

INTEGRAÇÃO DE ANÁLISES ÔMICAS PARA IDENTIFICAR A
INFLUÊNCIA DA METILAÇÃO DO DNA NA EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA EM MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

KARINA DA SILVA VIEIRA SOEIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO - 2026

INTEGRAÇÃO DE ANÁLISES ÔMICAS PARA IDENTIFICAR A
INFLUÊNCIA DA METILAÇÃO DO DNA NA EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA EM MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

KARINA DA SILVA VIEIRA SOEIRO

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Doutora em
Biotecnologia Vegetal”

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Silveira

Coorientador: Vitor Batista Pinto

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO - 2026

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S681

Soeiro, Karina da Silva Vieira.

Integração de análises ômicas para identificar a influência da metilação do DNA na embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.) / Karina da Silva Vieira Soeiro. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

75 f. : il.

Bibliografia: 15 - 74.

Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2026.
Orientador: Vanildo Silveira.

1. Epigenética. 2. Proteômica. 3. Hormônios vegetais. 4. Metilação global do DNA. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

INTEGRAÇÃO DE ANÁLISES ÔMICAS PARA IDENTIFICAR A
INFLUÊNCIA DA METILAÇÃO DO DNA NA EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA EM MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

KARINA DA SILVA VIEIRA SOEIRO

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Doutora em
Biotecnologia Vegetal”

Aprovada em 27 de fevereiro de 2026

Comissão Examinadora:

Profa. Clícia Grativol Gaspar de Matos (D.Sc., Ciências Biológicas) - UENF

Prof. Hugo Pacheco de Freitas Fraga (D.Sc., Ciências) - UFPR

Profa. Virgínia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) - UENF

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

*A cada estudante da escola pública que caminha entre desafios e sonhos, provando,
todos os dias, que a educação pode abrir portas e mudar destinos.*

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço por ter sido meu amparo constante em cada etapa desta caminhada.

À minha família, expresso minha mais profunda gratidão por ser minha base e minha motivação diária. Em especial, agradeço ao meu marido, Júlio Soeiro, por embarcar em todas as minhas aventuras, acreditar nos meus sonhos e me incentivar a seguir mesmo quando o cansaço e as incertezas se faziam presentes, e à minha mãe, Alzenira Oliveira, por todo o amor, dedicação e sacrifício que tornaram possível a continuidade dos meus estudos.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), agradeço pelo suporte institucional e financeiro ao longo do doutorado. O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES – Código de Financiamento 001, FAPERJ (Proc. E-26/211.310/2021 e E-26/204.185/2024) e CNPq (312258/2023-2).

Ao meu orientador, Prof. Vanildo Silveira, agradeço pela orientação, paciência, confiança e contribuição decisiva para o meu crescimento científico e profissional.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, deixo meu agradecimento especial. Não cito nomes para que ninguém se sinta menos importante, pois todos, em algum momento desses quatro anos, foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Cada ajuda, conversa, conselho e gesto de apoio fizeram parte desta conquista.

Ao Prof. Aciel Tavares, agradeço por ter me apresentado a possibilidade de cursar um doutorado e por acreditar no meu potencial desde os primeiros passos no mundo acadêmico. Ao Prof. Emanuel Gomes de Moura (*in memoriam*) e à Prof^a. Thaís Roseli Corrêa, agradeço pelos ensinamentos e pela orientação durante a graduação e o mestrado, que foram fundamentais para a minha formação.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para esta trajetória. Esta tese representa não apenas um trabalho científico, mas a realização de um sonho construído com apoio, fé e perseverança.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos florais do mamoeiro. Flor pistilada ou feminina (A, B); flor estaminada ou masculina (C); flor hermafrodita (D, E). Fotos: Naiane Silva (2021).	19
Figura 2. Esquema da modulação de culturas embriogênese somática (A) indução e multiplicação e (B) ciclo de maturação adaptado de Steiner et al., 2008.....	20
Figura 3. a) Relações entre níveis de diferenciação celular, metilação do DNA e potencial embriogênico entre diferentes tipos de tecidos vegetais utilizados como explantes; (b) diferença e potencial embriogênico entre calos embriogênicos e não embriogênicos e não embriogênicos; (c) dinâmica do DNA níveis de metilação em todo o processo SE (Montalvo et al. 2018).....	25
Figura 4. Representação dos pontos de coleta ao longo dos estágios de desenvolvimento dos calos embriogênicos em <i>Carica papaya</i> L., incluindo os tempos e as análises realizadas.	31
Figura 5. Desenvolvimento de calos embriogênicos de <i>Carica papaya</i> L. ao final da segunda fase de multiplicação (dia 0), ao longo da terceira fase de multiplicação (dias 7, 14 e 21) e durante o período de maturação dos embriões (dia 35), sob condições controle e na presença de hidroxureia (HU) e 5-azacitidina (5-AzaC). Barra de escala = 1 mm.	40
Figura 6. Níveis de metilação global do DNA (GDM %) em calos embriogênicos de <i>Carica papaya</i> L. submetidos aos tratamentos controle, 5-azacitidina (5-AzaC) e hidroxureia (HU) nos dias 0, 7 e 14 de cultivo <i>in vitro</i> . As barras representam a média $\pm$ erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Student–Newman–Keuls (SNK, $p \leq 0,05$). Letras minúsculas indicam comparações entre os dias dentro de cada tratamento, enquanto letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos dentro de cada dia. Coeficiente de variação (CV): Controle = 18.33%; 5-AzaC = 12.28%; HU = 10.87%.	42
Figura 7. Dinâmica temporal da metilação global do DNA (GDM, %) em calos embriogênicos de <i>Carica papaya</i> L. submetidos aos tratamentos controle e 5-azacitidina (5-AzaC) nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 14 de cultivo <i>in vitro</i> . As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SE). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Student–Newman–Keuls (SNK, $p \leq 0,05$). Letras minúsculas indicam comparações entre os dias dentro de cada tratamento, enquanto letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos dentro de cada dia. Coeficiente de variação (CV): Controle = 26.36%; 5-AzaC = 17.76%.	Erro!
Indicador não definido.	

Figura 8. Visualização alternativa da metilação global do DNA (GDM, %) em calos embriogênicos de *Carica papaya* L. submetidos aos tratamentos controle e 5-azacitidina (5-AzaC) ao longo dos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 14 de cultivo *in vitro*, destacando a variação temporal dentro de cada tratamento. As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SE). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Student–Newman–Keuls (SNK, $p \leq 0,05$). Coeficiente de variação (CV): Controle = 26,36%; 5-AzaC = 17,76%. 42

Figura 9. Teores de hormônios vegetais em calos embriogênicos de *Carica papaya* L. ao longo do tempo (0, 7, e 14 dias) sob os tratamentos controle (C), 5-azacitidina (5-AzaC) e hidroxiureia (HU). (a) Ácido indol-3-acético (IAA); (b) ácido jasmônico (JA); (c) ácido salicílico (SA). As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SE). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Student–Newman–Keuls (SNK, $p \leq 0,05$). Letras minúsculas indicam comparações entre os dias dentro de cada tratamento, enquanto letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos dentro de cada dia. Os teores hormonais estão expressos em ng g^{-1} de massa seca (DW). Coeficiente de variação (CV): IAA – C = 27,2%, 5-AzaC = 10,8%, HU = 4,7%; JA – C = 89,8%, 5-AzaC = 28,0%, HU = 21,0%; SA – C = 98,9%, 5-AzaC = 67,5%, HU = 14,8%. 44

Figura 10. Análise proteômica diferencial durante a embriogênese somática de *Carica Papaya* L sob os tratamentos Controle (C), 5-azacitidina (5-AzaC; AZ) e hidroxiureia (HU) aos 0, 7 e 14 dias. **(a)** Diagrama de Venn mostrando a distribuição e o número de proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) únicas e compartilhadas entre os tratamentos no tempo inicial (0 e 7 dias). **(b)** Diagrama de Venn representando a sobreposição das DAPs entre os tratamentos aos 14 dias. **(c)** Mapa de calor exibindo o agrupamento hierárquico de 350 DAPs, organizadas em sete clusters (Clusters 1–7) com base nos perfis de abundância normalizados por *z-score*. Cores quentes (amarelo) indicam maior abundância relativa de proteínas, enquanto cores frias (azul) representam menor abundância nos diferentes tratamentos e tempos experimentais..... 46

Figura 11. Análise de enriquecimento funcional (Gene Ontology – Processo Biológico) realizada utilizando o ShinyGO v0.82. Cada bolha representa um processo biológico significativamente enriquecido. O tamanho da bolha indica o fold enrichment, enquanto a intensidade da cor reflete o nível de significância estatística ($-\log_{10}$ FDR). As comparações 14AZ/14C, 14HU/14C, 7AZ/7C e 7HU/7C estão dispostas no eixo x, e os processos biológicos enriquecidos estão listados no eixo y. A figura foi gerada em R com base nos resultados exportados do ShinyGO..... 47

Figura 12. Rede de interação proteína–proteína (PPI) de proteínas associadas à indução de calos embriogênicos mediada por 2,4-D em *Carica papaya* L. A rede foi gerada no Cytoscape utilizando o stringApp, com limite de confiança de 0,7. As arestas são exibidas no modo de confiança, com a espessura e a opacidade escalonadas de acordo com o escore combinado do STRING. As cores dos nós indicam a centralidade topológica na rede, sendo os nós em vermelho representativos de proteínas hub com alta conectividade, os nós em laranja e amarelo indicativos de conectividade intermediária e os nós em azul representativos de proteínas com baixa conectividade. Os nomes indicam proteínas de *Arabidopsis* ortólogas às identificadas em *C. papaya* L. pela análise no STRING..... 49

Figura 13. Rede de interação proteína–proteína de proteínas associadas à indução de calos embriogênicos mediada por 2,4-D em *Carica papaya* L. A rede foi gerada no Cytoscape utilizando o stringApp, com limiar de confiança de 0,7. As arestas são apresentadas no modo de visualização por confiança, com espessura e opacidade proporcionais ao score combinado do STRING. Os nomes das proteínas correspondem aos ortólogos de *Arabidopsis thaliana* identificados para as respectivas proteínas de *C. papaya* L. por meio da análise no STRING. A codificação por cores dos nós representa as relações de ortologia: nós pretos indicam um único ortólogo de mamão correspondente a uma proteína de *Arabidopsis*, enquanto nós azuis indicam dois ou mais ortólogos de *C. papaya* L. mapeados para a mesma proteína de *Arabidopsis thaliana*..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios do número de embriões globulares, em estágio de coração, cotiledonares e do total de embriões de <i>Carica</i> . Papaya L sob diferentes tratamentos, na concentração de 5 μ M. Os valores representam médias (n = 4). Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.	40
Tabela 2. Proteínas-alvo potencialmente relacionadas à regulação epigenética, desenvolvimento embrionário e respostas ao estresse durante a embriogênese somática de <i>Carica papaya</i> L., identificadas por análise proteômica e agrupadas conforme padrões de acumulação nos diferentes tempos experimentais e tratamentos. A tabela apresenta ortólogos em <i>Arabidopsis thaliana</i> , categorias biológicas putativas, comparações experimentais relevantes e o perfil diferencial de acumulação (UP = aumento; DOWN = redução; Uniq. = exclusivo do tratamento).	53

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	O mamoeiro: importância produtiva, desafios e perspectivas biotecnológicas	17
2.2	Embriogênese somática em <i>Carica papaya</i> : avanços, limitações e contribuições das tecnologias ômicas	20
2.3	Papel da metilação do DNA na aquisição e expressão da competência embriogênica em plantas	22
2.4	Efeitos da 5-azacitidina e da hidroxiureia na embriogênese somática: implicações epigenéticas e celulares	25
2.5	Efeitos dos Reguladores de Crescimento Vegetal (PGRs) na Metilação do DNA na Competência Embriogênica	27
3.	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo Geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Material vegetal e indução de calos	29
4.2	Maturação das culturas embriogênicas	31
4.3	Análise global da metilação do DNA (GDM)	32
4.3.1	Extração de DNA	32
4.3.2	Digestão de ácidos nucleicos	33
4.3.3	UPLC e espectrometria de massas	33
4.3.4	Processamento de dados	34
4.4	Análise estatística	35
4.5	Análise proteômica	35
4.5.1	Extração de proteínas e digestão triptica	35
4.5.2	Análise por espectrometria de massas e processamento dos espectros	36
4.5.3	Análise de dados proteômicos	37
4.6	Extração e purificação de hormônios endógenos	38
4.7	Análise estatística	39
5.	RESULTADOS	40
5.1	Influência do agente metilante na formação de embriões em <i>C. papaya</i>	40
5.2	Metilação global do DNA (GDM)	41
5.3	Quantificação de hormônios vegetais endógenos	43
5.4	Análise proteômica	44
5.5	Análise funcional dos dados proteômicos	47

6.	DISCUSSÃO.....	56
7.	CONCLUSÕES.....	59
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	59
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

RESUMO

SOEIRO, Karina da Silva Vieira, Dra., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, fevereiro de 2026. INTEGRAÇÃO DE ANÁLISES ÔMICAS PARA IDENTIFICAR A INFLUÊNCIA DA METILAÇÃO DO DNA NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MAMOEIRO (*Carica papaya* L.). Orientador: Prof. Dr. Vanildo Silveira e coorientador: Vitor Batista Pinto.

Carica papaya L. é uma cultura tropical de elevada relevância econômica e uma espécie modelo para o estudo da plasticidade celular em plantas. Entretanto, a segregação sexual e a variabilidade genética dificultam o melhoramento e a propagação clonal em larga escala, tornando a embriogênese somática (ES) uma ferramenta estratégica para a regeneração in vitro. A aquisição da competência embriogênica é um processo altamente regulado, resultante da integração entre mecanismos epigenéticos, sinalização hormonal e reorganização molecular. Neste estudo, investigou-se o papel da modulação epigenética na ES de *C. papaya* por meio da aplicação de 5-azacitidina (5-AzaC) e hidroxureia (HU), integrando análises de metilação global do DNA, perfis hormonais e proteômica quantitativa ao longo do desenvolvimento embriogênico. A metilação global do DNA foi quantificada por LC-MS/MS, enquanto abordagens proteômicas e hormonais permitiram caracterizar as alterações associadas à reprogramação celular. Os resultados demonstraram que o tratamento com 5-AzaC induziu uma resposta epigenética dinâmica, caracterizada por hipometilação inicial seguida por remodelação da metilação e posterior estabilização. Essa dinâmica esteve associada ao aumento do número de embriões em estádios iniciais, sem alteração na produção total, indicando aceleração da aquisição de competência embriogênica. A análise hormonal evidenciou elevações transitórias de ácido jasmônico e ácido salicílico, compatíveis com a transição de respostas associadas ao estresse para processos de desenvolvimento, enquanto os níveis de auxina aumentaram progressivamente ao longo da ES. A análise proteômica revelou reorganização sistêmica das redes celulares, com enriquecimento de proteínas relacionadas à tradução, remodelamento da cromatina, metabolismo redox, tráfego vesicular e resposta ao estresse, indicando elevada atividade metabólica e epigenética durante a estabilização dos novos estados celulares. Em contraste, o tratamento com HU induziu estresse replicativo moderado, resultando em resposta embriogênica mais restrita e ajustes moleculares transitórios. Em conjunto, os resultados sustentam um modelo no qual a ES em *C. papaya* é regulada pela integração dinâmica entre modulação epigenética, sinalização hormonal, reorganização proteômica.

Palavras-chave: Epigenética, Proteômica, Hormônios vegetais; Metilação global do DNA.

ABSTRACT

Carica papaya L. is a tropical crop of high economic importance and a model species for the study of cellular plasticity in plants. However, sexual segregation and genetic variability hinder breeding programs and large-scale clonal propagation, making somatic embryogenesis (SE) a strategic tool for in vitro regeneration. The acquisition of embryogenic competence is a highly regulated process resulting from the integration of epigenetic mechanisms, hormonal signaling, and molecular reorganization. In this study, the role of epigenetic modulation in the SE of *C. papaya* was investigated through the application of 5-azacytidine (5-AzaC) and hydroxyurea (HU), integrating analyses of global DNA methylation, hormonal profiling, and quantitative proteomics throughout embryogenic development. Global DNA methylation was quantified by LC–MS/MS, while proteomic and hormonal approaches were employed to characterize the molecular alterations associated with cellular reprogramming. The results demonstrated that treatment with 5-AzaC induced a dynamic epigenetic response characterized by initial hypomethylation followed by methylation remodeling and subsequent stabilization. This dynamic was associated with an increased number of embryos at early developmental stages, without affecting total embryo production, indicating an acceleration in the acquisition of embryogenic competence. Hormonal analysis revealed transient increases in jasmonic acid and salicylic acid levels, consistent with the transition from stress-associated responses to developmental processes, while auxin levels progressively increased throughout SE. Proteomic analysis revealed a systemic reorganization of cellular networks, with enrichment of proteins related to translation, chromatin remodeling, redox metabolism, vesicular trafficking, and stress response, indicating high metabolic and epigenetic activity during the stabilization of new cellular states. In contrast, HU treatment induced moderate replicative stress, resulting in a more restricted embryogenic response and transient molecular adjustments. Altogether, the results support a model in which SE in *C. papaya* is regulated by the dynamic integration of epigenetic modulation, hormonal signaling, and proteomic reorganization.

Keywords: Epigenetics; Proteomics; Plant hormones; Global DNA methylation.

1. INTRODUÇÃO

A embriogênese somática representa um dos fenômenos mais notáveis da biologia vegetal, constituindo um modelo completo de totipotência celular (Su et al., 2021). Nesse processo, células somáticas são reprogramadas para formar embriões e, subsequentemente, plantas completas, tornando esse sistema altamente valioso para a propagação clonal, conservação de germoplasma e aplicações biotecnológicas (Méndez-Hernández, Ledezma-Rodríguez, Avilez-Montalvo, Juárez-Gómez, Skeete, Avilez-Montalvo, De-La-Peña, et al., 2019). As primeiras evidências desse fenômeno surgiram no final da década de 1950 (Steward et al., 1958), demonstrando que células vegetais, sob estímulos específicos, podem readquirir a capacidade de gerar estruturas embriogênicas. Desde então, a embriogênese somática tem sido amplamente investigada em diversas espécies vegetais, tornando-se uma ferramenta essencial tanto para estudos fundamentais do desenvolvimento vegetal quanto para programas de propagação e melhoramento em larga escala (Fehér, 2019; Pais, 2019).

Entre os fatores moleculares que regulam a embriogênese somática, as modificações epigenéticas e as vias hormonais destacam-se como elementos centrais na aquisição da competência embriogênica. A metilação do DNA desempenha um papel fundamental no controle da expressão gênica, modulando a plasticidade celular necessária para a reprogramação celular. Estudos em diversas espécies têm associado alterações nos padrões de metilação do DNA à indução e manutenção da embriogênese somática (Grzybkowska et al., 2020; Nic-Can & De La Peña, 2014; Sivanesan et al., 2022).

Estudos, como os de Karami et al., (2023) e Wójcik et al., (2025) em *Arabidopsis thaliana*, indicam que a reprogramação somática e a formação de embriões dependem de uma integração precisa entre a sinalização hormonal e os mecanismos de controle regulatório, particularmente aqueles relacionados ao metabolismo, transporte e resposta à auxina. Evidências demonstram que a biossíntese e o transporte endógenos de auxina contribuem para a manutenção da identidade embriogênica e para o desenvolvimento adequado dos embriões somáticos, embora a aquisição inicial da identidade embriogênica possa ocorrer

sob níveis relativamente baixos de auxina, sendo a produção localizada e o estabelecimento de gradientes desse hormônio críticos nas fases posteriores de crescimento e diferenciação (Karami et al., 2023). Além disso, fatores regulatórios como WOX5 conectam processos mediados por auxina a redes gênicas centrais da embriogênese somática, reforçando o conceito de que a totipotência vegetal emerge da convergência entre a sinalização hormonal e os mecanismos de controle genético e epigenético (Wójcik et al., 2025).

Em *Carica papaya* L., a contribuição desse mecanismo nas fases iniciais da reprogramação celular ainda é pouco compreendida. Nesse contexto, moduladores epigenéticos como a 5-azacitidina (agente hipometilante) e a hidroxiureia (associada a respostas compensatórias de metilação) têm sido utilizados como ferramentas experimentais para investigar o papel da metilação do DNA na aquisição da competência embriogênica (Loschiavo et al., 1989). A regulação epigenética, atua em associação com as vias hormonais que controlam o desenvolvimento vegetal. Auxinas, citocininas e ácido abscísico desempenham papéis cruciais na indução e maturação de embriões somáticos, e evidências crescentes indicam que a metilação do DNA modula a expressão de genes responsivos a esses sinais hormonais (Bennett et al., 2021; Li et al., 2022; Yamamuro et al., 2016). Além disso, estudos proteômicos têm revelado variações significativas em proteínas relacionadas à sinalização, respostas ao estresse e remodelamento da cromatina ao longo da embriogênese somática (Botini et al., 2021; Fortini et al., 2023; Vale et al., 2022). Apesar desses avanços, estudos integrativos que conectam as camadas epigenética, hormonal e proteômica ainda são limitados, dificultando uma compreensão abrangente desse processo de desenvolvimento complexo.

C. papaya., uma espécie tropical de elevada relevância econômica e biotecnológica, é amplamente utilizada tanto para consumo *in natura* quanto nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Embora os estádios morfológicos da embriogênese somática tenham sido bem descritos (Vale et al., 2018), os mecanismos moleculares que integram a metilação do DNA, a sinalização hormonal e a regulação proteômica permanecem pouco elucidados. Considerando o potencial de *C. papaya* como modelo para o estudo da

plasticidade celular e da reprogramação embriogênica, a elucidação dessas interações é essencial para o aprimoramento de estratégias de regeneração *in vitro* e para o suporte a programas de melhoramento genético.

O presente estudo teve como objetivo investigar a influência dos moduladores epigenéticos 5-azacitidina (5-AzaC) e hidroxureia (HU), aplicados durante o ciclo final de multiplicação, sobre a aquisição da competência embriogênica e morfogênese embriogênica de *C. papaya*, utilizando uma abordagem analítica integrada que abrangeu perfis de metilação global do DNA, proteômica e quantificação de hormônios vegetais endógenos. Ao correlacionar alterações epigenéticas, hormonais e proteômicas, este estudo buscou esclarecer como esses níveis regulatórios contribuem para a embriogênese somática, fornecendo bases conceituais e aplicadas para a otimização de protocolos de regeneração *in vitro* e o fortalecimento de estratégias biotecnológicas para o melhoramento de *C. papaya*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O mamoeiro: importância produtiva, desafios e perspectivas biotecnológicas

O mamoeiro (*Carica papaya* L.), pertencente à família Caricaceae, é uma das principais frutíferas tropicais cultivadas mundialmente, possuindo grande importância econômica e social. No cenário mundial, o mamão é uma das principais frutas tropicais comercializadas, com previsão de crescimento médio anual de 1,9% e produção global estimada em 17 milhões de toneladas para 2034 (OECD, 2025). No ano de 2023 Índia, República Dominicana, Indonésia, México e Brasil destacaram-se como os maiores produtores, sendo a Índia responsável por mais de 35% da produção mundial (FAO, 2025). Os principais importadores de mamão são os Estados Unidos, que representam cerca de 61% das importações mundiais, e a União Europeia, com aproximadamente 9% do total global em 2024 (OECD, 2025). O comércio internacional permanece limitado pela alta perecibilidade dos frutos, contudo, melhorias nas tecnologias de pós-colheita e transporte têm ampliado significativamente o alcance e a viabilidade comercial do mamão (Pigozzi et al., 2021; Zou et al., 2014).

Em 2024, a produção nacional atingiu 1,149 milhão de toneladas, representando um crescimento de 0,95% em relação ao ano anterior (IBGE, 2025). A cultura está concentrada principalmente nos estados do Espírito Santo, Bahia e Ceará, que juntos responderam por mais de 70% da produção brasileira no ano de 2024 (IBGE, 2025). Neste mesmo ano o Espírito Santo destacou-se como o maior produtor, com 398 mil toneladas colhidas em 6.731 hectares (ha^{-1}), apresentando rendimento médio de 59.143 kg ha^{-1} (IBGE, 2025). A cadeia produtiva do mamoeiro brasileiro é diversificada, envolvendo desde o consumo *in natura* até a industrialização em sucos, doces e conservas, agregando valor e gerando milhares de empregos diretos e indiretos, especialmente em pequenas e médias propriedades (De Mendonça et al., 2017).

A modernização do setor produtivo está ligada ao surgimento de cultivares registradas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com os grupos Solo ('Golden', 'Improved Sunrise Solo') e Formosa ('Tainung nº 1', 'Tainung nº 2', 'Calimosa', 'Rubi') sendo predominantes, cada qual com características de porte, coloração e mercado distintos (MAPA, 2024; EMBRAPA, 2024). O melhoramento genético intensificado desde a década de 1980 resultou em variedades mais produtivas e resistentes, adequadas às demandas dos mercados interno e externo (Bispo, 2024; Lucena, 2021)

No Brasil, destaca-se o programa de melhoramento genético do mamoeiro conduzido pela UENF em parceria com a Caliman Agrícola S.A., considerado o principal programa nacional da cultura, responsável pelo desenvolvimento de diversos híbridos comerciais desde 1996. Entre esses, o híbrido 'UENF/Caliman 01' ('Calimosa') foi o primeiro híbrido brasileiro de mamão do grupo Formosa, amplamente adotado em sistemas produtivos, com elevada produtividade e qualidade de frutos (Gonzaga Pereira et al., 2020). O programa continua ativo e tem gerado novos híbridos com base em estratégias que integram melhoramento clássico e ferramentas moleculares, visando ampliar a base genética e reduzir a dependência de sementes importadas (Barboza Bispo, 2024; Pereira et al., 2025; Vettorazzi et al., 2021)

O mamoeiro é uma cultura trioica (plantas masculinas, femininas e hermafroditas) (Figura 1), cujo cultivo comercial favorece hermafroditas por

apresentarem frutos com formato, sabor e rendimento comercial mais adequados. Dessa forma, os custos de produção se tornam onerosos pela dependência do agricultor em manter um maior número de plantas por hectare para, após o início do florescimento, realizar a sexagem das flores para manter apenas plantas hermafroditas na lavoura (Schmildt et al., 2019; Salinas et al., 2018)

Assim sendo, a micropropagação por embriogênese somática é uma alternativa potencial à propagação seminífera de mamoeiro. Esse processo permite a produção clonal em larga escala de plântulas derivadas de embriões somáticos, possibilitando a aplicação de tecnologias de transformação genética e se tornar um diferencial na cultura do mamoeiro, com essas tecnologias será possível a produção de grande quantidade de mudas com alto padrão genético e fitossanitário (Figura 2).

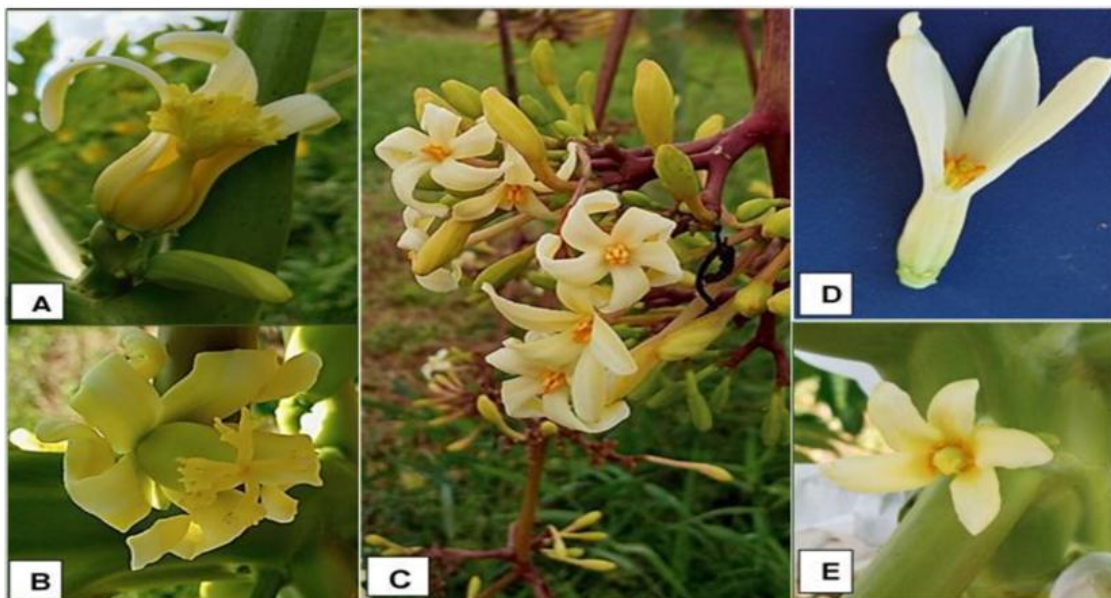


Figura 1. Tipos florais do mamoeiro. Flor pistilada ou feminina (A, B); flor estaminada ou masculina (C); flor hermafrodita (D, E). Fotos: Naiane Silva (2021).

genética e criação de mudas livres de patógenos (Aslam et al., 2011; Yildiz et al., 2011; Elhiti et al., 2013; Heringer et al., 2018; Cipriano et al., 2018).

O primeiro relato de embriogênese somática em *C. papaya*, foi descrito por Bruijne et al., (1974) utilizando pecíolos como fonte de explantes e as primeiras plântulas somáticas foram regeneradas a partir de explantes de entrenós (Yie & Liaw, 1977). Após estes resultados, diversos trabalhos foram realizados com diferentes tipos de explantes e concentrações de reguladores de crescimento vegetal com o interesse em estabelecer um protocolo eficiente para a embriogênese somática em *C. papaya*, porém estes protocolos apresentam limitações devido às inúmeras variáveis que devem ser reguladas durante o processo, incluindo os níveis endógenos de hormônios vegetais, proteínas e fatores genéticos e epigenéticos (Joshi & Kumar, 2013).

Recentemente, as tecnologias proteômicas têm desempenhado papel central na elucidação dos mecanismos moleculares que regulam a embriogênese somática em *C. papaya*, permitindo a identificação de vias bioquímicas, metabólicas e regulatórias associadas à aquisição e manutenção da competência embriogênica. Estudos pioneiros, como o de Heringer et al. (2018), demonstraram que a transição de calos não embriogênicos para calos embriogênicos envolve profundas alterações no metabolismo energético, na resposta ao estresse e na dinâmica de proteínas associadas à totipotência celular.

Posteriormente, Botini et al., (2021) demonstraram que o desenvolvimento dos embriões somáticos envolve uma regulação proteica altamente coordenada entre os diferentes estádios embriogênicos, com predominância de proteínas ribossomais e mitocondriais nos estádios iniciais, associadas à intensa atividade metabólica, e proteínas relacionadas à maturação de sementes nos estádios avançados, refletindo a preparação para a germinação.

Expandindo essas evidências, Vale et al., (2022) propuseram um dos modelos mais abrangentes para explicar a aquisição da competência embriogênica em *C. papaya*, integrando dados de proteômica mitocondrial, histomorfologia, histoquímica, respiração celular, conteúdo hormonal e níveis de H_2O_2 . O modelo destaca o papel central da bioenergética mitocondrial, da

sinalização oxidativa e da regulação hormonal na determinação do destino celular, fornecendo bases para a compreensão dos mecanismos que distinguem calos embriogênicos e não embriogênicos.

Esses resultados reforçam que a ES no mamoeiro é um processo dinâmico, multietapas e regulado por complexos ajustes fisiológicos e moleculares. Da mesma forma, análises mais recentes, como as de Xavier et al., (2023), reforçaram que a indução da ES é um processo dinâmico e temporalmente regulado, envolvendo vias relacionadas ao metabolismo energético, regulação epigenética e resposta ao estresse. Esses estudos, em conjunto, reforçam que a competência embriogênica no mamoeiro emerge de uma complexa integração entre sinalização hormonal, atividade mitocondrial, proteínas reguladoras e mecanismos epigenéticos.

Além dos estudos diretamente focados na embriogênese somática, trabalhos complementares de proteômica em *C. papaya* têm contribuído para expandir o conhecimento sobre o repertório molecular da espécie e fornecer bases comparativas importantes para pesquisas em ES. Análises proteômicas direcionadas ao desenvolvimento floral, maturação de frutos e respostas a estresses bióticos e abióticos como demonstrado por Pereira Duarte et al., (2024) e outras contribuições recentes revelam padrões proteicos fundamentais para o entendimento da plasticidade fisiológica e do metabolismo global da espécie. Embora tais estudos não abordem diretamente a embriogênese somática, eles fornecem informações valiosas sobre vias metabólicas, proteínas estruturais e reguladores funcionais que são frequentemente compartilhados em processos de reprogramação celular, permitindo ampliar a interpretação dos resultados obtidos no contexto da ES. Assim, os avanços complementares da proteômica no mamoeiro fortalecem a construção de modelos integrativos e oferecem suporte para a identificação de biomarcadores embriogênicos.

2.3 Papel da metilação do DNA na aquisição e expressão da competência embriogênica em plantas

A metilação do DNA desempenha um papel central na regulação do desenvolvimento vegetal, plasticidade celular, resposta a estresses e adaptação (Chen et al., 2013). Em plantas, esse mecanismo epigenético ocorre nos

contextos CG, CHG e CHH, sendo mediado por um conjunto de metiltransferases e vias regulatórias específicas. A metilação CG (mCG), geralmente a forma mais abundante no genoma vegetal (Bewick et al., 2017), é mantida principalmente pela METILTRANSFERASE 1 (MET1) (Du et al., 2015). A metilação CHG (mCHG) é mantida pela CROMOMETILASE 3 (CMT3), em associação com a histona H3 lisina 9 dimetilação (H3K9me2) (Du et al., 2014). Já a metilação CHH (mCHH) depende da ação de DOMÍNIOS METILTRANSFERASE 2 REARRANJADA (DRM2) e da via de metilação dirigida por RNA (RdDM), responsável pela regulação de transposons, reorganização cromatínica e silenciamento transcricional (Zemach et al., 2010).

Ajustes dinâmicos da metilação especialmente durante transições celulares são fundamentais para modular plasticidade, ativação gênica e remodelamento da cromatina. Por exemplo, Paz et al., 2025 destaca que padrões flexíveis de metilação CHH via RdDM são cruciais para reorganização epigenômica durante mudanças de identidade celular e regeneração, incluindo vias embriogênicas.

A relação entre metilação do DNA e embriogênese somática tem sido amplamente estudada ao longo da última década. A metilação atua de maneira decisiva na desdiferenciação, aquisição de totipotência, rediferenciação e estabelecimento da competência embriogênica, modulando a expressão de genes-chave durante o processo (Jahnke & Scholten, 2009; Song et al., 2015; Nic-Can et al., 2013). Em *Arabidopsis thaliana*, Grzybkowska et al., 2018 demonstraram que uma redução inicial da metilação global do DNA está associada à ativação de genes embriogênicos, acompanhada da regulação positiva de MET1 e CMT3 e da repressão de genes desmetilases como ROS1, DME e DML2, indicando que mudanças epigenéticas finas são essenciais para o reestabelecimento de um estado embriogênico. Estudos mais recentes reforçam que a diminuição da metilação especialmente em CHH associada ao RdDM funciona como um “gatilho” epigenético para liberar a plasticidade celular necessária à reprogramação (Lee et al., 2024a; Peng et al., 2025).

Estudos demonstram que a reconfiguração dinâmica da metilação do DNA é um mecanismo amplamente conservado durante a reprogramação celular e a embriogênese somática em plantas. Assim como observado inicialmente em

Coffea, análises genômicas realizadas em espécies tropicais e em diferentes modelos de regeneração revelam que uma redução precoce da metilação particularmente no contexto CHH, regulado pela via RdDM caracteriza as fases iniciais de indução, sendo seguida por um aumento progressivo nos estádios embrionários mais avançados (Chen et al., 2020; Osorio-Montalvo et al., 2020; Peng et al., 2023) Esse padrão, relatado em espécies como *Dimocarpus longan* e confirmado em sistemas regenerativos distintos, reforça a hipótese de que a hipometilação inicial atua como um gatilho epigenético que amplia a plasticidade celular necessária à reprogramação, enquanto a remetilação subsequente contribui para a estabilização do programa embrionário à medida que a estrutura tecidual se organiza (Lee et al., 2024b; Peng et al., 2023) Além disso, evidências atuais destacam o papel central de demetilases, como DEMETER, na remodelação do estado epigenético durante a transição entre aquisição de competência e diferenciação, corroborando que oscilações na metilação constituem um mecanismo regulatório fundamental na embriogênese vegetal (Lee et al., 2024b)

De forma complementar, (Osorio-Montalvo et al., 2018) mostraram que explantes com maior potencial embriogênico apresentam menor nível de metilação, reforçando a relação inversa entre metilação global, competência embriogênica e grau de diferenciação tecidual (Figura 3). O conjunto de evidências demonstra que a metilação do DNA é uma reguladora fundamental da embriogênese somática, atuando como mecanismo de controle da identidade celular, modulação da expressão gênica, silenciamento de transposons e estabilização do estado embrionário. Paz et al., 2025 e Carneros et al., 2024, reforçam que oscilações epigenéticas rápidas e transitórias são essenciais para o estabelecimento da competência, enquanto a remetilação subsequente consolida o programa embrionário.

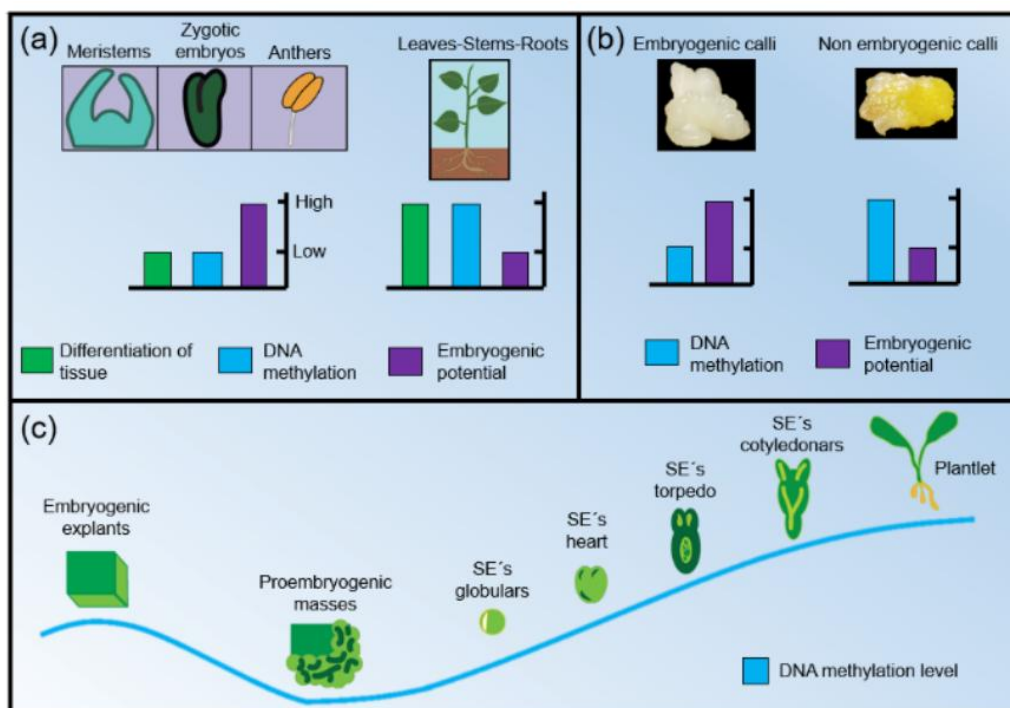


Figura 3. a) Relações entre níveis de diferenciação celular, metilação do DNA e potencial embriogênico entre diferentes tipos de tecidos vegetais utilizados como explantes; (b) diferença e potencial embriogênico entre calos embriogênicos e não embriogênicos; (c) dinâmica do DNA níveis de metilação em todo o processo SE (Osorio-Montalvo et al. 2018).

2.4 Efeitos da 5-azacitidina e da hidroxiureia na embriogênese somática: implicações epigenéticas e celulares

A 5-azacitidina é um análogo nucleotídico que se incorpora ao DNA e RNA durante a replicação. Quando presente no DNA, liga-se irreversivelmente às DNA-metiltransferases (DNMTs), causando sua inativação e, consequentemente, promovendo hipometilação global (Christman, 2002). (Chang et al., 2023).

Diversos estudos mostram que tratamentos com 5-AzaC favorecem a fase inicial da ES (Amritha et al., 2025; Carneros et al., 2024b; Osorio-Montalvo et al., 2020b). A hipometilação abre espaço para a expressão de genes, resultando em maior formação de calos embriogênicos ou massas proembriogênicas (Tomasiak et al., 2023). Em culturas de micrósporo, por exemplo, a 5-AzaC aumenta drasticamente a taxa de indução da embriogênese somática, indicando que a perda de metilação é um sinal permissivo para a reprogramação (Krzewska et al., 2021; Solís et al., 2015a).

Esse efeito positivo, entretanto, depende da dose e do tempo de exposição, concentrações elevadas ou tratamentos prolongados são citotóxicos e podem comprometer a viabilidade celular(Solís et al., 2015b; Yuan et al., 2025). Embora beneficie a indução, a 5-AzaC pode prejudicar etapas posteriores da ES(Solís et al., 2015b). Quando a hipometilação persiste, embriões apresentam anormalidades, crescimento reduzido, falhas de maturação e, em alguns casos, necrose (Gao et al., 2023; Solís et al., 2015b).

A hidroxiureia (HU) atua primariamente como inibidora da ribonucleotídeo redutase (RNR), enzima responsável pela síntese de desoxirribonucleotídeos (dNTPs)(Singh & Xu, 2016). O mecanismo envolve a neutralização do radical tirosil presente na subunidade R2 da RNR, levando à inativação da enzima e à redução dos pools de dNTPs, isso resulta em parada do ciclo celular na fase S e estresse replicativo(Musiałek & Rybaczek, 2021). Esse atraso replicativo interfere no processo de cópia das marcas epigenéticas, podendo resultar em alterações na metilação global ou em regiões específicas do genoma (Žabka et al., 2023).

A HU induz estresse replicativo ao bloquear a progressão da forquilha de replicação, o que pode prejudicar a reciclagem e a deposição adequada de histonas e suas modificações, além de afetar a manutenção das marcas epigenéticas(Clément et al., 2018; Mustafa & Krämer, 2021; Zhu et al., 2021). Esse atraso pode comprometer a atuação coordenada das DNA metiltransferases (DNMTs) e de remodeladores de cromatina, essenciais para a cópia fiel das marcas epigenéticas durante a duplicação do DNA (Clément et al., 2018; Mustafa & Krämer, 2021; Zhu et al., 2021). Por exemplo, HU prejudica a reciclagem de histonas H3.1 e H3.3, impactando a transmissão de marcas como metilação e acetilação (Clément et al., 2018; Mustafa & Krämer, 2021). Além disso, HU pode alterar a trimetilação de H3K14 via SETD2, modificando a resposta ao estresse replicativo e a organização da cromatina (Mustafa & Krämer, 2021; Zhu et al., 2021).

Embora a HU não modifique diretamente DNMTs, alterações no ciclo celular podem influenciar a dinâmica de SAM/SAH(Mentch et al., 2015; Zhang, 2018). Foi observado que um aumento no nível de SAM é necessário para facilitar um aumento nos processos de consumo de SAM que são necessários

para o desenvolvimento de embriões somáticos, então a disponibilidade de SAM pode ser necessária para a aquisição do potencial embriogênico e, posteriormente, para o controle do desenvolvimento embrionário (Munksgaard et al., 1995).

2.5 Efeitos dos Reguladores de Crescimento Vegetal (PGRs) na Metilação do DNA na Competência Embriogênica

Compostos químicos suplementados ao meio de cultura, especialmente regulador de crescimento vegetal, são conhecidos por induzir modificações nos níveis globais de metilação do DNA (GDM), o que pode afetar o fenótipo e/ou potencial embriogênico (Baklouti et al., 2022; Martins et al., 2024). Mudanças específicas no GDM em plantas estão relacionados com a fase de desenvolvimento, bem como com a capacidade morfogênica *in vitro* (Martins et al., 2024). Na morfogênese *in vitro*, processos de diferenciação e desdiferenciação, bem como a divisão celular, são seguidos por metilação e eventos de desmetilação no DNA genômico tecido-específico (Montalvo et al. 2018).

As auxinas, principalmente o 2,4-D, é o regulador de crescimento vegetal mais utilizado para induzir a embriogênese somática, porém pode produzir alterações epigenéticas e genéticas nas células, como metilação e mutações no DNA, respectivamente (de Moraes Oliveira et al., 2023; Grzybkowska et al., 2020; Wójcikowska et al., 2020). Diversos estudos mostram que auxinas, especialmente em concentrações elevadas, aumentam os níveis de metilação do DNA em culturas embriogênicas de diferentes espécies vegetais (De-la-Peña et al., 2015; Markulin et al., 2021; Wójcikowska et al., 2020). Por exemplo, em *Arabidopsis thaliana*, o tratamento com 2,4-D (5,0 μ M) induz hipermetilação estável nas regiões promotoras de genes reguladores da embriogênese somática, sendo esse efeito dependente da concentração de auxina (Grzybkowska et al., 2020). Em *Daucus carota*, a metilação global do DNA pode variar de 15% a 70% conforme a concentração de auxina, sem afetar o crescimento celular, enquanto citocininas não apresentam esse efeito (Loschiavo et al., 1989). O tipo de auxina também influencia, 2,4-D promove maior metilação do que NAA ou IAA em concentrações equivalentes (De-la-Peña et al., 2015).

Estudos mostram que o 2,4-D, uma auxina sintética, altera a metilação global do DNA durante a embriogênese somática, influenciando os níveis de S-adenosilmetionina (SAM) e S-adenosilcisteína (SAH). Em cenoura, o desenvolvimento de embriões somáticos está associado a um aumento significativo de SAM, SAH e do índice de metilação (razão SAM/SAH), sugerindo que o acúmulo desses metabólitos está ligado ao controle da metilação do DNA e à progressão embrionária (Fraga et al., 2012; Loschiavo et al., 1989; Nic-Can & Loyola-Vargas, 2016; Zluvova et al., 2001).

Nesse sentido, para melhorar nossa compreensão desse mecanismo, nosso objetivo é descrever os níveis de metilação global do DNA na regulação do proteoma em culturas embriogênicas de *C. papaya* durante diferentes etapas da ES. Além disso, buscamos determinar se a alteração dos níveis de metilação do DNA pode causar mudanças em sua morfogênese *in vitro* e sua competência embriogênica. Para este fim, foram utilizados agentes hipometilante (5-azacitidina; 5-AzaC) e hipermetilante (hidroxiureia, HU) associado ou não a suplementação de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4D). No caso do 5-AzaC, é uma substância que tem sido utilizada em vários protocolos de ES para diferentes espécies de plantas, indicando que a desmetilação do DNA promove a reprogramação da expressão gênica, aquisição de totipotência e início da embriogênese em micrósporos. Porém a diferenciação embrionária provavelmente requer níveis mais altos de metilação de DNA de novo para adquirir um padrão específico de expressão gênica (Osorio-Montalvo et al., 2018).

A HU atua inibindo a atividade da ribonucleotídeo difosfato redutase, privando as células recém-sintetizadas de dNTPs e, conseqüentemente, impedindo a replicação do DNA (Singh & Xu, 2016). Em espécies vegetais, ainda há informações limitadas sobre o uso da HU, no entanto, Teyssier et al., (2014) observaram alterações em culturas embriogênicas de larício híbrido (*Larix eurolepis*) submetidas a esse composto, sugerindo seu efeito como agente hipermetilante.

OBJETIVOS

2.6 Objetivo Geral

Investigar como a modulação epigenética induzida pela 5-AzaC e a HU influencia a manutenção e a expressão da competência embriogênica em *Carica papaya* L., integrando análises de metilação global do DNA, perfil hormonal e dados proteômicos para compreender os mecanismos celulares e moleculares que regulam a embriogênese somática na espécie.

2.7 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da suplementação de 5-azacitidina e da hidroxureia na indução e no desenvolvimento da embriogênese somática em *Carica papaya*;
- Quantificar os níveis de metilação global do DNA durante a embriogênese somática sob influência de 5-AzaC e HU;
- Investigar a correlação entre metilação global, perfis hormonais e competência embriogênica;
- Analisar as alterações proteômicas associadas à reprogramação celular induzidas por 5-AzaC e HU.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e indução de calos

As culturas embriogênicas foram estabelecidas conforme descrito por Vale et al. (2018). Frutos maduros de *C. papaya* L. cv. Golden, foram inicialmente higienizados em água corrente com sabão neutro, seguidos de imersão em etanol a 70% (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por dois minutos e, posteriormente, em solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo; Qboa®, Anhembí AS, Osasco, SP, Brasil) por 30 minutos. Após a desinfestação, os frutos foram enxaguados três vezes com água tipo II autoclavada (filtrada por osmose reversa e deionizada).

Para a indução de calos, embriões zigóticos foram isolados de sementes maduras e inoculados em placas de Petri (90 × 15 mm) contendo meio de cultura composto por sais basais e vitaminas do MS (Murashige & Skoog, 1962)

(Phytotechnology Lab, Lenexa, KS, EUA), suplementado com $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose (Vetec, São Paulo, SP, Brasil), $20 \text{ }\mu\text{M}$ de 2,4-D (Sigma-Aldrich) e $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Phytigel® (Sigma-Aldrich). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. As placas contendo os embriões inoculados foram mantidas em câmaras de crescimento a $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, no escuro, por 45 dias.

Durante a fase de multiplicação, os calos induzidos foram subcultivados três vezes, sendo cada ciclo com duração de 21 dias. Os subcultivos foram mantidos em meio de cultura com composição idêntica à utilizada na fase de indução. No terceiro ciclo de multiplicação, dois suplementos foram incorporados ao meio. Os tratamentos consistiram na adição de $5 \text{ }\mu\text{M}$ de 5-azacitidina (5-AzaC) (Sigma-Aldrich), e $5 \text{ }\mu\text{M}$ de hidroxureia (HU) (Sigma-Aldrich). Ambos os compostos foram previamente dissolvidos em DMSO e submetidos à esterilização por filtração ($0,22 \text{ }\mu\text{m}$), sendo adicionados ao meio de cultura após a autoclavagem e resfriamento ($\sim 40\text{--}50 \text{ }^{\circ}\text{C}$), a fim de preservar sua estabilidade química.

Os calos embriogênicos foram coletados em tempos definidos, visando à avaliação da progressão do desenvolvimento. A coleta no dia 0 (zero) correspondeu ao final da segunda fase de multiplicação, sendo considerada o ponto basal do experimento. Coletas subsequentes foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias durante a terceira fase de multiplicação, seguidas de uma coleta final aos 35 dias, após 14 dias de cultivo em meio de maturação de embriões somáticos (Figura 4).

Para a análise de metilação global do DNA (GDM), coletas adicionais foram realizadas nos dias 1, 3 e 5 após o início dos tratamentos, com o objetivo de capturar alterações epigenéticas precoces.

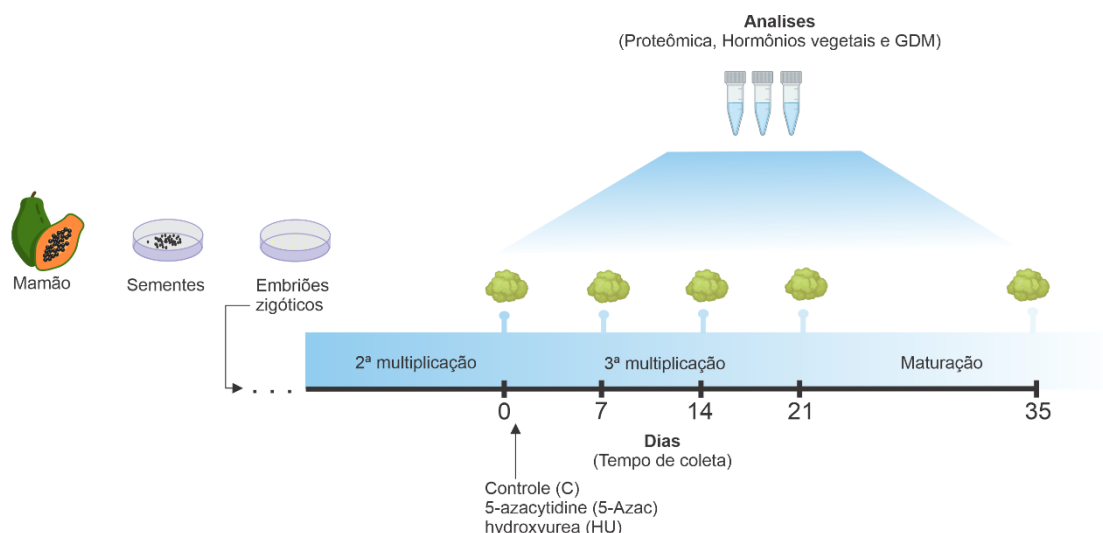


Figura 4. Representação dos pontos de coleta ao longo dos estádios de desenvolvimento dos calos embriogênicos em *Carica papaya L.*, incluindo os tempos e as análises realizadas.

3.2 Maturação das culturas embriogênicas

Após a fase de multiplicação, as culturas foram transferidas para o meio de maturação, conforme descrito por Vale et al., (2018). O meio MS foi suplementado com $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mio-inositol (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), 6% de polietilenoglicol (PEG 3350, Sigma-Aldrich) como agente osmótico e $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Phytigel®. O pH foi ajustado para 5,8 e o meio autoclavado a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento a $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, no escuro, por sete dias. Em seguida, foram mantidas a $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sob fotoperíodo de 16 horas, utilizando iluminação GreenPower TLED 20-W WmB (Koninklijke Philips Electronics NV, Amsterdã, Países Baixos) com intensidade luminosa de $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante 28 dias, conforme descrito por Almeida et al. (2019).

O número de embriões somáticos em cada estágio de desenvolvimento (globular/torpedo, coração e cotiledonar) foi determinado no 28º dia utilizando estereomicroscópio acoplado a uma câmera digital Axiocam ERc5s 0,5× (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As contagens foram realizadas em 10 repetições biológicas, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri contendo quatro calos.

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância bifatorial (two-way ANOVA), considerando os fatores tratamento e tempo de cultivo, bem como a interação entre eles. Quando observadas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Todas as análises foram conduzidas no software RStudio (R Core Team, 2025).

3.3 Análise global da metilação do DNA (GDM)

3.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com (Doyler & Doyler, 1987), com modificações. Para cada tratamento (controle, 5 μ M 5-AzaC e 5 μ M HU), as amostras foram preparadas utilizando cinco repetições biológicas em cada tempo de coleta (0, 1, 3, 5, 7 e 14 dias). Um total de 200 mg de material fresco foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para microtubos de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 700 μ L de tampão de extração contendo 7% CTAB (Sigma–Aldrich), 5 M NaCl, 0,5 M EDTA (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), 1 M Tris–HCl (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia), pH 8,0, 2% polivinilpirrolidona (Sigma–Aldrich) e 3% β -mercaptoetanol (Sigma–Aldrich).

Após a adição do tampão, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 65 °C em termomixer a 400 rpm. Posteriormente, foram adicionados 650 μ L de clorofórmio–álcool isoamílico (24:1) (Merck Millipore), seguido de homogeneização suave por inversão durante 10 minutos e centrifugação a 10.000 rpm por 9 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, sendo adicionados 200 μ L de tampão de extração e 650 μ L de clorofórmio–álcool isoamílico, seguidos de agitação por inversão durante 5 minutos. Após centrifugação a 10.000 rpm por 9 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo.

O DNA foi precipitado com 500 μ L de isopropanol (Merck Millipore) por 30 minutos a –80 °C. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 9 minutos a 4 °C para formação do pellet, sendo o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado três vezes com 250 μ L de etanol 70% (Sigma–Aldrich), seguido de secagem a 37 °C por 1 hora para completa evaporação do álcool. Posteriormente, o pellet foi ressuspensionado em 100 μ L de tampão TE (10 mM

Tris–HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific).

3.3.2 Digestão de ácidos nucleicos

A digestão dos ácidos nucleicos foi realizada conforme protocolo previamente estabelecido por da Paschoa et al., (2026), com modificações. As digestões com RNase foram realizadas utilizando 50.000 ng de ácidos nucleicos em tampão TE. As amostras foram aquecidas a 65 °C por 5 minutos para desnaturação e incubadas a 4 °C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 5 µL de ribonuclease A (Sigma-Aldrich) ($1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) e 5 µL de ribonuclease T1 (Sigma-Aldrich) ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), seguido de vórtex e incubação a 37 °C por 17 horas.

Após a digestão, foram adicionados 10 µL de acetato de sódio (3 M, pH 5,4) (Sigma-Aldrich). O DNA e o RNA resistentes às ribonucleases foram precipitados com 68 µL de isopropanol gelado (Merck Millipore) por 30 minutos a –20 °C. As amostras foram centrifugadas a 5.000 g por 10 minutos para formação do pellet, lavadas com etanol 70% (v/v) e novamente centrifugadas a 5.000 g por 5 minutos. Os pellets foram secos à temperatura ambiente e ressuspensos em 50 µL de água grau MS (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, EUA).

As digestões com nuclease P1 e fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) foram realizadas utilizando 50 ng de ácido nucleico em água grau MS. Os ácidos nucleicos foram desnaturados a 100 °C por 2 minutos e incubados a 4 °C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 2,5 µL de ZnSO_4 10 mM (Sigma-Aldrich) e 5 µL de nuclease P1 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japão) ($1,0 \text{ U mL}^{-1}$ em 30 mM NaOAc, pH 5,4), seguidos de vórtex e incubação a 37 °C por 17 horas.

Após esse período, foram adicionados 5 µL de Tris–HCl 0,5 M (pH 8,3) e 5 µL de fosfatase alcalina (10 U mL^{-1} em 2,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), seguidos de incubação por 2 horas a 37 °C. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos, sendo o sobrenadante coletado para injeção nas análises posteriores.

3.3.3 UPLC e espectrometria de massas

Os dNTPs resultantes foram separados por cromatografia líquida e identificados por espectrometria de massas operando no modo MRM, conforme

descrito por da Paschoa et al. (2026). A separação dos dNTPs foi realizada em um sistema Acquity UPLC I-Class FTN (Waters), utilizando uma alíquota de 10 μL injetada em coluna Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm (2,1 mm $\times$ 50 mm) (Waters), mantida a 40 $^{\circ}\text{C}$, com fluxo de 300 $\mu\text{L min}^{-1}$. O gradiente binário consistiu em água grau LC-MS contendo 0,01% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich) e metanol grau LC-MS (Merck) contendo 0,01% de ácido fórmico como fase móvel. O gradiente de eluição iniciou-se com 100% de água, reduzindo para 95% ao longo de cinco minutos, seguido de redução para 5% no minuto subsequente, permanecendo nessa condição por um minuto, retornando a 100% em um minuto e sendo mantido por dois minutos para reequilíbrio da coluna, totalizando 10 minutos de corrida.

A espectrometria de massas foi realizada por ionização por eletrospray (ESI) de alto desempenho com fonte Z-spray ortogonal dupla (Waters), acoplada a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo Xevo TQ-XS (Waters). Foi utilizada nebulização pressurizada com gás nitrogênio a 2,8 bar, fluxo de dessolvatação de 550 L h^{-1} e fluxo de cone de 150 L h^{-1} . A temperatura do gás de dessolvatação foi ajustada para 500 $^{\circ}\text{C}$, a temperatura da fonte para 150 $^{\circ}\text{C}$ e a voltagem do capilar para 2,8 kV. O gás argônio foi empregado como gás de colisão, com pressão de 0,8 kgf cm^{-2} e fluxo de 0,15 mL min^{-1} na célula de colisão.

O espectrômetro operou no modo multiple reaction monitoring (MRM), com voltagem de cone de 20 V e energia de colisão de 4 eV. A identificação de cada nucleosídeo foi realizada com base nas transições específicas dos íons fragmentos MH^{+} (5mdC: 242/126; 5hmdC: 258/142; dC: 228/112; dG: 268/152; dA: 252/136; dT: 243/127 m/z).

3.3.4 Processamento de dados

O software MassLynx versão 4.2 (Waters) foi utilizado para o processamento dos cromatogramas. Após a aquisição, os espectros foram integrados e as linhas suavizadas com duas médias a cada dois escaneamentos. A área sob o pico de cada nucleosídeo foi estimada utilizando o software TargetLynx XS (Waters). As áreas foram convertidas em massa absoluta e a porcentagem de metilação foi calculada com base nas massas estimadas dos nucleosídeos. A conversão de área em massa foi realizada por meio de equações lineares obtidas a partir de

curva padrão com concentrações conhecidas (concentrações: 0,6; 1,2; 2,3; 4,7; 7,0; 9,4 e 11,7 ng para dC e 0,7; 1,5; 3,0; 5,9; 8,9; 11,9 e 14,8 ng para 5mdC), utilizando o kit 5-Methylcytosine & 5-Hydroxymethylcytosine DNA Standard Set (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, EUA).

A porcentagem de metilação foi determinada com base na razão entre as massas absolutas estimadas de 5-metilcitosina (5mdC) e citosina não modificada (dC). A metilação global do DNA (GDM, %) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$GDM (\%) = \frac{[mdC]}{[dC] + [mdC]} \times 100$$

Em que [mdC] representa a massa da citosina metilada e [dC] a massa da citosina não modificada.

3.3.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) bifatorial para avaliar os efeitos dos tratamentos, dos tempos experimentais e da interação entre esses fatores. Para comparações múltiplas entre as médias, foi aplicado o teste Student–Newman–Keuls (SNK) ($p < 0,05$). Adicionalmente, o coeficiente de variação (CV) foi calculado para avaliar a dispersão dos dados.

Quando observada interação significativa entre os fatores, as comparações foram realizadas dentro de cada tempo experimental (comparação entre tratamentos em cada ponto de coleta: 0, 7 e 14 dias) e dentro de cada tratamento (comparação entre os tempos experimentais para cada tratamento: Controle, 5-azacitidina e hidroxiureia). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R (R Core Team, 2025).

3.4 Análise proteômica

3.4.1 Extração de proteínas e digestão trípica

Foram utilizadas três amostras biológicas de aproximadamente 300 mg para cada tratamento (controle, 5 μ M 5-AzaC e 5 μ M HU) em cada tempo de coleta (7, 14, 21 e 35 dias). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido utilizando almofariz e pistilo, sendo posteriormente misturadas com 1 mL de

tampão de extração Ureia/Tiourea (composto por 7 M ureia (GE Healthcare, Freiburg, Alemanha), 2 M tiourea (GE Healthcare), 2% Triton X-100 (GE Healthcare), 1% ditioneitol (DTT, GE Healthcare) e 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF, Sigma-Aldrich). As amostras foram agitadas em vórtex por 30 minutos a 8 °C sob refrigeração, seguidas de centrifugação a 16.000 × g por 20 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes contendo as proteínas totais foram coletados, e a concentração proteica foi determinada utilizando o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich).

As proteínas foram precipitadas pelo método metanol/clorofórmio para remoção de compostos interferentes, conforme descrito por Nanjo et al., (2012). Em seguida, as amostras foram ressuspensas em solução contendo 7 M ureia e 2 M tiourea, após o que foi realizada digestão trípica das proteínas (1:100 enzima:proteína, V5111, Promega, Madison, WI, EUA) utilizando o método filter-aided sample preparation (FASP), conforme descrito por Wiśniewski et al., (2009), com modificações descritas em Botini et al., (2021). Os peptídeos foram secos a vácuo e solubilizados em 50 µL de solução contendo 5% (v/v) acetonitrila (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e 0,1% (v/v) ácido fórmico (Sigma-Aldrich) em água grau espectrometria de massas (MS) (Sigma-Aldrich). A concentração dos peptídeos foi estimada pela absorbância a 205 nm utilizando espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). Os peptídeos foram armazenados a -80 °C até as análises por espectrometria de massas.

3.4.2 Análise por espectrometria de massas e processamento dos espectros

Para a análise proteômica, foram utilizados 2 µg de peptídeos para aquisição dos espectros de massas, realizada em um sistema nanoAcquity UPLC M-Class (Waters, Manchester, Reino Unido) acoplado a um espectrômetro de massas SYNAPT G2-Si (Waters) para análise LC-ESI-MS/MS, conforme os parâmetros descritos por Xavier et al., (2023).

Os espectros foram analisados utilizando o software ProteinLynx Global SERVER (PLGS) versão 3.0.2 (Waters), empregando como banco de dados o proteoma de *C. papaya* ASGPBv0.4 disponível na base Phytozome (versão 11.0)

(<https://phytozome.jgi.doe.gov>). A quantificação label-free foi realizada utilizando o software IsoQuant versão 1.7 (Distler et al., 2014).

Apenas proteínas presentes nas três repetições biológicas ou ausentes (no caso de proteínas exclusivas) foram consideradas nas análises comparativas. As proteínas foram filtradas com base no teste t de Student ($p < 0,05$) e nos valores de fold change $\leq -0,585$ ou $\geq 0,585$, sendo classificadas, respectivamente, como proteínas com acúmulo reduzido ou aumentado (DAPs).

3.4.3 Análise de dados proteômicos

A anotação funcional das proteínas foi realizada por meio de uma combinação de abordagens automatizadas e manuais. A anotação funcional automatizada foi conduzida utilizando o software OmicsBox V3.0 (<https://www.biobam.com>), que integra ferramentas como BLAST, InterProScan e análise de enriquecimento de Gene Ontology (GO) para atribuição de categorias funcionais, domínios proteicos e vias metabólicas. A anotação manual foi posteriormente realizada utilizando o banco de dados UniProtKB (<https://www.uniprot.org>) para validação e refinamento dos resultados obtidos automaticamente.

Para as análises subsequentes, o conjunto de proteínas foi definido como o subconjunto de proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) identificadas como significativas em pelo menos uma das comparações pareadas entre tratamentos e/ou tempos experimentais.

Os ortólogos de *Arabidopsis thaliana* foram identificados utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). As sequências proteicas das DAPs selecionadas foram extraídas em formato FASTA utilizando o RStudio, e a busca BLASTp foi realizada contra o proteoma de *Arabidopsis* disponível na base STRING (<https://string-db.org>). Esse procedimento permitiu a identificação de domínios proteicos conservados e ortólogos funcionais, posteriormente utilizados nas análises downstream.

Para a análise de enriquecimento de processos biológicos, os ortólogos de *Arabidopsis* das DAPs foram analisados utilizando a ferramenta ShinyGO (Ge et al., 2020). Processos com valor de $p < 0,05$ foram considerados significativamente enriquecidos. Adicionalmente, a análise de agrupamento das

DAPs foi realizada utilizando o pacote Mfuzz (Kumar & Futschik, 2007) no software R (R Core Team, 2025), agrupando proteínas com base em seus padrões de acúmulo ao longo dos diferentes tempos experimentais.

Por fim, foram identificadas proteínas-alvo direta ou indiretamente associadas à embriogênese somática, à regulação epigenética e à biossíntese e sinalização de hormônios vegetais.

3.5 Extração e purificação de hormônios endógenos

A quantificação dos hormônios vegetais, ácido indol-3-acético (AIA), ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA) foi realizada conforme descrito por Durgbanshi et al., (2005), com modificações propostas por Vives-Peris et al., (2023). O conteúdo de fitormônios foi determinado em calos embriogênicos de *C. papaya* cultivados sob diferentes tratamentos (controle, 5-AzaC e HU) e em diferentes tempos de coleta (0, 7, 14, 21 e 35 dias).

Para cada amostra, foram pesados entre 20 e 50 mg de tecido liofilizado. A extração dos fitormônios foi realizada em 2 mL de água ultrapura utilizando um homogeneizador tipo moinho de bolas (MillMix 20, Domel Železniki, Eslovênia). Cada tubo de amostra recebeu uma solução padrão interno contendo hormônios marcados isotopicamente, incluindo 25 ng de [$^2\text{H}_6$]-ABA, [$^{13}\text{C}_6$]-SA, ácido dehidrojasmônico (DHJA) e 2,5 ng de [$^2\text{H}_5$]-AIA. Esses padrões internos foram utilizados para garantir a quantificação precisa dos hormônios nas amostras.

Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a $4000 \times g$ e 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado e o pH ajustado entre 2,8 e 3,2 com ácido acético 80%. O extrato aquoso foi então particionado duas vezes com 2 mL de éter dietílico (Fisher Scientific, Hampton, NH, EUA). A fase orgânica foi coletada e seca sob vácuo em concentrador centrífugo (Speed Vac, Jouan, Saint Herblain Cedex, França). Após a secagem, o pellet foi ressuscitado em 0,5 mL de solução metanol:água (10:90, v:v) e submetido a sonicação suave por 10 minutos.

A solução resultante foi filtrada através de membranas de PTFE de $0,22\ \mu\text{m}$ (Albert S.A., Barcelona, Espanha), diluída na proporção 1:3 (v:v) e diretamente injetada em um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado à

espectrometria de massas (Xevo TQ-S, Waters Corp., Milford, MA, EUA). As separações cromatográficas foram realizadas em coluna de fase reversa C18 (Luna Omega, 50 × 2,1 mm, tamanho de partícula 1,8 µm; Phenomenex, Torrance, CA, EUA) utilizando gradiente de acetonitrila e água ultrapura (ambos suplementados com 0,1% de ácido fórmico) com fluxo de 300 µL min⁻¹. Os fitormônios foram quantificados em espectrômetro de massas triplo quadrupolo equipado com fonte de ionização por eletrospray ortogonal Z-spray. Curvas padrão foram preparadas por meio da injeção de padrões comerciais dos hormônios no sistema UPLC-MS e utilizadas para quantificar as concentrações hormonais nas amostras. Os resultados representam a média de quatro repetições biológicas para cada tratamento, sendo processados utilizando o software MassLynx versão 4.2.

3.5.1 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) bifatorial para avaliar os efeitos dos tratamentos, dos tempos experimentais e da interação entre esses fatores. Quando observados efeitos significativos, as comparações múltiplas entre as médias foram realizadas utilizando o teste Student–Newman–Keuls (SNK) ($p < 0,05$). Adicionalmente, o coeficiente de variação (CV) foi calculado para avaliar a dispersão dos dados.

Quando houve interação significativa entre os fatores, as comparações foram realizadas dentro de cada tempo experimental (comparação entre tratamentos em cada ponto de coleta: 0, 7, 14, 21 e 35 dias; por exemplo, 7C, 7AZ, 7HU; 14C, 14AZ, 14HU; 21C, 21AZ, 21HU; 35C, 35AZ, 35HU) e dentro de cada tratamento (comparação entre os tempos experimentais para cada tratamento; por exemplo, Controle – 0, 7C, 14C, 21C, 35C; 5-azacitidina – 0, 7AZ, 14AZ, 21AZ, 35AZ; hidroxiiureia – 0, 7HU, 14HU, 21HU, 35HU). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software RStudio (R Core Team, 2025)

4. RESULTADOS

4.1 Influência do agente hipometilante na formação de embriões em *C. papaya*

O tratamento com 5-azaC aumentou o número de embriões no estágio globular em comparação aos tratamentos controle e HU. Em contraste, o tratamento controle apresentou maiores números de embriões nos estágios coração e cotiledonar. No entanto, não foram observadas diferenças significativas no número total de embriões entre os tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios do número de embriões globulares, em estágio de coração, cotiledonares e do total de embriões de *Carica. Papaya* L sob diferentes tratamentos, na concentração de 5 μ M. Os valores representam médias (n = 5). Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

Tratamentos	Globular/ Torpedo	Coração	Cotiledonar	Total de embriões
Controle	33.88b	32.50a	21.19a	87.57a
5-AzaC	84.69a	7.50b	4.56b	96.75a
HU	47.88b	14.94b	5.19b	68a

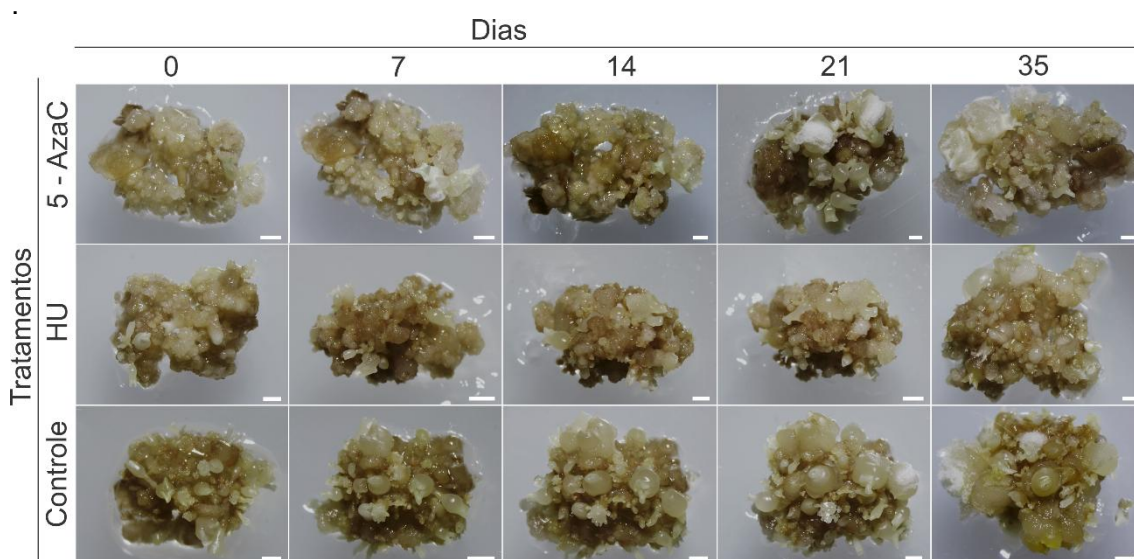


Figura 5. Desenvolvimento de calos embriogênicos de *Carica papaya* L. ao final da segunda fase de multiplicação (dia 0), ao longo da terceira fase de multiplicação (dias 7, 14 e 21) e durante o período de maturação dos embriões (dia 35), sob condições controle e na presença de hidroxureia (HU) e 5-azacitidina (5-AzaC). Barra de escala = 1 mm.

4.2 Metilação global do DNA (GDM)

A GDM apresentou variações associadas ao tempo de cultivo e aos tratamentos ao longo do experimento (Figura 6). O tempo 0 foi definido como condição basal, representando o período anterior à ação efetiva dos agentes moduladores da metilação, não sendo esperadas diferenças entre os tratamentos nesse ponto experimental. Após a exposição aos tratamentos, alterações nos níveis de GDM foram observadas durante o cultivo. Os tempos de 21 e 35 dias foram excluídos das análises subsequentes em decorrência da rápida degradação dos reagentes e da ausência de respostas consistentes aos tratamentos, permanecendo apenas os tempos de 0, 7 e 14 dias para as avaliações.

Aos 7 dias, o tratamento controle apresentou redução significativa da GDM, enquanto os tratamentos com 5-AzaC e HU exibiram níveis significativamente mais elevados em relação ao controle. Aos 14 dias, observou-se diminuição da GDM no tratamento com 5-AzaC, enquanto o tratamento com HU manteve os maiores valores de metilação global, diferindo significativamente tanto do controle quanto do 5-AzaC.

Em razão do aumento transitório da GDM observado no tratamento com 5-AzaC aos 7 dias, foi conduzido um experimento adicional com maior resolução temporal (dias 0, 1, 3, 5, 7 e 14) para caracterizar a dinâmica inicial da metilação global (Figura 7). Nesse experimento, o tratamento controle apresentou valores elevados de GDM nos dias 0 e 1, seguidos por redução significativa entre os dias 3 e 7, com recuperação parcial aos 14 dias. No tratamento com 5-AzaC, observou-se queda acentuada da GDM no dia 1, seguida por aumento gradual entre os dias 3 e 7 e posterior redução aos 14 dias.

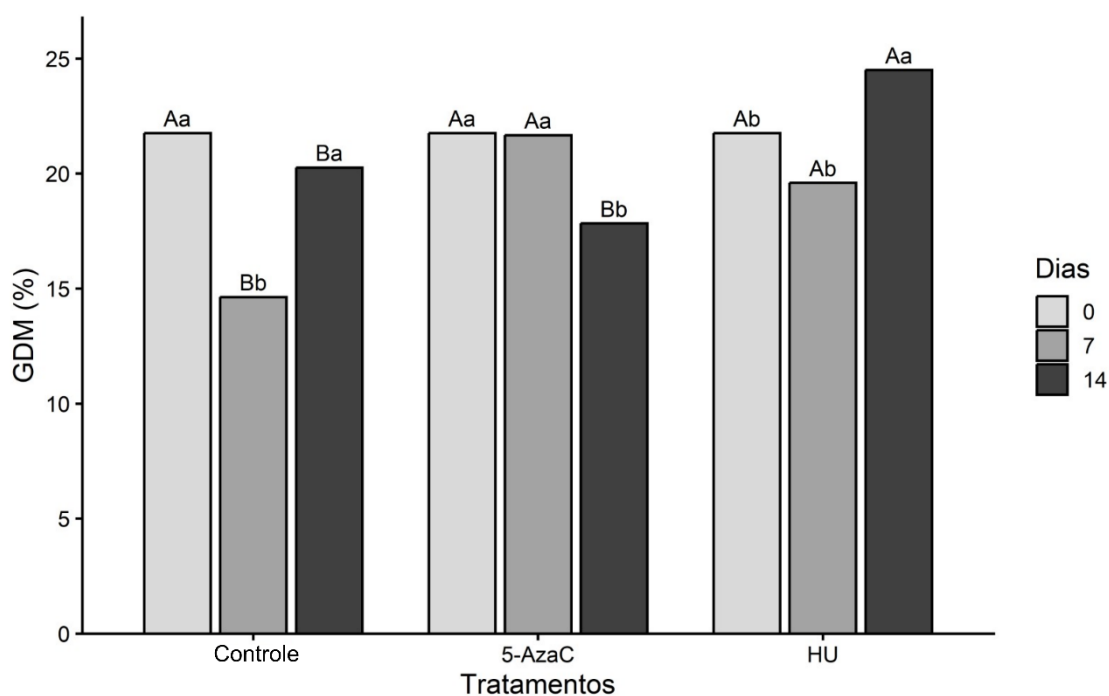


Figura 6. Níveis de metilação global do DNA (GDM %) em calos embriogênicos de *Carica papaya* L. submetidos aos tratamentos controle, 5-azacitidina (5-AzaC) e hidroximetilureia (HU) nos dias 0, 7 e 14 de cultivo *in vitro*. As barras representam a média $\pm$ erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Student–Newman–Keuls (SNK, $p \leq 0,05$). Letras minúsculas indicam comparações entre os dias dentro de cada tratamento, enquanto letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos dentro de cada dia. Coeficiente de variação (CV): Controle = 18.33%; 5-AzaC = 12.28%; HU = 10.87%.

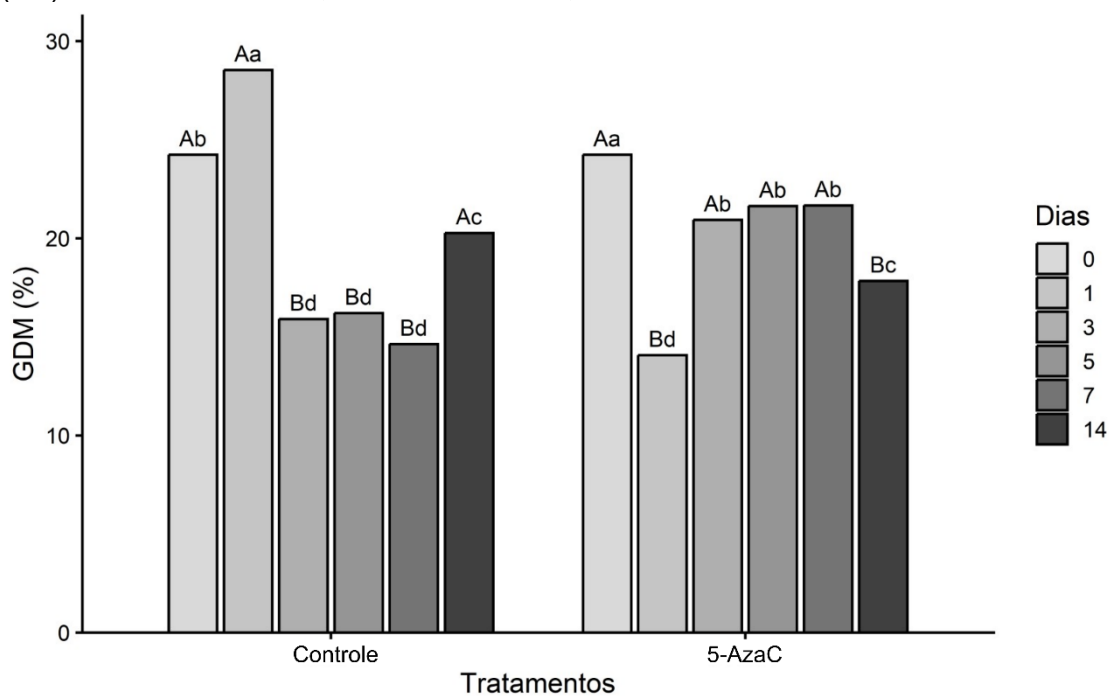


Figura 7. Dinâmica temporal da metilação global do DNA (GDM, %) em calos embriogênicos de *Carica papaya* L. submetidos aos tratamentos controle e 5-azacitidina (5-AzaC) nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 14 de cultivo *in vitro*. As barras representam a média $\pm$

erro padrão (SE). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Student–Newman–Keuls (SNK, $p \leq 0,05$). Letras minúsculas indicam comparações entre os dias dentro de cada tratamento, enquanto letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos dentro de cada dia. Coeficiente de variação (CV): Controle = 26.36%; 5-AzaC = 17.76%.

4.3 Quantificação de hormônios vegetais endógenos

Os pontos experimentais correspondentes aos 21 e 35 dias foram excluídos das análises hormonais devido à rápida degradação do material e à ausência de resposta consistente aos tratamentos nesses períodos, sendo consideradas, portanto, apenas as avaliações dos dias 0, 7 e 14.

O tempo 0 representou a condição basal do experimento, anterior à exposição efetiva aos tratamentos, não sendo esperadas diferenças nos níveis de IAA entre controle, 5-AzaC e HU nesse ponto experimental. Aos 7 dias, foi observado aumento significativo dos níveis de IAA em todos os tratamentos, mantendo-se elevados aos 14 dias. As comparações entre tratamentos dentro de cada tempo experimental não indicaram diferenças significativas, sugerindo um padrão temporal semelhante de acúmulo de auxina independentemente da condição aplicada (Figura 9a).

Os níveis de JA apresentaram variação dependente do tempo e do tratamento após o início das exposições experimentais. No tratamento com 5-AzaC, os valores observados aos 7 e 14 dias permaneceram semelhantes ao tempo basal, indicando relativa estabilidade ao longo do período avaliado. No controle, observou-se redução significativa aos 7 dias em relação ao tempo 0, seguida de recuperação aos 14 dias. No tratamento com HU, os níveis de JA aos 7 e 14 dias foram significativamente inferiores aos observados no tempo basal. As comparações entre tratamentos dentro de cada ponto temporal revelaram diferenças significativas principalmente aos 7 e 14 dias (Figura 9b).

Os níveis de SA apresentaram variação significativa ao longo do tempo dentro de cada tratamento, com aumento aos 7 dias em relação ao dia 0 e valores intermediários aos 14 dias. Em contraste, comparações entre tratamentos dentro de cada ponto temporal não revelaram diferenças significativas, indicando níveis semelhantes de SA entre controle, 5-AzaC e HU em todos os tempos avaliados (Figura 9c).

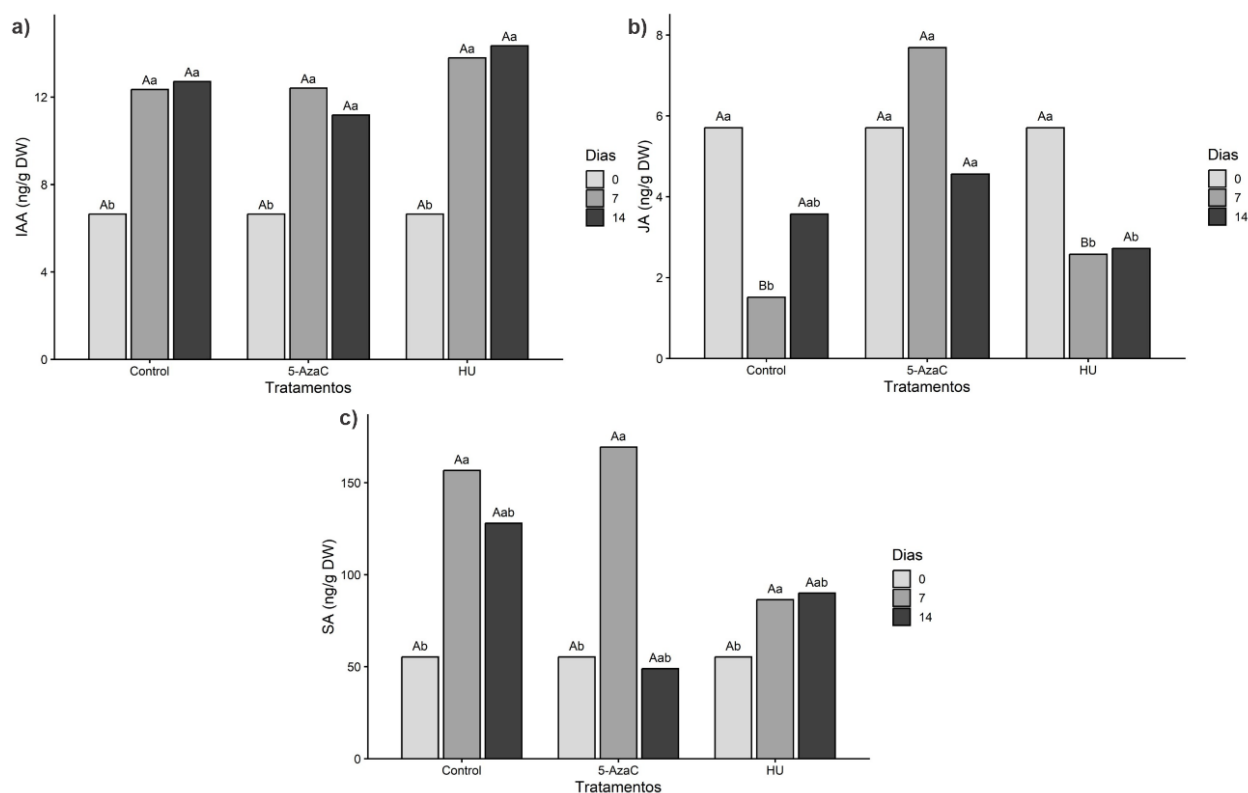


Figura 7. Teores de hormônios vegetais em calos embriogênicos de *Carica papaya* L. ao longo do tempo (0, 7, e 14 dias) sob os tratamentos controle (C), 5-azacitidina (5-AzaC) e hidroximetilureia (HU). (a) Ácido indol-3-acético (IAA); (b) ácido jasmônico (JA); (c) ácido salicílico (SA). As barras representam a média $\pm$ erro padrão (SE). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Student–Newman–Keuls (SNK, $p \leq 0,05$). Letras minúsculas indicam comparações entre os dias dentro de cada tratamento, enquanto letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos dentro de cada dia. Os teores hormonais estão expressos em ng g^{-1} de massa seca (DW). Coeficiente de variação (CV): IAA – C = 27,2%, 5-AzaC = 10,8%, HU = 4,7%; JA – C = 89,8%, 5-AzaC = 28,0%, HU = 21,0%; SA – C = 98,9%, 5-AzaC = 67,5%, HU = 14,8%.

4.4 Análise proteômica

Um total de 1.088 proteínas foi identificado (Anexo 1) na análise proteômica *bottom-up* de amostras coletadas aos 0, 7, 14, 21 e 35 dias durante a embriogênese somática. A influência do 5-AzaC e HU foi mais evidente nos estágios iniciais (7 e 14 dias), enquanto nos estágios posteriores (21 e 35 dias) não foram observadas diferenças consistentes entre os tratamentos. Em função disso, as análises subsequentes concentraram-se nos pontos temporais iniciais (0, 7 e 14 dias), que refletiram de forma mais clara os efeitos dos reagentes em estudo.

Nos tempos 0 e 7 dias, foram detectadas 1.060, 1.078, 1.063 e 1.073 proteínas nos tratamentos 0 dia, 7 dias no tratamento controle (7C), 7 dias no tratamento com 5-AzaC (7AZ) e 7 dias no tratamento com hidroxureia (7HU), respectivamente. Dentre essas, 1.041 proteínas foram compartilhadas entre os quatro tratamentos. Além disso, foram observadas proteínas exclusivas em cada condição: uma no tempo 0, duas no tratamento 7C, uma no 7AZ e duas no 7HU (Figura 10a).

Aos 14 dias, foram identificadas 1.074, 1.063 e 1.068 proteínas nos tratamentos 14 dias no tratamento controle (14C), 14 dias no tratamento com 5-AzaC (14AZ) e 14 dias no tratamento com hidroxureia (14HU), respectivamente. Desse conjunto, 1.048 proteínas foram comuns aos três tratamentos, enquanto proteínas exclusivas foram detectadas em 14C (três), 14AZ (duas) e 14HU (quatro) (Figura 10b).

As proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) foram agrupadas em sete *clusters* de expressão com base em seus *z-scores*, revelando padrões distintos de acumulação ao longo da embriogênese somática. O *Cluster 1* compreendeu 94 proteínas, o *Cluster 2* incluiu 32, o *Cluster 3* reuniu 40, o *Cluster 4* apresentou 15, o *Cluster 5* agregou 38, o *Cluster 6* continha 37 e o *Cluster 7* incluiu 94 proteínas, totalizando 350 proteínas agrupadas (Figura 10c). Dentro desses *clusters*, foram identificadas proteínas direta ou indiretamente associadas à embriogênese somática, à regulação hormonal e a vias epigenéticas em cada tratamento (Tabela 2).

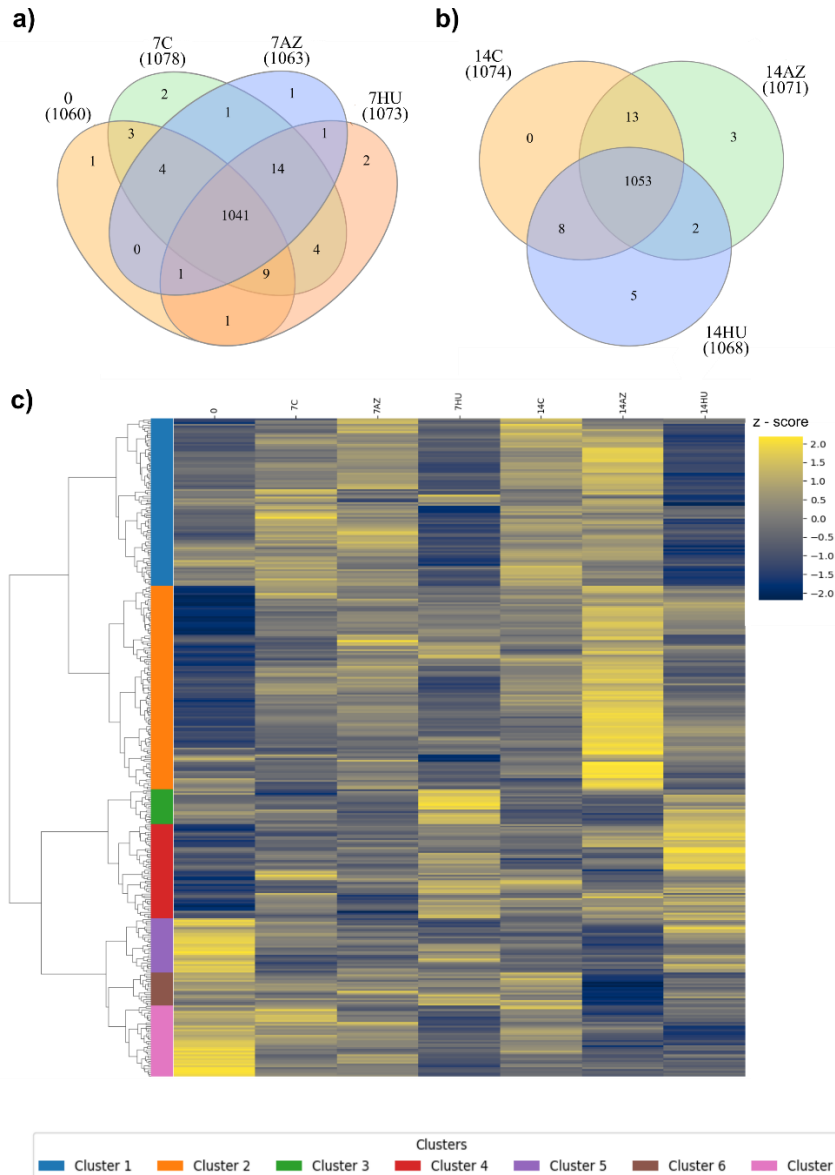


Figura 8. Análise proteômica diferencial durante a embriogênese somática de *Carica Papaya* L sob os tratamentos Controle (C), 5-azacitidina (5-AzaC; AZ) e hidroxiureia (HU) aos 0, 7 e 14 dias. **(a)** Diagrama de Venn mostrando a distribuição e o número de proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) únicas e compartilhadas entre os tratamentos no tempo inicial (0 e 7 dias). **(b)** Diagrama de Venn representando a sobreposição das DAPs entre os tratamentos aos 14 dias. **(c)** Mapa de calor exibindo o agrupamento hierárquico de 350 DAPs, organizadas em sete clusters (Clusters 1–7) com base nos perfis de abundância normalizados por z-score. Cores quentes (amarelo) indicam maior abundância relativa de proteínas, enquanto cores frias (azul) representam menor abundância nos diferentes tratamentos e tempos experimentais.

4.5 Análise funcional dos dados proteômicos

A análise de enriquecimento funcional revelou diferenças distintas entre as comparações experimentais. A condição 7AZ/7C apresentou o maior número de processos biológicos significativamente enriquecidos, especialmente aqueles relacionados ao metabolismo de compostos contendo enxofre, às vias de aminoácidos e às respostas ao estresse oxidativo. Em contraste, as comparações 14AZ/14C, 14HU/14C e 7HU/7C apresentaram menor número de processos enriquecidos e níveis mais baixos de significância estatística (Figura 11).

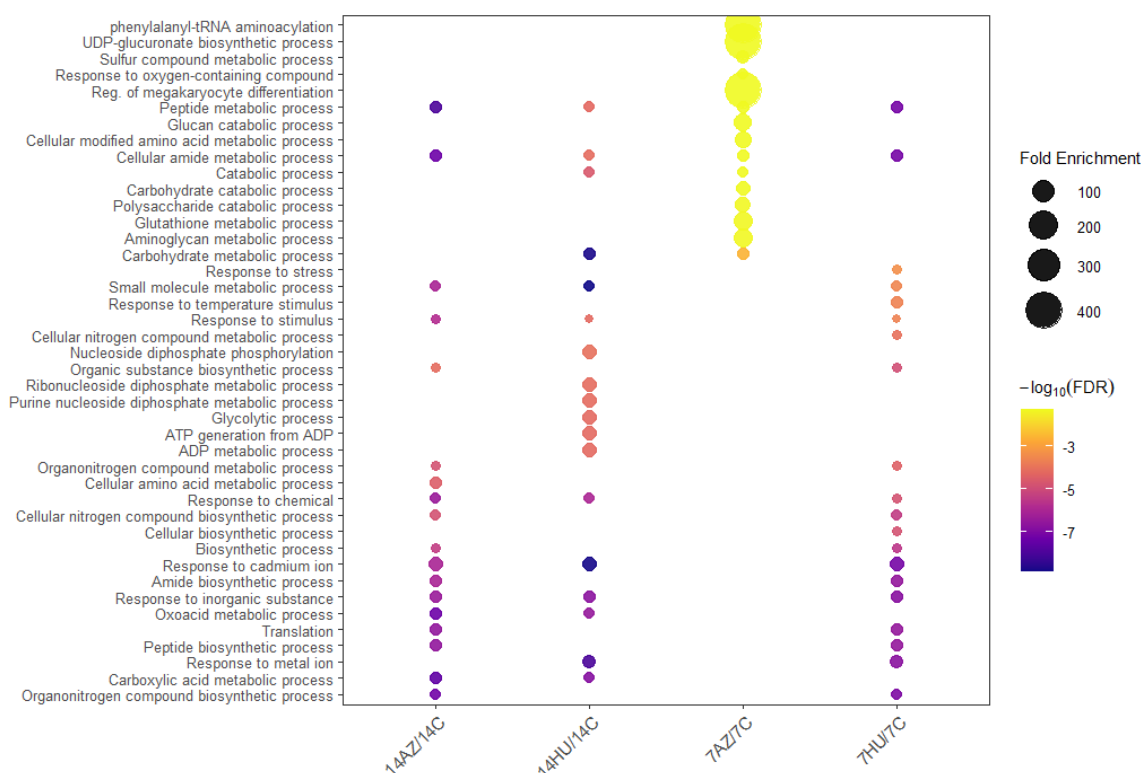


Figura 9. Análise de enriquecimento funcional (Gene Ontology – Processo Biológico) realizada utilizando o ShinyGO v0.82. Cada bolha representa um processo biológico significativamente enriquecido. O tamanho da bolha indica o fold enrichment, enquanto a intensidade da cor reflete o nível de significância estatística ($-\log_{10} \text{FDR}$). As comparações 14AZ/14C, 14HU/14C, 7AZ/7C e 7HU/7C estão dispostas no eixo x, e os processos biológicos enriquecidos estão listados no eixo y. A figura foi gerada em R com base nos resultados exportados do ShinyGO.

A análise da rede de interação proteína–proteína (PPI) obtida a partir dos DAPs de todas as comparações entre tratamentos revelou um conjunto de

proteínas com alta centralidade, identificadas como proteínas *hub*. Entre as principais, destacam-se: RIBOSOMAL PROTEIN LARGE SUBUNIT 4A (evm.model.supercontig_10.82, ortóloga de RPL4A), RIBOSOMAL PROTEIN LARGE SUBUNIT 8A (evm.model.supercontig_25.175, ortóloga de RPL8A), RIBOSOMAL PROTEIN LARGE SUBUNIT 7B (evm.model.supercontig_21.235, ortóloga de RPL7B), RIBOSOMAL PROTEIN LARGE SUBUNIT 18AB (evm.model.supercontig_166.21, ortóloga de RPL18AB) e RIBOSOMAL PROTEIN LARGE SUBUNIT 23AB (evm.model.supercontig_1.344, ortóloga de RPL23AB), pertencentes ao grupo das proteínas ribossomais da subunidade maior (Figura 12).

Além disso, ACTIN-RELATED PROTEIN 1 (evm.model.supercontig_49.101, ortóloga de ARP1), RIBOSOMAL PROTEIN SMALL SUBUNIT 6B (evm.model.supercontig_36.166, ortóloga de RPS6B), RECEPTOR FOR ACTIVATED C KINASE 1B (evm.model.supercontig_3.429, ortóloga de RACK1B) e RIBOSOMAL PROTEIN SMALL SUBUNIT 12C (evm.model.supercontig_462.2, ortóloga de RPS12C) também foram identificadas como proteínas com alto grau de conectividade dentro da rede (Figura 12).

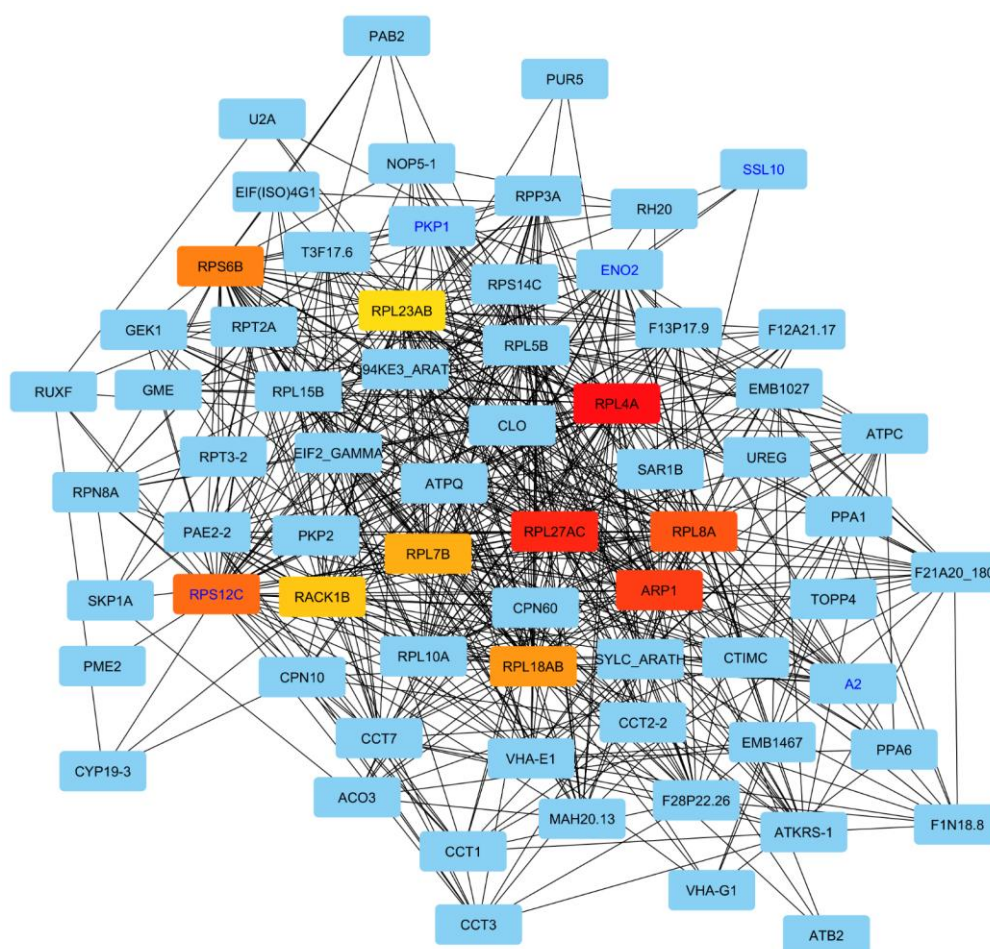


Figura 10. Rede de interação proteína–proteína (PPI) de proteínas associadas à indução de calos embriogênicos mediada por 2,4-D em *Carica papaya* L. A rede foi gerada no Cytoscape utilizando o stringApp, com limite de confiança de 0,7. As arestas são exibidas no modo de confiança, com a espessura e a opacidade escalonadas de acordo com o escore combinado do STRING. As cores dos nós indicam a centralidade topológica na rede, sendo os nós em vermelho representativos de proteínas hub com alta conectividade, os nós em laranja e amarelo indicativos de conectividade intermediária e os nós em azul representativos de proteínas com baixa conectividade. Os nomes indicam proteínas de *Arabidopsis* ortólogas às identificadas em *C. papaya* L. pela análise no STRING.

A análise da rede de interação proteína–proteína (PPI) evidenciou a formação de módulos funcionais organizados em clusters visualmente distintos (Figura 13). A listagem completa das proteínas diferencialmente acumuladas encontra-se no Quadro 4. Esses clusters apresentaram padrões específicos de aumento ou redução na acumulação proteica, associados tanto aos tratamentos com 5-AzaC e HU quanto aos diferentes tempos experimentais.

No *Cluster* 1, proteínas associadas à regulação epigenética, sinalização e tráfego vesicular apresentaram aumento preferencial sob 5-AzaC, incluindo a

PROTEÍNA PUTATIVA ASSOCIADA À REGULAÇÃO EPIGENÉTICA E RESPOSTA AO ESTRESSE (evm.model.supercontig_51.147, ortóloga de F22D1.120), enquanto ACTINA 4 (evm.model.supercontig_81.159, ortóloga de ACT4) exibiu aumento inicial seguido de redução nas comparações envolvendo HU. Componentes relacionados à tradução e homeostase celular, como PROTEÍNA ASSOCIADA AO RECEPTOR PARA A QUINASE C 1B (evm.model.supercontig_3.429, ortóloga de RACK1B) e SUBUNIDADE G1 DA ATPASE VACUOLAR (evm.model.supercontig_666.2, ortóloga de VHA-G1), apresentaram redução predominante sob HU.

O *Cluster 2* concentrou proteínas envolvidas na regulação hormonal, tradução e modulação epigenética, com aumento consistente de acumulação em tratamentos com 5-AzaC e nos tempos tardios, incluindo PROTEÍNA 14-3-3 GRUPO F 9-2 (evm.model.supercontig_97.102, ortóloga de GRF9-2), FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EUCARIÓTICA 2 SUBUNIDADE GAMA (evm.model.supercontig_16.190, ortóloga de EIF2_GAMMA) e PROTEÍNA GH3.6 LIGASE DE AMIDO DO ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (evm.model.supercontig_1065.2, ortóloga de GH3.6).

No *Cluster 3*, proteínas associadas ao metabolismo energético e ao tráfego celular apresentaram aumento predominante nas comparações com HU, como FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASE A (evm.model.supercontig_129.27, ortóloga de PCKA) e XILANASE A (evm.model.supercontig_75.2, ortóloga de XYLA), enquanto PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA DE LIPÍDIOS 4 (evm.model.supercontig_157.28, ortóloga de LTP4) apresentou redução em comparações específicas.

O *Cluster 4* reuniu proteínas relacionadas à metilação, metabolismo energético e estresse oxidativo, com aumento preferencial em estágios iniciais e sob HU, incluindo S-ADENOSILMETIONINA SINTETASE 2 (evm.model.supercontig_67.71, ortóloga de SAM2), SUPERÓXIDO DISMUTASE DE COBRE/ZINCO 1 (evm.model.supercontig_117.11, ortóloga de CSD1) e BETA-GLUCOSIDASE 40 (evm.model.supercontig_1.109, ortóloga de BGLU40).

No *Cluster 5*, observaram-se padrões mistos, com redução em proteínas associadas ao citoesqueleto e tráfego intracelular, como FATOR DESPOLIMERIZANTE DE ACTINA 4 (evm.model.supercontig_312.2, ortóloga de ADF4), e aumento em proteínas de remodelamento da parede celular, como XILANO ENDOTRANSGLUCOSILASE/HIDROLASE 23 (evm.model.supercontig_233.26, ortóloga de XTH23).

O *Cluster 6* foi caracterizado por redução predominante nas comparações tardias, envolvendo proteínas de metabolismo de carbono, sinalização metabólica e resposta ao estresse, como HEXOKINASE 1 (evm.model.supercontig_78.23, ortóloga de HXK1) e GLUTATIONA S-TRANSFERASE TAU 17 (evm.model.supercontig_1.380, ortóloga de GSTU17), enquanto TRANSKETOLASE-LIKE 2 (evm.model.supercontig_3.290, ortóloga de TKL-2) apresentou detecção exclusiva sob 5-AzaC.

No *Cluster 7*, predominou a redução de acumulação em proteínas associadas à detoxificação, metabolismo hormonal e proteostase, incluindo GLUTATIONA S-TRANSFERASE F 13 (evm.model.supercontig_9.200, ortóloga de GSTF13), UDP-GLICOSILTRANSFERASE 71B2 (evm.model.supercontig_8.266, ortóloga de UGT71B2) e PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 90-1 (evm.model.supercontig_29.53, ortóloga de HSP90-1), especialmente nas comparações envolvendo HU e nos tempos finais.

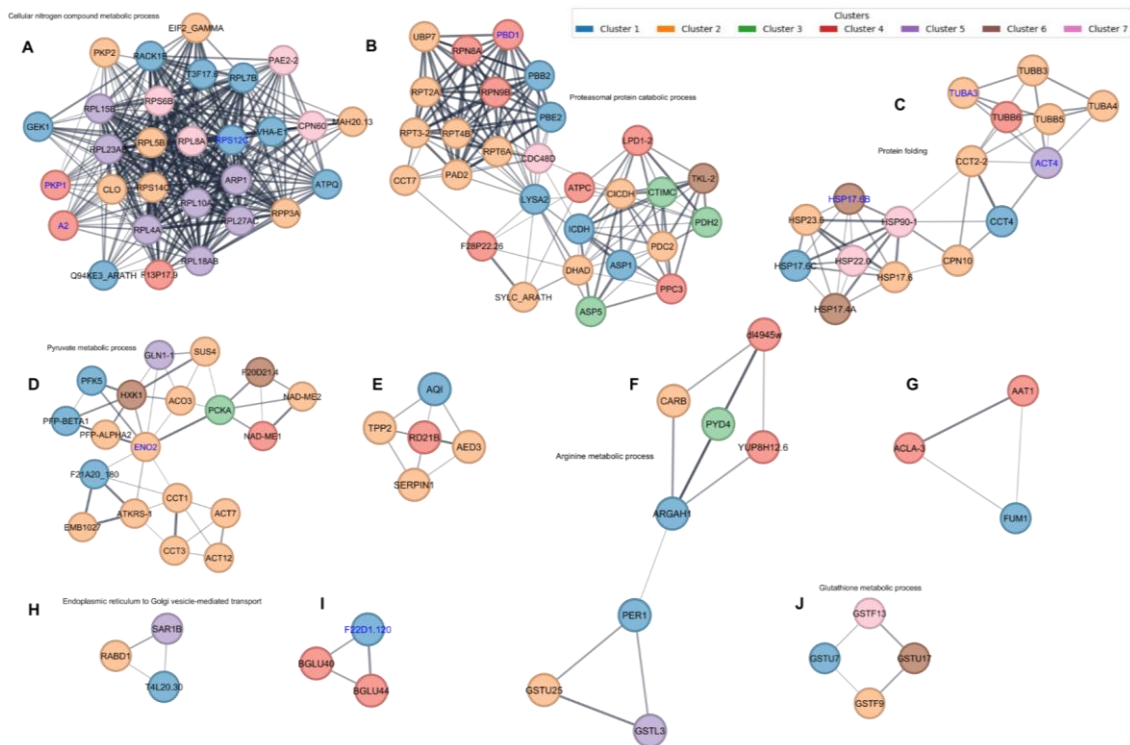


Figura 11. Rede de interação proteína-proteína de proteínas associadas à indução de calos embriogênicos mediada por 2,4-D em *Carica papaya* L. A rede foi gerada no Cytoscape utilizando o stringApp, com limiar de confiança de 0,7. As arestas são apresentadas no modo de visualização por confiança, com espessura e opacidade proporcionais ao score combinado do STRING. Os nomes das proteínas correspondem aos ortólogos de *Arabidopsis thaliana* identificados para as respectivas proteínas de *C. papaya* L. por meio da análise no STRING. A codificação por cores dos nós representa as relações de ortologia: nós pretos indicam um único ortólogo de mamão correspondente a uma proteína de *Arabidopsis*, enquanto nós azuis indicam dois ou mais ortólogos de *C. papaya* L. mapeados para a mesma proteína de *Arabidopsis thaliana*.

Tabela 2. Proteínas-alvo potencialmente relacionadas à regulação epigenética, desenvolvimento embrionário e respostas ao estresse durante a embriogênese somática de *Carica papaya* L., identificadas por análise proteômica e agrupadas conforme padrões de acumulação nos diferentes tempos experimentais e tratamentos. A tabela apresenta ortólogos em *Arabidopsis thaliana*, categorias biológicas putativas, comparações experimentais relevantes e o perfil diferencial de acumulação (UP = aumento; DOWN = redução; Uniq. = exclusivo do tratamento).

Protein ID (<i>Carica Papaya</i> L.)	Ortholog (<i>Arabidopsis</i>)	Categoria biológica	Comparação relevante	Diferencial de acumulação
Cluster 1				
evm.model.supercontig_51.147	F22D1.120	Regulação epigenética / resposta ao estresse (putativa)	7AZ/7C	Uniq. 7AZ
			7HU/7C	Uniq. 7HU
			14AZ/14C	UP
evm.model.supercontig_3.429	RACK1B	Regulação traducional / sinalização hormonal (ABA/auxina)	7HU/7C;14HU/14C	DOWN
evm.model.supercontig_81.159	ACT4	Citoesqueleto / polarização celular	7AZ/C0; 7C/C0	UP
			7HU/7C	DOWN
evm.model.supercontig_666.2	VHA-G1	Homeostase celular / tráfego vesicular	7HU/7C; 14HU/14C	DOWN
evm.model.supercontig_130.66	PBB2	Processamento proteico / regulação de proteólise	7AZ/C0	UP
			14HU/14C	DOWN
evm.model.supercontig_245.1	RABA4C	Tráfego vesicular / sinalização celular	7AZ/C0	UP
evm.model.supercontig_145.18	ARGAH1	Metabolismo de poliaminas / regulação hormonal indireta	7AZ/C0	UP
evm.model.supercontig_107.14	CYP76C2	Metabolismo de hormônios / compostos oxidados	7AZ/C0	UP
Cluster 2				
evm.model.supercontig_97.102	GRF9-2	Regulação hormonal / crescimento celular	7AZ/C0	Uniq. 7AZ
			7C/C0; 7HU/C0; 7AZ/7C; 14AZ/14C	UP
evm.model.supercontig_1539.1	SERPIN1	Regulação de proteólise / estresse	7C/C0; 7AZ/C0	UP
			7HU/7C	Uniq. 7HU
evm.model.supercontig_25.210	GSTU25	Detoxificação / redox / estresse oxidativo	7AZ/C0; 7AZ/7C; 14AZ/14C	UP
			14HU/14C	DOWN
evm.model.supercontig_50.116	GSTF9	Detoxificação / redox	7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_887.2	MAH20.13	Metiltransferase / regulação epigenética (putativa)	7C/C0; 7HU/C0; 14AZ/14C	UP
evm.model.supercontig_3.18	PKP2	Metabolismo energético / glicólise	7C/C0; 7HU/C0; 14AZ/14C	UP
evm.model.supercontig_16.190	EIF2 GAMMA	Regulação da tradução / resposta ao estresse	7C/C0; 7AZ/C0; 7HU/C0; 14AZ/14C	UP
evm.model.supercontig_46.175	EIF(ISO)4G1	Regulação da tradução	7C/C0; 7AZ/C0; 7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_107.64	TPP2	Peptidase / controle proteico	7C/C0	UP
evm.model.supercontig_6.295	SKP1A	Regulação epigenética / ubiquitinação (SCF complex)	7C/C0; 7AZ/C0; 7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_1.401	ACT12	Citoesqueleto / polarização celular	7C/C0; 7AZ/C0; 7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_37.16	PSL5	Regulação mitocondrial / estresse	7AZ/C0; 7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_728.2	AHP5	Sinalização hormonal (citocinina/HPT protein)	14AZ/14C	UP

evm.TU.contig_32826.1	GH3.6	Metabolismo de auxina	14AZ/14C; 14HU/14C	UP
Cluster 3				
evm.model.supercontig_129.27	PCKA	Metabolismo energético / integração metabólica	7HU/7C; 14HU/14C	UP
evm.model.supercontig_75.2	XYLA	Remodelamento de parede celular	7HU/7C; 7AZ/7C; 14HU/14C	UP
evm.model.supercontig_157.28	LTP4	Transporte lipídico / sinalização de membrana	7AZ/7C	DOWN
evm.model.supercontig_81.140	CTIMC	Metabolismo mitocondrial / respiração	7HU/7C; 14HU/14C	UP
evm.model.supercontig_55.94	ARFA1F	Tráfego vesicular / sinalização celular	7HU/C0; 7HU/7C; 14HU/14C	UP
evm.model.supercontig_33.179	CAM7	Sinalização por Ca ²⁺ / regulação transcricional	14HU/14C	UP
evm.model.supercontig_532.4	ASP5	Metabolismo de aminoácidos / integração metabólica	7HU/C0; 7HU/7C; 14HU/14C	UP
evm.model.supercontig_53.142	RD19D	Resposta ao estresse / protease	7HU/C0; 7HU/7C	UP
evm.model.supercontig_17.152	TGG5	Defesa / estresse oxidativo	7HU/7C	UP
evm.model.supercontig_10.262	SSL10	Resposta ao estresse	7HU/7C	UP
Cluster 4				
evm.model.supercontig_67.71	SAM2	Metabolismo de S-adenosilmetionina / metilação	7AZ/7C	Uniq. 7C
evm.model.supercontig_19.200	RPN8A	Proteassoma / regulação da proteólise	7AZ/C0	Uniq. 7AZ
evm.model.supercontig_81.37	HSP17.6B	Resposta ao estresse / chaperona	14AZ/14C	DOWN
evm.model.supercontig_44.10	PXG1	Redox / peroxidase	7AZ/C0; 7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_90.61	RABA5D	Tráfego vesicular	7C/C0; 7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_97.104	PPC3	Metabolismo energético	7C/C0; 7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_117.11	CSD1	Superóxido dismutase / estresse oxidativo	7C/C0; 7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_58.99	RAB28	Tráfego vesicular	7C/C0; 7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_48.211	ACLA-3	Metabolismo de acetil-CoA / integração metabólica	7C/C0; 7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_58.78	PBD1	Regulação da tradução / resposta ao estresse	7C/C0; 7AZ/C0; 7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_292.1	GH3.1	Metabolismo de auxina (IAA-amido ligase)	7HU/C0; 14HU/14C	UP
evm.model.supercontig_1.109	BGLU40	Metabolismo de glicosídeos / parede celular / hormônios	7HU/C0; 7HU/7C; 14AZ/14C; 14HU/14C	UP
evm.model.supercontig_271.5	F28P22.26	Resposta ao estresse / regulação celular	7AZ/7C	DOWN
evm.TU.contig_37837.1	PATL3	Transporte lipídico / sinalização de membrana	7C/C0; 7AZ/C0; 7HU/C0; 14AZ/14C; 14HU/14C	UP
evm.model.supercontig_53.40	A2	Regulação transcricional / resposta ao estresse	7C/C0; 7AZ/C0; 7HU/C0; 14AZ/14C; 14HU/14C	UP
evm.model.supercontig_135.6	GDH2	Metabolismo N / integração sinal-metabolismo	7C/C0; 7AZ/C0	UP
evm.model.supercontig_1.115	GRF12	Regulação hormonal (14-3-3 protein)	7AZ/C0	UP
evm.model.supercontig_17.191	AHA11	Transporte de prótons / homeostase de membrana	7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_52.65	NAD-ME1	Metabolismo mitocondrial / energia	7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_3.401	TUBB6	Citoesqueleto	7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_27.48	GRXS17	Redox / resposta ao estresse	7HU/C0	UP
evm.model.supercontig_25.176	ATPC	ATP sintase / energia	14HU/14C	UP
evm.model.supercontig_44.141	PKP1	Glicólise / integração metabólica	14HU/14C	UP
evm.model.supercontig_200.16	RD21B	Protease / resposta ao estresse	14HU/14C	UP
Cluster 5				
evm.model.supercontig_81.68	A2	Regulação transcricional / resposta ao estresse	7HU/C0	UP
			7HU/7C	Uniq. 7C
evm.model.supercontig_37.14	UVR8	Sinalização por UV / resposta ao estresse	7AZ/C0	DOWN
evm.model.supercontig_48.146	SAR1B	Tráfego vesicular (COPII)	7C/C0	DOWN

evm.model.supercontig_230.2	RABH1E	Tráfego vesicular (Rab GTPase)	7AZ/C0	DOWN
evm.model.supercontig_312.2	ADF4	Citoesqueleto / dinâmica de actina	7AZ/C0; 7HU/C0	DOWN
evm.model.supercontig_233.26	XTH23	Remodelamento de parede celular	7HU/7C	UP
evm.model.supercontig_70.34	XTH5	Remodelamento de parede celular	7HU/7C	UP
evm.model.supercontig_84.113	TGG4	Defesa / estresse	7AZ/7C	UP
evm.model.supercontig_114.38	GSTL3	Redox / detoxificação	7HU/C0	DOWN
evm.model.supercontig_83.66	AAC3	Metabolismo mitocondrial / transporte	7AZ/C0; 7HU/C0	DOWN
evm.model.supercontig_19.93	PER52	Redox / parede celular	7C/C0; 7HU/C0	DOWN
evm.model.supercontig_34.179	PYD2	Metabolismo N / estresse	7HU/C0	DOWN
evm.model.supercontig_81.167	ACT4	Citoesqueleto / morfogênese	7AZ/C0	DOWN
evm.model.supercontig_81.167	ACT4	Citoesqueleto / morfogênese	7HU/7C; 14HU/14C	UP
evm.model.supercontig_49.101	ARP1	Complexo dinactina / tráfego intracelular	14AZ/14C	DOWN
evm.TU.contig_45133.1	GAMMACA1	Metabolismo energético / integração sinal-metabolismo	7AZ/C0; 7HU/C0	DOWN
evm.model.supercontig_37.29	BGAL6	Parede celular / modificação de carboidratos	14HU/14C	UP
Cluster 6				
evm.model.supercontig_3.290	TKL-2	Metabolismo de carbono / integração metabólica	7AZ/C0; 7AZ/7C	Uniq. 7AZ
			14AZ/14C	UP
evm.model.supercontig_106.27	PKP1	Glicólise / regulação metabólica	14AZ/14C; 14HU/14C	DOWN
evm.model.supercontig_83.83	SUR1	Metabolismo de auxina (via indol-3-acetaldoxíma)	14AZ/14C	DOWN
evm.model.supercontig_1.380	GSTU17	Detoxificação / redox	14AZ/14C	DOWN
evm.model.supercontig_78.23	HXX1	Sensor de glicose / sinalização metabólica	14AZ/14C	DOWN
evm.model.supercontig_81.43	HSP17.6B	Resposta ao estresse / chaperona	14AZ/14C	DOWN
evm.model.supercontig_81.164	HSP17.4A	Resposta ao estresse / chaperona	14AZ/14C	DOWN
evm.model.supercontig_883.2	AAC2	Transporte mitocondrial de ADP/ATP	14AZ/14C	DOWN
evm.model.supercontig_166.24	UREG	Homeostase de níquel / regulação metabólica	14AZ/14C	DOWN
evm.model.supercontig_677.2	SSL10	Resposta ao estresse	14AZ/14C	DOWN
Cluster 7				
evm.model.supercontig_9.200	GSTF13	Detoxificação / redox	7HU/C0; 7HU/7C; 14HU/14C	DOWN
evm.model.supercontig_1476.2	HEL	Helicase / regulação de RNA	7HU/C0; 7HU/7C; 14AZ/14C; 14HU/14C	DOWN
evm.model.supercontig_66.86	SAH7	Metabolismo de S-adenosilhomocisteína / metilação	7HU/C0; 7HU/7C; 14AZ/14C; 14HU/14C	DOWN
evm.model.supercontig_25.190	PAE2-2	Metabolismo de pectina / parede celular	7C/C0; 7AZ/C0; 7HU/C0; 14AZ/14C; 14HU/14C	DOWN
evm.model.supercontig_29.53	HSP90-1	Chaperona / proteostase	14AZ/14C; 14HU/14C	DOWN
evm.model.supercontig_8.201	CPN60	Chaperona mitocondrial	7HU/C0; 7HU/7C; 14AZ/14C	DOWN
evm.model.supercontig_8.266	UGT71B2	Metabolismo hormonal (glicosilação)	7HU/C0; 7HU/7C; 14AZ/14C	DOWN
evm.model.supercontig_153.17	CDC48D	Remodelamento proteico / ubiquitinação	7HU/C0; 7HU/7C	DOWN
evm.model.supercontig_20.188	LYM2	Defesa / sinalização de parede celular	14AZ/14C	DOWN
evm.model.supercontig_27.257	RABA5A	Tráfego vesicular	7C/C0; 7AZ/C0; 7HU/C0	DOWN
evm.model.supercontig_21.227	HSP22.0	Chaperona / estresse	7AZ/7C	DOWN
evm.model.supercontig_145.12	PME17	Modificação de pectina / parede celular	7HU/C0	DOWN
evm.model.supercontig_57.55	CATHB2	Protease / resposta ao estresse	7HU/C0	DOWN

5. DISCUSSÃO

A integração dos dados epigenéticos, hormonais e proteômicos forneceu uma visão abrangente dos mecanismos moleculares associados à embriogênese somática em *C. papaya*. Os resultados indicam que alterações transitórias na metilação do DNA, acompanhadas por ajustes coordenados nos perfis hormonais e proteômicos, estão intimamente relacionadas à aquisição da competência embriogênica e à transição entre os estágios iniciais do desenvolvimento, reforçando o caráter multifatorial desse processo (Fehér, 2015; Osorio-Montalvo et al., 2018).

Embora o 5-AzaC seja reconhecido como um agente desmetilante, observou-se uma redução inicial da metilação nos primeiros dias de incubação (até o terceiro dia), seguida por aumento subsequente da GDM, resultando em um pico transitório aos sete dias (Figs. 6–8). Esse padrão dinâmico sustenta a interpretação de que a indução da embriogênese somática não depende de um estado persistentemente hipometilado, mas sim de uma reconfiguração epigenética oscilatória, na qual fases sucessivas de hipometilação e remetilação conferem plasticidade celular sem comprometer a estabilidade genômica (Osorio-Montalvo et al., 2018; Santos et al., 2017).

A plasticidade epigenética induzida pelo 5-AzaC refletiu-se também na morfologia embriogênica, uma vez que o tratamento promoveu aumento no número de embriões em estágios iniciais, sem alterar o número total de embriões formados (Tabela 1). Esse deslocamento na distribuição dos estádios sugere que o agente favoreceu eventos precoces de reprogramação celular e expansão inicial, em consonância com observações em diferentes espécies, nas quais exposições breves a moduladores epigenéticos reconfiguram estados de competência sem impactar a produtividade final (Sivanesan et al., 2022).

A interação entre modulação epigenética e sinalização hormonal foi evidenciada pelas alterações nos níveis de JA e SA. O tratamento com 5-AzaC induziu um aumento precoce e transitório desses hormônios aos sete dias, seguido por redução consistente aos 14 dias (Figura 9c,d), sugerindo uma transição de um estado associado ao estresse para um programa de

desenvolvimento. O JA é amplamente associado a respostas de defesa e estresse, enquanto o SA atua como modulador de vias redox e processos epigenéticos, incluindo remodelamento da cromatina (Khan et al., 2022; Rehman et al., 2023). Em contraste, os níveis de AIA aumentaram progressivamente ao longo do experimento em todos os tratamentos (Figura 9a), indicando que a auxina acompanhou o curso natural da embriogênese somática, atuando como um eixo estabilizador do desenvolvimento, conforme descrito em outros sistemas vegetais (Fehér, 2015; Su et al., 2011).

O aumento temporário de SA pode também estar relacionado à ativação de vias antioxidantes e à regulação de enzimas dependentes de SAM, que participam tanto dos processos de metilação quanto da biossíntese de hormônios vegetais (Chiang et al., 1996; Thomas et al., 1988). Essa associação é sustentada pela detecção de proteínas relacionadas ao metabolismo de SAM, como SAM1 e SAM2, durante as fases iniciais e intermediárias do processo. Em contraste, o tratamento com HU manteve níveis relativamente estáveis de JA e SA, em concordância com a resposta embriogênica limitada observada nesse tratamento.

O HU, ao inibir a ribonucleotídeo redutase, induz estresse replicativo moderado (Wozniak & Simmons, 2021). Neste estudo, essa condição esteve associada a ajustes proteômicos compatíveis com uma resposta adaptativa transitória, seguida por estabilização celular e retomada da diferenciação. Esse comportamento também se refletiu nos níveis de GDM, que permaneceram elevados nos estágios iniciais, mas tenderam à normalização sugerindo a atuação de mecanismos compensatórios de ajuste epigenético.

A análise proteômica revelou que a modulação epigenética não alterou apenas proteínas individuais, mas promoveu uma reorganização ampla das redes funcionais. A rede de interação proteína–proteína evidenciou a presença de proteínas *hubs* altamente conectados, predominantemente associadas à maquinaria traducional, ao citoesqueleto e ao tráfego vesicular (Figura 12). Esse padrão indica que a reprogramação celular atua sobre infraestruturas centrais da célula, reorganizando sistemas essenciais para a plasticidade celular e a aquisição da competência embriogênica, conforme proposto em modelos

recentes de reprogramação celular vegetal (S. Chen et al., 2024; Ramakrishnan et al., 2023).

Os *clusters* proteômicos identificados nas fases iniciais (7–14 dias) refletiram essa reorganização sistêmica. Clusters enriquecidos em proteínas relacionadas à tradução, regulação hormonal e metabolismo redox apresentaram aumento de acumulação sob 5-AzaC, enquanto *clusters* associados à diferenciação tardia e ao metabolismo energético exibiram redução ou repressão temporária. Esse padrão sugere que a embriogênese somática envolve uma priorização funcional voltada à reprogramação celular, seguida por ajustes metabólicos compatíveis com a progressão do desenvolvimento (Awada et al., 2019; Frost et al., 2024).

Adicionalmente, a comparação entre os tratamentos 5-AzaC e controle aos sete dias (7AZ/7C) concentrou o maior número de processos biologicamente significativos, especialmente aqueles relacionados ao metabolismo de compostos sulfurados, vias de aminoácidos e respostas ao estresse oxidativo (Figura 11). Esses processos antecedem a reorganização estrutural e funcional observada nos estágios subsequentes, sugerindo que a ativação metabólica inicial pode atuar como um gatilho para a reprogramação epigenética e hormonal, criando um ambiente permissivo para a ativação de genes embriogênicos (Martínez & Corredoira, 2024).

Em conjunto, os resultados sustentam um modelo no qual a plasticidade epigenética atua como um eixo integrador capaz de coordenar múltiplas camadas regulatórias. Alterações transitórias na metilação do DNA desencadeiam ajustes hormonais, reorganizam redes proteômicas centrais e modulam o metabolismo redox, culminando na aquisição da competência embriogênica. Esse modelo está alinhado com evidências recentes de que a totipotência vegetal emerge da integração dinâmica entre estresse, metabolismo e diferenciação (S. Chen et al., 2024; Rudolf et al., 2024), fornecendo bases conceituais e aplicadas para o aprimoramento de protocolos de regeneração *in vitro* em *C. papaya*.

6. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que a embriogênese somática em *C. papaya* é regulada por uma interação dinâmica entre a modulação epigenética, sinalização hormonal e reorganização proteômica. Alterações transitórias na metilação do DNA, induzidas pelo 5-AzaC, definem uma janela precoce de reprogramação celular que favorece a aquisição da competência embriogênica e a progressão dos estádios iniciais do desenvolvimento, sem comprometer a produtividade embrionária final.

A integração das análises epigenéticas, hormonais e proteômicas revela que a modulação epigenética atua como um mecanismo-chave de ajuste fino do desenvolvimento embrionário, promovendo a reorganização de redes celulares centrais e a transição de respostas associadas ao estresse para processos relacionados ao desenvolvimento. Em contraste, o tratamento com hidroximetilureia (HU) induz respostas mais restritas, associadas ao estresse replicativo e à interrupção do ciclo celular, o que limita a capacidade de reprogramação epigenética e, conseqüentemente, a plasticidade celular.

Em conjunto, estes achados estabelecem uma base mecanística robusta para o uso direcionado de moduladores epigenéticos como ferramentas biotecnológicas na otimização de protocolos de regeneração *in vitro* e micropropagação de *C. papaya*, integrando abordagens epigenéticas, proteômicas e hormonais, e ampliando as perspectivas para sua aplicação em sistemas de clonagem vegetal e em estratégias avançadas de melhoramento biotecnológico.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados deste estudo estabelecem a plasticidade epigenética como um eixo central na coordenação entre sinalização hormonal e reorganização proteômica durante a aquisição da competência embriogênica em *C. papaya*. Uma direção prioritária consiste na caracterização locus-específica da metilação do DNA por meio de abordagens como sequenciamento bissulfito ou tecnologias baseadas em leituras longas (ONT ou similares), integradas a análises transcriptômicas (RNA-seq), com o objetivo de identificar genes regulatórios e

redes moleculares diretamente associadas às transições epigenéticas transitórias observadas na metilação global.

No nível hormonal e proteômico, estudos futuros podem incorporar análises espaciais e temporais de distribuição de hormônios vegetais, utilizando metabolômica espacial, imunolocalização ou sistemas repórteres, para elucidar como gradientes hormonais são estabelecidos em resposta às oscilações epigenéticas. Abordagens proteômicas quantitativas de maior resolução, como estratégias baseadas em fosfoproteômica, poderão revelar eventos pós-traducionais envolvidos na transdução de sinais epigenéticos e hormonais. A validação funcional de proteínas candidatas por meio de edição gênica ou silenciamento gênico permitirá estabelecer relações causais com os fenótipos embriogênicos observados.

Do ponto de vista aplicado, a definição de janelas epigenéticas e hormonais poderá orientar a otimização de protocolos *in vitro*, contribuindo para o aumento da eficiência, uniformidade e estabilidade genética de plantas regeneradas. A expansão desse modelo integrativo para diferentes genótipos de *C. papaya* e outras espécies tropicais, aliada à modelagem computacional e ao aprendizado para a integração multiômica, representa uma perspectiva promissora para a identificação de marcadores de competência embriogênica e o avanço de estratégias biotecnológicas no melhoramento vegetal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amritha, K. T. K., Muralikrishna, K. S., Habeeb, J., Chandran, K. P., Paulraj, S., & Rajesh, M. K. (2025). 5-Azacytidine promotes the induction of embryogenic calli and somatic embryos from transverse thin cell layer (tTCL) cultures in coconut. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 85(1), 77–87. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392025000100077>
- Awada, R., Campa, C., Gibault, E., Déchamp, E., Georget, F., Lepelley, M., Abdallah, C., Erban, A., Martinez-Seidel, F., Kopka, J., Legendre, L., Lérant, S., Conéjéro, G., Verdeil, J. L., Crouzillat, D., Breton, D., Bertrand, B., & Etienne, H. (2019). Unravelling the metabolic and hormonal machinery during key steps of somatic embryogenesis: A case study in coffee. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19). <https://doi.org/10.3390/ijms20194665>

- Baklouti, E., Beulé, T., Nasri, A., Ben Romdhane, A., Drira, R., Doulbeau, S., Rival, A., Drira, N., & Fki, L. (2022). 2,4-D induction of somaclonal variations in in vitro grown date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv Barhee). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(1), 191–205. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02259-8>
- Barboza Bispo, R. (2024). *Avaliação e seleção de novos híbridos de mamoeiro: explorando a capacidade específica de combinação, heterose varietal e perfil molecular*. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Bennett, M., Cleaves, K., & Hewezi, T. (2021). Expression patterns of dna methylation and demethylation genes during plant development and in response to phytohormones. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18). <https://doi.org/10.3390/ijms22189681>
- Bewick, A. J., Niederhuth, C. E., Ji, L., Rohr, N. A., Griffin, P. T., Leebens-Mack, J., & Schmitz, R. J. (2017). The evolution of CHROMOMETHYLASES and gene body DNA methylation in plants. *Genome Biology*, 18(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1195-1>
- Botini, N., Almeida, F. A., Cruz, K. Z. C. M., Reis, R. S., Vale, E. M., Garcia, A. B., Santa-Catarina, C., & Silveira, V. (2021). Stage-specific protein regulation during somatic embryo development of *Carica papaya* L. 'Golden.' *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1869(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140561>
- Carneros, E., Díaz-Luzza, E. M., Pérez-Pérez, Y., Solís, M. T., & Testillano, P. S. (2024a). Demethylation by transitory 5-azacytidine treatment improves somatic embryogenesis yield for regeneration and breeding of cork oak. *Physiologia Plantarum*, 176(1). <https://doi.org/10.1111/ppl.14143>
- Carneros, E., Díaz-Luzza, E. M., Pérez-Pérez, Y., Solís, M. T., & Testillano, P. S. (2024b). Demethylation by transitory 5-azacytidine treatment improves somatic embryogenesis yield for regeneration and breeding of cork oak. *Physiologia Plantarum*, 176(1), 104–129. <https://doi.org/10.1111/ppl.14143>
- Carra, A., Wijerathna-Yapa, A., Pathirana, R., & Carimi, F. (2024). Development and Applications of Somatic Embryogenesis in Grapevine (*Vitis* spp.). *Plants*, 13(22), 3131. <https://doi.org/10.3390/plants13223131>

- Chang, W., Zhao, Y., Ray  e, D., Xie, Q., Suzuki, M., Zheng, D., & Cvekl, A. (2023). Dynamic changes in whole genome DNA methylation, chromatin and gene expression during mouse lens differentiation. *Epigenetics and Chromatin*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13072-023-00478-7>
- Chen, Q., Tao, S., Bi, X., Xu, X., Wang, L., & Li, X. (2013). Research of total levels on DNA methylation in plant based on HPLC analysis. *American Journal of Molecular Biology*, 03(02), 98–101. <https://doi.org/10.4236/ajmb.2013.32013>
- Chen, S., Guo, D., Deng, Z., Tang, Q., Li, C., Xiao, Y., Zhong, L., & Chen, B. (2024). Integration analysis of transcriptome and proteome profiles brings new insights of somatic embryogenesis of two eucalyptus species. *BMC Plant Biology*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05271-6>
- Chen, X., Xu, X., Shen, X., Li, H., Zhu, C., Chen, R., Munir, N., Zhang, Z., Chen, Y., Xuhan, X., Lin, Y., & Lai, Z. (2020). Genome-wide investigation of DNA methylation dynamics reveals a critical role of DNA demethylation during the early somatic embryogenesis of *Dimocarpus longan* Lour. *Tree Physiology*, 40(12), 1807–1826. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa097>
- Chiang, P. K., Gordon, R. K., Tal, J., Zeng, G. C., Doctor, B. P., Pardhasaradhi, K., & Mccann, P. P. (1996). *S-Adenosylmethionine and methylation*.
- Christman, J. K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 21(35), 5483–5495. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205699>
- Cipriano, J. L. D., Cruz, A. C. F., Mancini, K. C., Schmildt, E. R., Lopes, J. C., Otoni, W. C., & Alexandre, R. S. (2018). Somatic embryogenesis in *Carica papaya* as affected by auxins and explants, and morphoanatomical-related aspects. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 90(1), 385–400. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820160252>
- Clément, C., Orsi, G. A., Gatto, A., Boyarchuk, E., Forest, A., Hajj, B., Min -Hattab, J., Garnier, M., Gurard-Levin, Z. A., Quivy, J. P., & Almouzni, G. (2018). High-resolution visualization of H3 variants during replication reveals their controlled recycling. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05697-1>

- Da Paschoa, R. P., Xavier, L. R., Corrêa, C. C. G., Vieira, K. da S., Pacheco, D. D. R., Gomes, L. do E. S., da Silva, C. E. A., Alves, L. E. de O., Pinto, V. B., Santa-Catarina, C., & Silveira, V. (2026). Early regulatory networks driving somatic embryogenesis in *Saccharum* spp. L. revealed by time-resolved proteomics. *Journal of Proteomics*, 326. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2026.105602>
- De Bruijne, E., de Langhe, E., & van Rijck, R. (1974). Actions of hormones and embryoid formation in callus cultures of *Carica papaya*. *Mededelingen van de Rijkslandbouwhogeschool Te Gent: International Symposium on Crop Protection*, 637–645.
- De Mendonça, T. G., Lírio, V. S., Moura, A. D., Reis, B. dos S., & Silveira, S. de F. R. (2017). Avaliação da viabilidade econômica da produção de mamão em sistema convencional e de produção integrada de frutas. *Revista Econômica Do Nordeste*, 40(4), 699–724. <https://doi.org/10.61673/ren.2009.373>
- de Moraes Oliveira, J. P., Silva, A. J. da, Catrinck, M. N., & Clarindo, W. R. (2023). Embryonic abnormalities and genotoxicity induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid during indirect somatic embryogenesis in *Coffea*. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36879-7>
- De-la-Peña, C., Nic-Can, G. I., Galaz-Ávalos, R. M., Avilez-Montalvo, R., & Loyola-Vargas, V. M. (2015). The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 6, Number AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00635>
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., Levin, Y., Schild, H., & Tenzer, S. (2014). Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nature Methods*, 11(2), 167–170. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2767>
- Dodeman, V. L., Ducreux, G., & Kreis, M. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 48, Number 313). <http://jxb.oxfordjournals.org/>
- Doyler, J. J., & Doyler, L. J. (1987). A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11–15.
- Du, J., Johnson, L. M., Groth, M., Feng, S., Hale, C. J., Li, S., Vashisht, A. A., Gallego-Bartolome, J., Wohlschlegel, J. A., Patel, D. J., & Jacobsen, S. E. (2014). Mechanism of DNA Methylation-Directed Histone Methylation by

- KRYPTONITE. *Molecular Cell*, 55(3), 495–504.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.009>
- Du, J., Johnson, L. M., Jacobsen, S. E., & Patel, D. J. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(9), 519–532. <https://doi.org/10.1038/nrm4043>
- Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J. V., & Gómez-Cadenas, A. (2005). Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8437–8442. <https://doi.org/10.1021/jf050884b>
- Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária (Embrapa). (2024). *Mamão – Portal Embrapa*. <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mamao>
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. In *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* (Vol. 1849, Number 4, pp. 385–402). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Feher, A., Pasternak, T. P., & Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Vol. 74).
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2025). *FAOSTAT Database - Crops and 22 livestock products*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
- Fortini, E. A., Batista, D. S., Felipe, S. H. S., Silva, T. D., Correia, L. N. F., Farias, L. M., Faria, D. V., Pinto, V. B., Santa-Catarina, C., Silveira, V., De-la-Peña, C., Castillo-Castro, E., & Otoni, W. C. (2023). Physiological, epigenetic, and proteomic responses in *Pfaffia glomerata* growth in vitro under salt stress and 5-azacytidine. *Protoplasma*, 260(2), 467–482. <https://doi.org/10.1007/s00709-022-01789-4>
- Fraga, H. P. F., Vieira, L. N., Caprestano, C. A., Steinmacher, D. A., Micke, G. A., Spudeit, D. A., Pescador, R., & Guerra, M. P. (2012). 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg)

- Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant Cell Reports*, 31(12), 2165–2176. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1327-8>
- Frost, J. M., Rhee, J. H., & Choi, Y. (2024). Dynamics of DNA methylation and its impact on plant embryogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 81, 102593. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2024.102593>
- Gao, Y., Chen, X., Liu, C., Zhao, H., Dai, F., Zhao, J., Zhang, J., & Kong, L. (2023). Involvement of 5mC DNA demethylation via 5-aza-2'-deoxycytidine in regulating gene expression during early somatic embryo development in white spruce (*Picea glauca*). *Forestry Research*, 3. <https://doi.org/10.48130/fr-0023-0030>
- Ge, S. X., Jung, D., & Yao, R. (2020). ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, 36(8), 2628–2629. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>
- Gonzaga Pereira, M., Pastana de Sousa Poltronieri, T., Nair Santana Pereira, T., Christine Cancela Ramos, H., Santa Catarina, R., Cesar Fiorio Vettorazzi, J., Abreu Santana Arêdes, F., Santana Bastos Boechat, M., Motta Venâncio, T., Oliveira Nunes Azevedo, A., Fernando Marmolejo Cortes, D., Fernandes Moreira, N., Bohry, D., Felipe da Silveira, S., Vivas, F. da S., & Antônio Ferregueti, G. (2020). Twenty-two-year papaya breeding program: from breeding strategy establishment to cultivar development. *Functional Plant Breeding Journal*, 1(2), 9–27. <https://doi.org/10.35418/2526-4117/v1n2a2>
- Grzybkowska, D., Morończyk, J., Wójcikowska, B., & Gaj, M. D. (2018). Azacitidine (5-AzaC)-treatment and mutations in DNA methylase genes affect embryogenic response and expression of the genes that are involved in somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation*, 85(2), 243–256. <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0389-1>
- Grzybkowska, D., Nowak, K., & Gaj, M. D. (2020). Hypermethylation of auxin-responsive motifs in the promoters of the transcription factor genes accompanies the somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms21186849>
- Heringer, A. S., Santa-Catarina, C., & Silveira, V. (2018). Insights from Proteomic Studies into Plant Somatic Embryogenesis. In *Proteomics* (Vol. 18, Numbers 5–6). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700265>

- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. (2025). *Produção Agrícola 25 Municipal – PAM 2024: culturas temporárias e permanentes*. <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/mamao/es>.
- Jahnke, S., & Scholten, S. (2009). Epigenetic Resetting of a Gene Imprinted in Plant Embryos. *Current Biology*, 19(19), 1677–1681. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.053>
- Junaid Aslam, Saeed Ahmad Khan, Abdul Jaleel Cheruth, Abdul Mujib, Maheshwar Pershad Sharma, & Prem Shanker Srivastava. (2011). Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.06.002>
- Karami, O., de Jong, H., Somovilla, V. J., Villanueva Acosta, B., Sugiarta, A. B., Ham, M., Khadem, A., Wennekes, T., & Offringa, R. (2023). Structure–activity relationship of 2,4-D correlates auxinic activity with the induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 116(5), 1355–1369. <https://doi.org/10.1111/tpj.16430>
- Khan, M. I. R., Poor, P., & Janda, T. (2022). Salicylic Acid: A Versatile Signaling Molecule in Plants. In *Journal of Plant Growth Regulation* (Vol. 41, Number 5, pp. 1887–1890). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10692-4>
- Krzewska, M., Dubas, E., Gołębiowska, G., Nowicka, A., Janas, A., Zieliński, K., Surówka, E., Kopeć, P., Mielczarek, P., & Żur, I. (2021). Comparative proteomic analysis provides new insights into regulation of microspore embryogenesis induction in winter triticale ($\times$ *Triticosecale* Wittm.) after 5-azacytidine treatment. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01671-y>
- Kumar, L., & Futschik, M. (2007). Software Mfuzz: A software package for soft clustering of microarray data. *Bioinformatics*, 2(1), 5–7. <http://itb1.biologie.hu-berlin.de/~futschik/software/R/Mfuzz/index.html>.
- Lee, S., Bae, S. H., Jeon, Y., Seo, P. J., & Choi, Y. (2024a). DEMETER DNA demethylase reshapes the global DNA methylation landscape and controls cell identity transition during plant regeneration. *BMC Genomics*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-024-11144-x>

- Lee, S., Bae, S. H., Jeon, Y., Seo, P. J., & Choi, Y. (2024b). DEMETER DNA demethylase reshapes the global DNA methylation landscape and controls cell identity transition during plant regeneration. *BMC Genomics*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-024-11144-x>
- Li, M., Wrobel-Marek, J., Heidmann, I., Horstman, A., Chen, B., Reis, R., Angenent, G. C., & Boutilier, K. (2022). Auxin biosynthesis maintains embryo identity and growth during BABY BOOM-induced somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 188(2), 1095–1110. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab558>
- Loschiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S., & Terzi, M. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. In *Theor Appl Genet* (Vol. 77).
- LUCENA, C. C., GERUM, A. F. A. de A., SANTANA, M. do A., & SOUZA, J. da S. (2021). *Aspectos socioeconômicos. Cap. 1 in: A Cultura do Mamoeiro* (EMBRAPA, Ed.; 1). <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1150328/1/A-CULTURA-MAMOEIRO-ed01-2021-cap-1.pdf>
- Markulin, L., Škiljaica, A., Tokić, M., Jagić, M., Vuk, T., Bauer, N., & Leljak Levanić, D. (2021). Taking the Wheel – de novo DNA Methylation as a Driving Force of Plant Embryonic Development. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.764999>
- Martínez, M., & Corredoira, E. (2024). Recent Advances in Plant Somatic Embryogenesis: Where We Stand and Where to Go? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Number 16). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25168912>
- Martins, J. P. R., Wawrzyniak, M. K., Kalembe, E. M., Ley-López, J. M., Mendes, M. M., Naskręt-Barciszewska, M. Z., Barciszewski, J., & Chmielarz, P. (2024). Differential morphophysiological and epigenetic responses during *in vitro* multiplication of *Quercus robur* depending on donor age and plant growth regulators. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 159(3). <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02914-2>
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-La-Peña, C., & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling overview of plant somatic

- embryogenesis. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-la-Peña, C., & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>
- Mentch, S. J., Mehrmohamadi, M., Huang, L., Liu, X., Gupta, D., Mattocks, D., Gómez Padilla, P., Ables, G., Bamman, M. M., Thalacker-Mercer, A. E., Nichenametla, S. N., & Locasale, J. W. (2015). Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism. *Cell Metabolism*, 22(5), 861–873. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.024>
- Ministério da Agricultura (MAPA). (2024). *Registro nacional de cultivares*. https://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php
- Mohamed Elhiti, Claudio Stasolla, & Aiming Wang. (2013). Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11627-013-9547-3>
- Munksgaard, D., Mattsson, O., & Okkels, F. T. (1995). Somatic embryo development in carrot is associated with an increase in levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and DNA methylation. *Physiologia Plantarum*, 93(1), 5–10. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1995.930102.x>
- Musiłek, M. W., & Rybaczek, D. (2021). Hydroxyurea-The Good, the Bad and the Ugly. *Genes*, 12, 1096. <https://doi.org/10.3390/genes>
- Mustafa, A. H. M., & Krämer, O. H. (2021). Novel insight into mechanisms for ATR activation by chromatin structures. In *Archives of Toxicology* (Vol. 95, Number 10, pp. 3433–3434). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03133-w>
- Mustafa YILDIZ, Çağlayan SAĞLIK, Cansu TELCİ, & Emine Gülden ERKILIÇ. (2011). The effect of in vitro competition on shoot regeneration from hypocotyl explants of *Linum usitatissimum*. *Turkish Journal of Botany*, 35(3). <https://doi.org/10.3906/bot-1005-26>

- Nanjo, Y., Skultety, L., Uváčková, L., Klubicová, K., Hajduch, M., & Komatsu, S. (2012). Mass Spectrometry-Based Analysis of Proteomic Changes in the Root Tips of Flooded Soybean Seedlings. *Journal of Proteome Research*, 11(1), 372–385. <https://doi.org/10.1021/pr200701y>
- Nic-Can, G. I., & De La Peña, C. (2014). Epigenetic advances on somatic embryogenesis of agronomical and important crops. In *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications: Transcriptional Regulation and Chromatin Remodelling in Plants* (pp. 91–109). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-07971-4_6
- Nic-Can, G. I., López-Torres, A., Barredo-Pool, F., Wrobel, K., Loyola-Vargas, V. M., Rojas-Herrera, R., & De-la-Peña, C. (2013). New Insights into Somatic Embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4 Are Epigenetically Regulated in Coffea canephora. *PLoS ONE*, 8(8), e72160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072160>
- Nic-Can, G. I., & Loyola-Vargas, V. M. (2016). The Role of the Auxins During Somatic Embryogenesis. In *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* (pp. 171–182). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_10
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), & F. and 8 A. O. (FAO). (2025). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2025-9 2034: Chapter 10 (Other products)*. Em OECD-FAO Agricultural Outlook 2025-2034. <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cd6043en>
- Osorio-Montalvo, P., De-la-Peña, C., Oropeza, C., Nic-Can, G., Córdova-Lara, I., Castillo-Castro, E., & Sáenz-Carbonell, L. (2020). A peak in global DNA methylation is a key step to initiate the somatic embryogenesis of coconut palm (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell Reports*, 39(10), 1345–1357. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02568-2>
- Osorio-Montalvo, P., Sáenz-Carbonell, L., & De-la-Peña, C. (2018). 5-azacytidine: A promoter of epigenetic changes in the quest to improve plant somatic embryogenesis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Number 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19103182>
- Pais, M. S. (2019). Somatic embryogenesis induction in woody species: The future after OMICs data assessment. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00240>

- Paz, N. E., Carneros, E., Pintos, B., & Testillano, P. S. (2025). Targeting histone acetylation to enhance somatic embryogenesis in *Quercus suber* L. *Tree Physiology*. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaf111>
- Peng, J., Zhang, Q., Tang, L. P., Xu, B. J., Laux, T., Zhang, X. S., & Su, Y. H. (2025). LEC2 induces somatic cell reprogramming through epigenetic activation of plant cell totipotency regulators. *Nature Communications*, 16(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-025-59335-8>
- Peng, J., Zhang, W. J., Zhang, Q., Su, Y. H., & Tang, L. P. (2023). The dynamics of chromatin states mediated by epigenetic modifications during somatic cell reprogramming. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1097780>
- Pereira Duarte, R., Cancela Ramos, H. C., Rodrigues Xavier, L., Azevedo Vimercati Pirovani, A., Souza Rodrigues, A., Turquetti-Moraes, D. K., Rodrigues da Silva Junior, I., Motta Venâncio, T., Silveira, V., & Gonzaga Pereira, M. (2024). Comparative proteomic analysis of papaya bud flowers reveals metabolic signatures and pathways driving hermaphrodite development. *Scientific Reports*, 14(1), 8867. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59306-x>
- Pereira, M. G., Catarina, R. S., Ramos, H. C., & Viana, A. P. (2025). Functional Papaya Breeding Program: Strategies, Achievements and Challenges. *Fruit Crops Science Journal*, 1. <https://doi.org/10.1590/3085-89092025002>
- Pigozzi, M. T., Silva, V. M., Mendes, F. Q., Oliveira, I. R. N. de, Moraes, A. R. F. e, & Lopes, E. A. (2021). Post-harvest quality of papaya coated with polivinilic alcohol and maize starch. *Ciência e Agrotecnologia*, 45. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202145019120>
- R Core Team. (2025). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. <https://www.gnu.org/copyleft/gpl.html>.
- Ramakrishnan, M., Zhou, M., Ceasar, S. A., Ali, D. J., Maharajan, T., Vinod, K. K., Sharma, A., Ahmad, Z., & Wei, Q. (2023). Epigenetic modifications and miRNAs determine the transition of somatic cells into somatic embryos. In *Plant Cell Reports* (Vol. 42, Number 12, pp. 1845–1873). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00299-023-03071-0>

- Rehman, M., Saeed, M. S., Fan, X., Salam, A., Munir, R., Yasin, M. U., Khan, A. R., Muhammad, S., Ali, B., Ali, I., Khan, J., & Gan, Y. (2023). The Multifaceted Role of Jasmonic Acid in Plant Stress Mitigation: An Overview. In *Plants* (Vol. 12, Number 23). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/plants12233982>
- Rohit Joshi, & Paramod Kumar. (2013). Regulation of somatic embryogenesis in crops: a review. *Agricultural Reviews*, 34(1), 1–20.
- Rudolf, J., Tomovicova, L., Panzarova, K., Fajkus, J., Hejatko, J., & Skalak, J. (2024). Epigenetics and plant hormone dynamics: a functional and methodological perspective. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae054>
- Salinas, I., Salehi, M., Hueso, J. J., & Cuevas, J. (2018). Assessment of two sex-determining procedures in ‘BH-65’ papaya from an economical and developmental point of view. *Fruits*, 73(3), 184–190. <https://doi.org/10.17660/th2018/73.3.5>
- Santos, A. P., Ferreira, L. J., & Oliveira, M. M. (2017). Concerted flexibility of chromatin structure, methylome, and histone modifications along with plant stress responses. In *Biology* (Vol. 6, Number 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology6010003>
- Schmidt, O., Schmidt, E. R., Alexandre, R. S., de Oliveira, M. J. V., Ferreguetti, G. A., Nascimento, A. L., & dos Santos, K. T. H. (2019). Mini-cutting of hermaphrodite papaya “Golden” with auxin inductor in semi-hydroponic system. *Revista de Ciencias Agroveterinarias*, 18(4), 499–506. <https://doi.org/10.5965/223811711832019499>
- Singh, A., & Xu, Y. J. (2016). The cell killing mechanisms of hydroxyurea. In *Genes* (Vol. 7, Number 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes7110099>
- Sivanesan, I., Nayeem, S., Venkidasamy, B., Kuppuraj, S. P., Rn, C., & Samynathan, R. (2022). Genetic and epigenetic modes of the regulation of somatic embryogenesis: a review. In *Biologia Futura* (Vol. 73, Number 3, pp. 259–277). Akademiai Kiado ZRt. <https://doi.org/10.1007/s42977-022-00126-3>
- Solís, M. T., El-Tantawy, A. A., Cano, V., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2015a). 5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in

- rapeseed and barley. *Frontiers in Plant Science*, 6(JUNE).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00472>
- Solís, M. T., El-Tantawy, A. A., Cano, V., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2015b). 5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. *Frontiers in Plant Science*, 6(JUNE).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00472>
- Song, Y., Tian, M., Ci, D., & Zhang, D. (2015). Methylation of microRNA genes regulates gene expression in bisexual flower development in andromonoecious poplar. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1891–1905.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru531>
- Steward, F. C., Mapes, M. O., & Smith, J. (1958). Growth and Organized Development of Cultured Cells. I. Growth and Division of Freely Suspended Cells. *American Journal of Botany*, 45(9), 693.
<https://doi.org/10.2307/2439507>
- Su, Y. H., Liu, Y. B., & Zhang, X. S. (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. In *Molecular Plant* (Vol. 4, Number 4, pp. 616–625). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr007>
- Su, Y. H., Tang, L. P., Zhao, X. Y., & Zhang, X. S. (2021). Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. In *Journal of Integrative Plant Biology* (Vol. 63, Number 1, pp. 228–243). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1111/jipb.12972>
- Teyssier, C., Maury, S., Beaufour, M., Grondin, C., Delaunay, A., Le Metté, C., Ader, K., Cadene, M., Label, P., & Lelu-Walter, M. A. (2014). In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix × eurolepis*): Global DNA methylation and proteomic analyses. *Physiologia Plantarum*, 150(2), 271–291.
<https://doi.org/10.1111/ppl.12081>
- Thomas, D., Rothstein, R., Rosenberg, N., & Kerjanl, Y. S. (1988). SAM2 Encodes the Second Methionine S-Adenosyl Transferase in *Saccharomyces cerevisiae*: Physiology and Regulation of Both Enzymes. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 8, Number 12).
- Tomasiak, A., Sala-Cholewa, K., Berg, L. S., Braszewska, A., & Betekhtin, A. (2023). Global epigenetic analysis revealed dynamic fluctuations in levels of DNA

- methylation and histone modifications in the calli of *Fagopyrum* with different capacity for morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 155(3), 743–757. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02595-3>
- Vale, E. M., Reis, R. S., Passamani, L. Z., Santa-Catarina, C., & Silveira, V. (2018). Morphological analyses and variation in carbohydrate content during the maturation of somatic embryos of *Carica papaya*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(2), 295–305. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0501-4>
- Vale, E. M., Santana, D. B., Reis, R. S., Sousa, K. R., de Souza Filho, G. A., Oliveira, J. G. de, Santa-Catarina, C., & Silveira, V. (2022). Mitochondrial proteomics reveals new insights into embryogenic competence acquisition in *Carica papaya* L. callus. *Journal of Proteomics*, 252. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104434>
- Vettorazzi, J. C. F., Santa-Catarina, R., Poltronieri, T. P. de S., Cortes, D. F. M., Azevedo, A. O. N., Miranda, D. P., Santana, J. G. S., Ramos, H. C. C., & Pereira, M. G. (2021). Combining ability of recombined F4 papaya lines: a strategy to select hybrid combination. *Scientia Agricola*, 78(2). <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2019-0191>
- Vives-Peris, V., López-Climent, M. F., Moliner-Sabater, M., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2023). Morphological, physiological, and molecular scion traits are determinant for salt-stress tolerance of grafted citrus plants. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1145625>
- von Arnold, S., Alsterborg, E., & Walles, B. (1988). Micromorphological studies of adventitious bud formation on *Picea abies* embryos treated with cytokinin. *Physiologia Plantarum*, 72(2), 248–256. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb05830.x>
- Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., & Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*, 6(5), 359–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1322>
- Wójcik, A. M., Krypczyk, K., Buchcik, W. M., & Gaj, M. D. (2025). From root to embryogenic transition: WOX5 reprograms plant somatic cells via auxin-mediated pathways. *BMC Plant Biology*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06687-4>

- Wójcikowska, B., Wójcik, A. M., & Gaj, M. D. (2020). Epigenetic Regulation of Auxin-Induced Somatic Embryogenesis in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2307. <https://doi.org/10.3390/IJMS21072307>
- Wozniak, K. J., & Simmons, L. A. (2021). Hydroxyurea induces a stress response that alters DNA replication and nucleotide metabolism in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 203(15). <https://doi.org/10.1128/JB.00171-21>
- Xavier, L. R., Corrêa, C. C. G., da Paschoa, R. P., Vieira, K. da S., Pacheco, D. D. R., Gomes, L. do E. S., Duncan, B. C., da Conceição, L. dos S., Pinto, V. B., Santa-Catarina, C., & Silveira, V. (2023). Time-Dependent Proteomic Signatures Associated with Embryogenic Callus Induction in *Carica papaya* L. *Plants*, 12(22). <https://doi.org/10.3390/plants12223891>
- Yamamuro, C., Zhu, J. K., & Yang, Z. (2016). Epigenetic Modifications and Plant Hormone Action. In *Molecular Plant* (Vol. 9, Number 1, pp. 57–70). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.10.008>
- Yie, S.-T., & Liaw, S. I. (1977). Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. *In Vitro*, 13(9), 564–568. <https://doi.org/10.1007/BF02627852>
- Yuan, G., Wang, D., Yu, C., Hua, J., Yin, Y., & Chen, T. (2025). 5-AzaCytidine Promotes Somatic Embryogenesis of Taxodium Hybrid ‘Zhongshanshan’ by Regulating Redox Homeostasis. *Plants*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/plants14091354>
- Żabka, A., Gocek, N., Polit, J. T., & Maszewski, J. (2023). Epigenetic modifications evidenced by isolation of proteins on nascent DNA and immunofluorescence in hydroxyurea-treated root meristem cells of *Vicia faba*. *Planta*, 258(5). <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04249-2>
- Zemach, A., Kim, M. Y., Silva, P., Rodrigues, J. A., Dotson, B., Brooks, M. D., & Zilberman, D. (2010). Local DNA hypomethylation activates genes in rice endosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(43), 18729–18734. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009695107>
- Zhang, N. (2018). Role of methionine on epigenetic modification of DNA methylation and gene expression in animals. *Animal Nutrition*, 4(1), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.009>

- Zhu, Q., Yang, Q., Lu, X., Wang, H., Tong, L., Li, Z., Liu, G., Bao, Y., Xu, X., Gu, L., Yuan, J., Liu, X., & Zhu, W.-G. (2021). SETD2-mediated H3K14 trimethylation promotes ATR activation and stalled replication fork restart in response to DNA replication stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(23). <https://doi.org/10.1073/pnas.2011278118>
- Zluvova, J., Janousek, B., & Vyskot, B. (2001). Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *Journal of Experimental Botany*, 52(365), 2265–2273. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.365.2265>
- Zou, Y., Zhang, L., Rao, S., Zhu, X., Ye, L., Chen, W., & Li, X. (2014). The Relationship between the Expression of Ethylene-Related Genes and Papaya Fruit Ripening Disorder Caused by Chilling Injury. *PLoS ONE*, 9(12), e116002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116002>