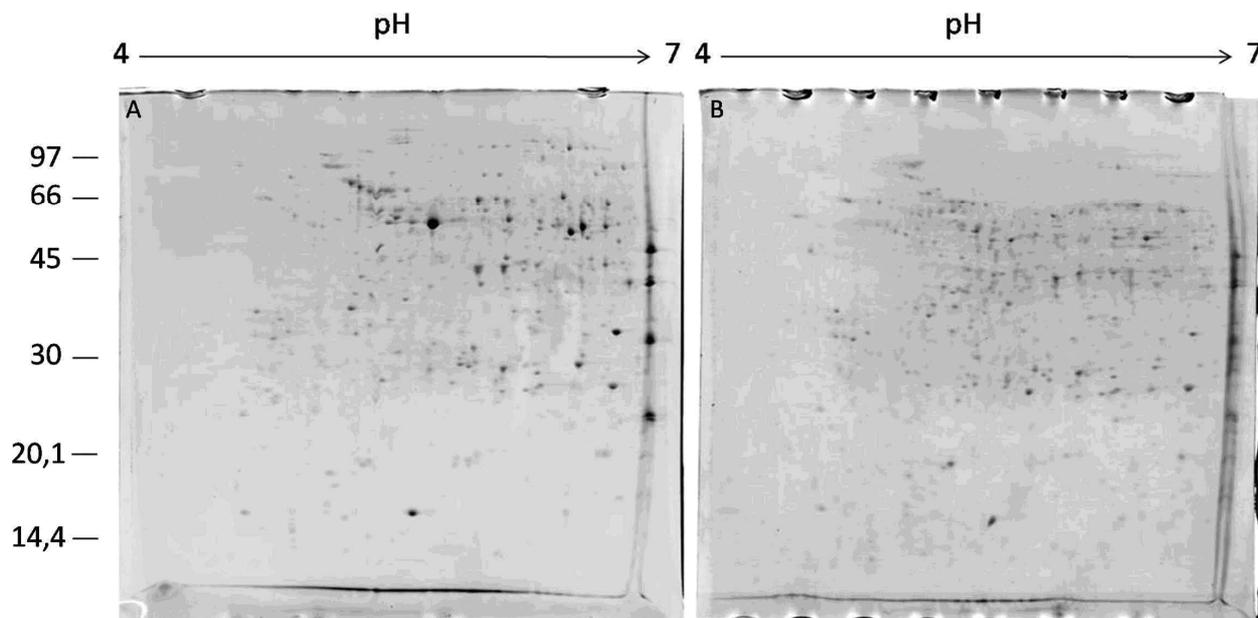
A segunda dimensão foi conduzida em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%, onde as proteínas foram separadas pelo seu peso molecular. A corrida se deu a uma corrente constante de 25 mA por gel.

Os géis foram corados com Coomassie coloidal e digitalizados em scanner para

análise das imagens no programa *Image Master Platinum v.7* (GE Healthcare®). Foram avaliados a expressão diferencial de proteínas e a distribuição de proteínas em relação ao peso molecular.

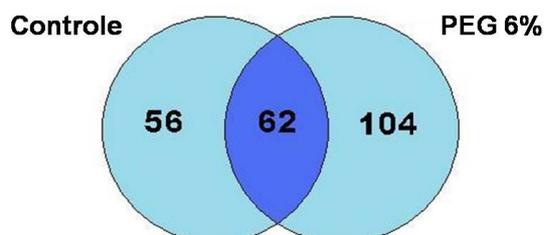
## Resultados

Os tratamentos apresentaram diferenças significativas quanto a expressão diferencial de proteínas (Figura 2). O tratamento controle, ou seja, aquela cultura que não resultou na maturação dos embriões somáticos, apresentou um total de 56 proteínas solúveis tratamento-específicas (observadas apenas neste tratamento). Por outro lado, o total de proteínas solúveis tratamento-específicas das culturas mantidas em PEG 6%, ou seja, aquela cultura que maturou, foi de 104 proteínas. Já as proteínas em comum às duas amostras teve um total de 62 proteínas (Figura 3).



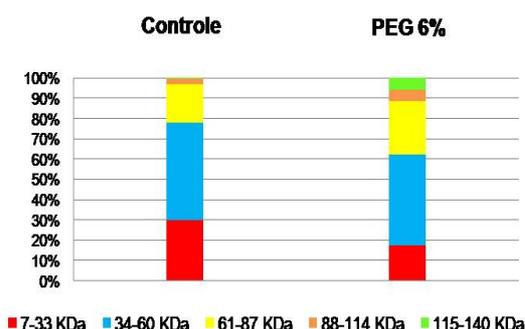
**Figura 2.** Mapas 2-DE durante a maturação de embriões somáticos em mamoeiro (Híbrido UENF/CALIMAN 01). A) Gel bidimensional de proteínas solúveis de culturas maturadas, em meio de cultura MS suplementado com 6% de PEG, de mamão, utilizando gel de IPG na faixa de pH 4-7, linear. B) Gel bidimensional de proteínas solúveis de culturas não maturadas, em meio de cultura MS sem a presença de PEG, de mamão, utilizando gel de IPG na faixa de pH 4-7, linear. Foram

utilizados 500 µg de proteína com duas precipitações em TCA e os géis foram corados com Coomassie Coloidal.



**Figura 3.** Número de proteínas solúveis particulares e comuns observadas no tratamento de maturação, de culturas maturadas (Meio de cultura MS suplementado com 6% de PEG) e não maturadas (Meio de cultura MS sem PEG) de mamão submetidas a 2-DE.

A análise da distribuição das proteínas, nos diferentes tratamentos, de acordo com o seu peso molecular, apresentou diferenças significativas (Figura 4). Separando estas proteínas em intervalos fixos (7-33, 34-60, 61-87, 88-114, 115-140 KDa) pode se ter uma análise de padrão de expressão diferencial de proteínas por peso molecular entre os diferentes tratamentos.



**Figura 4.** Distribuição de proteínas observada no gel 2-DE de acordo com a massa aparente (KDa), separadas de acordo com o tipo de conteúdo protéico entre as culturas que maturaram (Meio de cultura MS suplementado com 6% de PEG) e que não maturaram (Meio de cultura MS sem PEG).

O tratamento controle (sem PEG), que não resultou na maturação das culturas embriogênicas, apresentou uma predominância de proteínas na faixa de 34-60 KDa. Neste tratamento foi observado que a porcentagem de proteínas na faixa de 7-33 KDa foi significativamente superior, do que quando comparado com o tratamento PEG 6%. Ao contrário do que se observou nas faixas de 34-60 e 61-87 KDa em que o tratamento PEG 6% apresentou um número superior, 300 e 174 polipeptídios, respectivamente, em relação ao tratamento controle, 269 e 104 polipeptídios, respectivamente. As proteínas de alto peso molecular (115-140 KDa) foram observadas predominantemente no tratamento PEG 6%, que promoveu a maturação dos embriões somáticos.

## Discussão

Na embriogênese zigótica, o aumento no conteúdo de proteína ocorre como resultado da síntese de proteínas de reserva e proteínas LEA (“late embryogenesis abundant”). As proteínas LEA têm grande afinidade por água e atua na preservação do tecido vegetal em situações de estresse hídrico (BEWLEY & BLACK, 1994). O PEG é um agente osmótico de alto peso molecular que, quando utilizado em cultura de tecidos, reduz o potencial hídrico do meio de cultura e causa grande estresse hídrico às células. Em nosso trabalho o tratamento PEG 6% induziu a síntese de um número maior de proteínas (Figuras 2 e 3), que pode estar ocorrente pela síntese de proteínas LEA em decorrência do estresse causado pelo PEG. A suplementação com PEG em culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia* também resultou na expressão de um maior número de proteínas, quando comparados com

os demais tratamentos (ANDRADE ET AL., 2007).

As proteínas na faixa de 34-87 KDa foram mais abundantes no tratamento PEG 6% em relação ao tratamento controle, sugerindo que essas proteínas podem ser fundamentais no processo de maturação dos embriões somáticos de mamoeiro. BURRIS ET AL. (1997), analisando o padrão eletroforético das proteínas LEA extraídas de eixos embrionários de milho, observaram que a fração protéica de peso molecular de 66 kDa foi induzida e acumulada durante a maturação do embrião. Desta forma, o acúmulo de proteínas na faixa de 34-87 KDa no tratamento PEG 6%, em que resultou na maturação dos embriões somáticos, pode estar relacionado com a síntese de proteínas LEA.

A identificação das proteínas associadas com a maturação dos embriões somáticos pode contribuir para a compreensão do desenvolvimento embrionário, além de auxiliar na otimização dos protocolos de maturação das culturas embriogênicas em *Carica papaya L.* Análises mais aprofundadas utilizando a plataforma MS/MS, visando à identificação dessas proteínas que foram observadas como expressas diferencialmente nos tratamentos de maturação PEG 6%, poderão ser empregadas para a melhor compreensão da embriogênese somática em mamoeiro.

### Conclusão

De acordo com os nossos resultados foi possível associar um padrão na expressão diferencial de proteínas com a capacidade de maturação de embriões somáticos em mamão, sendo as proteínas na faixa de 34-87 KDa sintetizadas no tratamento PEG 6%, que resultou na maturação de embriões somáticos.

Estas proteínas podem vir a servir como possíveis alvos de marcadores bioquímicos

associados com a embriogênese somática em mamoeiro.

### Referências

- ANDRADE, J.B.R.; DIAS, L.L.C.; BALBUENA, T.S.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E.I.S.; SILVEIRA, V. Análise proteômica comparativa durante a maturação de culturas embriogênicas de *Araucaria angustifolia*. In: 3. Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos Vegetais, Goiânia, GO; 2007.
- ASHOMORE SE, DREW RA. The application of biotechnology in an integrated project of conservation and utilization of papaya and its wild relatives. **Acta Horti** 725:89-94; 2006.
- BALBUENA, T.S.; SILVEIRA, V.; JUNQUEIRA, M.; DIAS, L.L.C.; SANTA-CATARINA, C.; SHEVCHENKO, A.; FLOH, E.I.S. Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). **Journal of Proteomics** Volume 72, Issue 3, Pages 337-352; 2009.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination, 2. ed. **New York: Plenum Press**, p. 445; 1994.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**; 72: 248-254, 1976.
- BURRIS, J.S.; PETERSON, J.M.; PERDOMO, A.; FENG, D.S. Morphological and physiological changes associated with desiccation in maize embryos. In: International Workshop On Seeds: basic and applied aspects of seed biology, 5., 1995, Reading. Proceedings. **Reading: University of Reading**, p.103-111. 1997.
- CAMPALANS, A.; PAGÈS, M.; MESSEGUER, R. Protein analysis during almond embryo development. Identification and characterization of a late embryogenesis

abundant protein. **Plant Physiology and Biochemistry**, 38:449-457; 2000.

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.

MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**. 1962; 15: 473-497.

SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; BALBUENA, T.S.; VIANA, A.M.; ESTELITA, M.E.M.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. **Plant Growth Regulation**, v. 49, n. 2/3, p. 237-247; 2006.

SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; BALBUENA, T.S.; MORAES, F.M.S.; RICART, C.A.O.; SOUSA, M.V.; GUERRA, M.P.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, 52(1):101-104; 2008.

YIN, L.; TAO, Y.; SHAO, J.; LI, X.; LIU, G.; LIU, S.; ZHU, L. Proteomic and transcriptomic analysis of rice mature seed-derived callus differentiation. **Proteomics**, 7, 755–768; 2007.