

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

ISAAC ROMANI

**Expressão diferencial de proteínas em embriões de linhagens de milho pipoca (*Zea mays* L.) com elevada e baixa capacidade de expansão**

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
AGOSTO – 2014

ISAAC ROMANI

**Expressão diferencial de proteínas em embriões de linhagens de milho pipoca (*Zea mays* L.) com elevada e baixa capacidade de expansão**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento.

Orietadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Gonela.

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
AGOSTO – 2014

## FOLHA DE APROVAÇÃO

À minha Família, de modo especial aos meus pais, Leacir e Vilma, que me concederam o dom da vida e sempre me educaram e motivaram para hoje concluir mais esta etapa da vida.

Às minhas irmãs, Débora, Raquel e Sarah; aos meus cunhados e sobrinhas, pela amizade, compreensão e estímulo.

Aos meus amigos, que a vida possibilitou estarem ao meu lado durante o período de realização do Curso de Doutorado.

Com muita alegria e carinho, dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela graça de ter uma família, por ter sempre estado ao meu lado nos momentos em que mais necessitei de força e amparo.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela oportunidade concedida para a realização do Curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos.

À professora doutora Adriana Gonela, pela orientação, ensinamentos, confiança e amizade.

À professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, pela coorientação, ensinamentos, confiança e amizade.

Ao professor doutor Carlos Alberto Scapim, pela coorientação concedida durante todo o período de desenvolvimento do projeto de pesquisa, pelo fornecimento das linhagens de milho pipoca, pelos ensinamentos, pela confiança e amizade.

À professora doutora Marise Fonseca dos Santos, pela coorientação durante o período inicial de desenvolvimento do projeto de pesquisa, ensinamentos, confiança e amizade.

Ao professor doutor Gilberto Barbosa Domont (UFRJ), por ter aberto as portas do seu laboratório e me inserido temporariamente em seu grupo de pesquisa, pelos conselhos, encorajamentos e amizade.

Ao professor doutor Fábio César Sousa Nogueira (UFRJ), pela supervisão e coorientação durante a realização dos meus experimentos no laboratório de Química de proteínas e Unidade proteômica (UFRJ), assim como pelos ensinamentos, encorajamentos, pela paciência, dedicação e amizade.

Ao professor doutor Paulo C. Carvalho (FIOCRUZ-PR), pela supervisão durante as análises dos dados, pela paciência e companheirismo.

Aos demais professores que durante o Curso de Doutorado ministraram disciplinas, possibilitando a ampliação do conhecimento para desenvolvimento desta tese.

Aos demais professores que auxiliaram durante todo o desenvolvimento do projeto de pesquisa, Adriana Fiorini, Arildo José Braz de Oliveira, Eliezer Rodrigues

de Souto, José Walter Pedrosa, Luiz Antônio de Souza, Makoto Matsushta, Odair José Marques, Osvaldo Ferrarese Filho e Paula Adriana Grande.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Francisco José da Cruz e Valquíria Magro, pela colaboração.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa aplicada a Agricultura (NUPAGRI/UEM) e da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI / CCA / UEM), em especial, ao Edmilson, Engraci, José e Rogério.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação, que ajudaram na implantação dos campos experimentais e na realização dos tratamentos culturais, de modo especial, ao Klayton e Marlon.

Aos amigos do Laboratório de Genômica e expressão (LaGEx – UEM), pela ajuda fornecida em todas as etapas da pesquisa, Aline, Anderson, Hans, Jhonathan, Julian, Luciana, Natália, Priscila, Talita, Thiago e Wagner.

Aos amigos do Laboratório de Química de proteínas e Unidade proteômica – UFRJ, Erika, Gabriel, Isabel, Jimmy, Livia, Magno, Priscila, Rafael e Renata.

Aos amigos Giseli, Giselly, Gislaine, Julio, Lorena, Maria Paula, Marilda, Rodrigo, Sandra, Vanesca, Vanusa e demais colegas do Núcleo de Pesquisa Aplicada a Agricultura, pela amizade, companheirismo e dedicação em todos os momentos.

Aos amigos da Faculdade Ingá (Uningá), inicialmente à coordenadora do Curso, professora Rafaela Ferrari e professores Andressa, Denise, Juliana, Leandro e Michelle.

Aos meus alunos, pelo incentivo, amizade e companheirismo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, *Muito obrigado !!!*

## BIOGRAFIA

Isaac Romani, filho de Leacir Romani e de Vilma Trentini Romani, nasceu em 27 de Janeiro de 1983, na cidade de Palotina, estado Paraná.

Concluiu, no ano de 1997, o Ensino Fundamental, no colégio Estadual Santo Agostinho, na cidade de Palotina, estado do Paraná. Na mesma Instituição de Ensino, no ano de 2001, concluiu o Ensino Médio.

Em fevereiro de 2001, iniciou o Curso de Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia (Licenciatura e Bacharelado), na Universidade Paranaense, Campus de Toledo, estado do Paraná. Diplomou-se, em 2004, realizando trabalho de conclusão de curso sob o título “Uso de células tronco embrionárias e adultas para cura de diabetes tipo I”. Neste período, desenvolveu atividade de monitoria na disciplina de Biologia Celular e Molecular.

Iniciou, em fevereiro de 2005, o Curso de Especialização em Biotecnologia e Análise da Biodiversidade, área de concentração em Cultura de Tecidos Vegetais, pela Universidade Paranaense, Campus de Toledo, obtendo o título de especialista no ano de 2006, com monografia intitulada “Cultura de anteras em cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal)”.

No início do ano de 2007, ingressou no Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Vegetal, nível de Mestrado, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), linha de pesquisa em Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento Vegetal. Concluiu o Curso em Julho de 2009, obtendo o título de Mestre com Dissertação “Diversidade genética em germoplasma de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) oriundo dos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e Santa Catarina”.

No início do ano de 2010, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Vegetal, nível de Doutorado, da Universidade Estadual de Maringá na linha de pesquisa Genética de Microorganismos e Biologia Molecular com projeto de pesquisa relacionado à análise proteômica em linhagens de milho pipoca (*Zea mays* L.).

Desde 2003, atuou como docente no Colégio Centro de Excelência em Educação, na cidade de Palotina -PR, ministrando as disciplinas de Ciências, para o Ensino Fundamental II, e Biologia, para Ensino Médio e Pré-Vestibular. Em 2009, iniciou sua carreira de docente em Curso Superior, atuando como professor auxiliar da Universidade Federal do Paraná, Campus de Palotina, ministrando as disciplinas

de Citologia, Embriologia e Histologia Veterinária, para o curso de Medicina Veterinária, e Biologia Celular, para o curso de Ciências Biológicas.

Atualmente, é professor adjunto das disciplinas de Fisiologia I e II, Embriologia, Bioestatística e Genética e Melhoramento Animal para o Curso de Medicina Veterinária da Faculdade Ingá (Uningá), na cidade de Maringá, estado do Paraná.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
2.1. Aspectos econômicos da cultura .....	4
2.2. Características morfológicas e agrônômicas .....	5
2.3. Características físico-químicas de sementes de milho pipoca associadas à capacidade de expansão .....	6
2.4. Embriogênese em milho .....	9
2.5. Proteômica e obtenção das amostras.....	10
2.6. Proteômica quantitativa .....	13
2.7. Análise proteômica em milho .....	17
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO I - Proteômica quantitativa baseada em itraq® em embriões de linhagens de milho pipoca com diferentes capacidades de expansão</b>	<b>32</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>32</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
2.1. Padronização da metodologia de extração de proteínas de embriões de sementes de milho pipoca .....	38
2.1.1. Material Vegetal .....	38
2.1.2. Avaliação de metodologias de extração de proteínas de embriões .....	38
2.2. Proteômica quantitativa baseada em espectrometria de massa.....	41
2.2.1. Material vegetal .....	41
2.2.2. Preparo das amostras .....	42
2.2.3. Quantificação, digestão e limpeza das amostras .....	43
2.2.4. Marcação dos peptídeos .....	43
2.2.5. Limpeza e pré-fracionamento das amostras após marcação isobárica .....	44
2.2.6. Espectrometria de massa.....	45
2.2.7. Análise dos dados .....	46
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>

3.1. Padronização da extração de proteínas de embrião de sementes de milho pipoca .....	49
3.2. Proteínas extraídas de embriões de milho pipoca .....	52
3.3. Proteoma quantitativo baseado em espectrometria de massa .....	53
3.4. Função biológica, molecular e componentes celulares associados às proteínas identificadas nos embriões .....	56
3.4.1. Função molecular e componentes celulares .....	57
3.4.2. Função biológica .....	59
3.5. Análise das proteínas identificadas em embriões de milho pipoca em diferentes vias metabólicas .....	64
3.6. Marcação isobárica iTRAQ .....	68
3.7. Proteínas que reduziram a expressão entre as linhagens de milho pipoca P11 e P16 .....	71
3.8. Proteínas que aumentaram sua expressão entre as linhagens de milho pipoca P11 e P16 .....	90
3.9. Proteômica da capacidade de expansão .....	96
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>100</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>101</b>
<b>CAPÍTULO II - Proteômica quantitativa na embriogênese de sementes de milho pipoca baseada em iTRAQ .....</b>	<b>113</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>113</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>116</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>119</b>
2.1. Material vegetal .....	119
2.2. Preparo das amostras.....	119
2.3. Marcação dos peptídeos com isóbaros .....	120
2.4. Limpeza e pré-fracionamento das amostras após marcação isobárica .....	121
2.5. Espectrometria de massa .....	122
2.6. Análise dos dados .....	123
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>125</b>
3.1. Proteínas expressas de forma diferenciada exclusivamente na linhagem P11 .....	127
3.2. Proteínas expressas diferencialmente exclusivamente na linhagem P16 ....	129

3.3. Proteínas comuns expressas diferencialmente nas duas linhagens de milho pipoca .....	139
3.4. Proteínas comuns expressas diferencialmente nas duas linhagens, nas duas épocas de coleta.....	146
3.5. Proteínas comuns com expressão diminuída entre todas as comparações de tratamentos analisados.....	148
3.6. Proteínas comuns com expressão aumentada entre todas as comparações de tratamentos analisados.....	152
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>165</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>166</b>

## RESUMO

ROMANI, Isaac, Dr. Universidade Estadual de Maringá, Março de 2014. **Expressão diferencial de proteínas em embriões de linhagens de milho pipoca (*Zea mays* L.) com elevada e baixa capacidade de expansão.** Orientadora: Adriana Gonela. Conselheiros: Carlos Alberto Scapim, Claudete Aparecida Mangolin e Marise Fonseca dos Santos.

O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo sobre a expressão diferencial de proteínas em duas linhagens de milho pipoca, sendo uma delas com elevada capacidade de expansão (P11) e outra com baixa capacidade de expansão (P16), por meio da abordagem proteômica *Shotgun*. Foram identificadas 1.189 proteínas expressas em embriões que em sua maioria apresentaram função molecular de atividade catalítica e que constituem em grande parte, componentes celulares do citoplasma e das membranas celulares. As anotações funcionais revelaram 103 diferentes funções biológicas, alocadas em 26 grandes grupos funcionais, onde se destacam proteínas ligadas às funções de processos metabólicos. A análise destas proteínas nas vias metabólicas relevou que a grande maioria corresponde a vias metabólicas de carboidratos, aminoácidos e vias de biossíntese. A expressão diferencial dessas proteínas, durante o processo de embriogênese entre as linhagens, revelou que 4, 127 e 30 proteínas diminuíram sua expressão na linhagem P11, P16 e em ambas as linhagens, respectivamente. Na linhagem P11, ocorreu a diminuição da expressão de proteínas da via metabólica de proteínas. Por outro lado, na linhagem P16, houve redução na expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo de DNA, RNA, proteínas e ciclo do ácido tricarboxílico. As proteínas que diminuíram sua expressão em ambas linhagens também apresentam funções relacionadas ao metabolismo de proteínas, DNA, carbono e ácidos graxos. Observou-se que 9, 7 e 34 proteínas aumentaram sua expressão na linhagem P11, P16 e em ambas, respectivamente. Dentre as proteínas que apresentaram aumento na expressão tem-se: proteínas de armazenamento (*vicilin*, *oleosin*), proteínas que se acumulam conforme avança o processo de embriogênese (*embryonic protein*, *late embryogenesis abundant protein*), proteínas de transporte (proteína e lipídios), metabolismo do carbono e ácidos graxos. Considerando que em embriões a via metabólica de lipídios é importante para prover a síntese e armazenamento deste, mediante buscas realizadas no Kegg – Search & Colors Pathways, foi possível

observar que 18 proteínas estão associadas à via metabólica de lipídios. Duas isoformas de *enoyl-reductase* foram encontradas diminuindo sua expressão na linhagem P16 quando comparada à P11. Embora, a identificação de proteínas relacionadas à capacidade de expansão não tenha sido consistente, este trabalho fornece importantes direcionamentos para novas análises de proteoma diferencial em embriões, endospermas e pericarpos de milho pipoca, que juntamente com avaliações dos componentes químicos das sementes, possibilitarão importantes avanços nos programas de melhoramento genético desta cultura.

Palavras-chave: Milho pipoca, *Zea mays* (L.), proteômica diferencial, capacidade de expansão, embriogênese, iTRAQ.

## ABSTRACT

ROMANI, Isaac, Dr. Universidade Estadual de Maringá, August 2014. **Differential expression of proteins in embryos of maize popcorn lines (*Zea mays* L.) with high and low expansion capacity.** Adviser: Adriana Gonela. Committee Members: Carlos Alberto Scapim, Claudete Aparecida Mangolin and Marise Fonseca dos Santos.

The purpose of this work was to conduct a study on the differential expression of proteins in two different lines of popcorn, one of them with high expansion capacity (P11) and one with low expansion capacity (P16), through the *Shotgun* proteomics approach. A total of 1,189 proteins were identified expressed in embryos that mostly presented catalytic activity as their molecular function, and that largely constitute cellular components of the cytoplasm and cell membranes. Functional annotations revealed 103 different biological functions, allocated into 26 major functional groups, where proteins linked to functions of metabolic processes stand out. Analysis of these proteins in metabolic pathways revealed that the great majority correspond to metabolic pathways of carbohydrates, amino acids and of biosynthesis. The differential expression of these protein, during the process of embryogenesis between lines, revealed that 4, 127 and 30 proteins decreased expression in line P11, P16 and both, respectively. On line P11, there was a decrease in protein expression of the metabolic protein pathway. On the other hand, line P16 showed decreased expression of proteins related to the metabolism of DNA, RNA, proteins and tricarboxylic acid cycle. Proteins that decreased their expression in both lines also show functions related to the metabolism of proteins, DNA, carbon and fatty acids. It was observed that 9, 7 and 34 proteins increased their expression on line P11, P16 and both, respectively. Among proteins that exhibited increased expression are: storage proteins (*vicilin, oleosin*), proteins that accumulate as the embryogenesis process advances (*embryonic protein, late embryogenesis abundant protein*), transport proteins (*protein and lipids*), carbon metabolism and fatty acids. Given that in embryos the metabolic pathway of lipids is important to provide synthesis and storage for itself, through searches performed on Kregg – Search & Colors Pathways, It was possible to observe that 18 proteins are associated to the metabolic pathway of lipids. Two isoforms of *enoyl-reductase* were found decreasing their expression in line P16 when compared to P11. Although the identification of

proteins linked to expansion capacity has not been consistent, this study provides important directions for further analysis of differential proteome in embryo, endosperm and the pericarp of popcorn kernels, which along with a chemical assessment of seed components will enable important advances in genetic improvement programs for this crop.

Keywords: Popcorn, *Zea mays* (L.), differential proteomics, expansion capacity, embryogenesis, iTRAQ.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O milho pipoca (*Zea mays* L.) destaca-se por ser uma cultura utilizada exclusivamente na alimentação humana. Classificado como um tipo especial de milho, diferencia-se dos demais principalmente por suas sementes terem a capacidade de estourar quando aquecidas a uma temperatura de aproximadamente 180°C, formando a pipoca (Sawazaki, 2001). Esta característica é denominada Capacidade de Expansão (CE) e, quanto maior for, melhor será a qualidade da pipoca e, conseqüentemente, maior o seu valor comercial. Uma cultivar é classificada com alta CE quando o índice de capacidade de expansão (ICE) for maior que 30 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> (Sawazaki, 2001).

A CE é uma característica poligênica, com estimativas de herdabilidade variando de 70% a 90% (Zanette, 1989; Pacheco et al., 1998; Coimbra et al., 2001; Pereira e Amaral Júnior, 2001). Essa capacidade está relacionada à resistência do pericarpo, associada à presença de óleo (Zinsly e Machado, 1987; Luz et al., 2005) e umidade na semente (Song e Eckhoff, 1994 a,b; Luz et al., 2005). A CE pode ser afetada pelos efeitos do genótipo (Song et al., 1991; Kandala et al., 1994; Tian et al., 2001), densidade da semente (Park e Maga, 2002), tamanho da semente (Song et al., 1991), danos no pericarpo e endosperma (Park e Maga, 2002; Singh et al., 2004), matriz e textura do endosperma (Bandel, 1987), tipo de amido (Mercier e Feillet, 1975; Robbins Jr. e Ashman, 1984; Rooney e Serna-Saldívar, 1987; Zhang e Hosney, 1998), quantidade e tipo de proteínas que compõem o endosperma (Wilson, 1987; Borrás et al., 2006), condições de armazenamento (Park e Maga, 2002), temperatura do pipocamento (Song et al., 1991) e pelo equipamento de avaliação (Dofing et al., 1991; Machado, 1997).

Os programas de melhoramento da cultura visam, além da alta produtividade, à obtenção de híbridos com alta capacidade de expansão (Sweley et al., 2012). As técnicas de biotecnologia podem ser utilizadas para auxiliar o melhorista na obtenção de cultivares em um tempo menor, atuando de forma mais precisa na identificação e transferência de genes de interesse. Atualmente, a proteômica pode ser utilizada auxiliando os programas de melhoramento genético.

A proteômica é uma metodologia de seleção da biologia molecular que, além de documentar, identificar e caracterizar proteínas, tem a função de elucidar as suas



associações e funções, além de quantificar com precisão mudanças na expressão de proteínas em resposta a uma variedade de alterações na expressão das mesmas (Di Cierro e Bellato, 2002; Elliott et al., 2009).

O progresso nos estudos proteômicos tem sido impulsionado pelo desenvolvimento de tecnologias de separação de proteínas e peptídeos, análises em espectrometria de massas, marcação isotópica para quantificação e análise de dados pela bioinformática (Zhang et al., 2013).

A análise proteômica pode ser realizada por meio de duas estratégias. A estratégia *Bottom-up*, que se refere à caracterização de proteínas a partir da obtenção de peptídeos por meio de uma reação de proteólise, também denominada de *Shotgun* (Zhang et al., 2013), e a estratégia *Top-down*, cujo objetivo reside na análise de proteínas intactas, visando à análise de modificações pós-traducionais e o estudo de isoformas.

Independente da ferramenta adotada, a proteômica quantitativa, segundo Elliot et al. (2009), pode ser classificada em dois tipos: a) absoluta, na qual se determina mudanças na expressão da proteína em termos de uma quantidade ou concentração exata de cada uma das proteínas presentes, e b) relativa, que determina o nível de expressão de proteínas, baseado em uma amostra controle ou comparativa.

Com o objetivo de aperfeiçoar as análises quantitativas, no ano de 2004, foi desenvolvida uma técnica de identificação de proteínas sem a utilização de géis, baseada em marcação isotópica. Essa nova técnica recebe o nome de iTRAQ (Marcação isobárica para quantificação relativa e absoluta) (Ross et al., 2004; Qin et al., 2013).

Na cultura do milho, as análises proteômicas tiveram início em 2001, com o trabalho de Porubleva e colaboradores, que estabeleceram metodologias para a análise proteômica em folhas, utilizando sequência de genes e etiquetas de sequências expressas (ESTs) para identificação destas proteínas na cultura. Posteriormente, foram realizadas análises referentes ao perfil proteico de raízes secundárias do milho quando submetidas a estresse hídrico (Hochholdinger et al., 2004 e 2005; Sauer et al., 2006) e oxidativo (Requejo e Tena, 2005) e expressão diferencial frente à infestação por patógenos (George et al., 2011).

Atualmente, é bem visível a aplicação da análise proteômica em milho, no que se refere à biotecnologia, como, por exemplo, no estudo realizado por Sun et al.

(2013), que avaliou proteínas diferentemente expressas durante a embriogênese somática via cultura de tecidos e sua aplicação no melhoramento genético vegetal. Outro estudo foi realizado utilizando a proteômica para avaliar as diferentes proteínas expressas durante a germinação entre um híbrido e suas linhagens parentais (Guo et al., 2013).

Posteriormente, Chen et al. (2002) avaliaram o perfil proteico de embriões de milho comum em genótipos resistentes e suscetíveis a *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Campo et al. (2004) avaliaram a expressão de proteínas em embriões após infecção por *Fusarium verticillioides*.

O primeiro mapa proteômico do endosperma de milho foi obtido por Méchin et al. (2004). Posteriormente, Grimaud et al. (2008) conduziram análises no endosperma, objetivando a avaliação das vias de biossíntese do amido. Liu et al. (2009 a, b) analisaram as vias metabólicas relacionadas ao teor de óleo.

Silva-Sanches et al. (2013) avaliaram o perfil proteico relacionado aos estádios de desenvolvimento. Sun et al. (2013) analisaram proteínas diferentemente expressas durante a embriogênese somática e sua aplicação no melhoramento genético vegetal. Por fim, Guo et al. (2013) utilizaram a proteômica para avaliar as diferentes proteínas expressas durante a germinação entre um híbrido e suas linhagens parentais e Robbins et al. (2013) analisaram o perfil proteico de pericarpos de sementes de milho.

Tendo por base o descrito acima, constata-se que a proteômica poderá auxiliar no entendimento das vias metabólicas relacionadas à capacidade de expansão, principalmente no tocante aos fatores genéticos que atuam sobre a sua expressão. O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo sobre a expressão de proteínas – proteômica quantitativa, em duas linhagens de milho pipoca, uma com elevada capacidade de expansão e outra com baixa capacidade de expansão, em dois diferentes períodos de coletas após a polinização (15<sup>o</sup> DAP e 25<sup>o</sup> DAP), por meio da abordagem proteômica *Shotgun*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos econômicos da cultura

A cultura do milho pipoca (*Zea mays* L.) é utilizada exclusivamente para o consumo humano e, por isso, tem-se observado uma maior preocupação com a sua qualidade (Rufatto et al., 2000). É uma cultura típica do continente americano e constitui-se em uma boa opção econômica para os produtores, por apresentar um valor comercial maior que o do milho comum (Agriannual, 2013). Em um levantamento realizado no mês de junho de 2014, observou-se que o quilo do milho pipoca na Ceasa de Campinas era de R\$ 2,19; por outro lado, no mesmo período, o quilo do milho comum era de R\$ 0,74 (Conab, 2014), confirmando assim a melhor lucratividade para o produtor que opta pelo plantio de milho pipoca. Entretanto, só é vantajoso plantar milho pipoca se a relação de preço pipoca/milho comum for acima de 2,5 e se o produtor tiver acesso às sementes de híbridos de pipoca que apresente alta produtividade e qualidade (Zeamays, 2013).

O cultivo do milho pipoca no Brasil ocorre principalmente por meio do sistema integrado entre a indústria, que fornece orientação técnica e sementes importadas, e os produtores. Esse sistema ocorre, por exemplo, no município de Campos Novos do Parecis – MT, o qual se destaca como o maior produtor brasileiro de milho pipoca, principalmente devido à ação das empresas Yoki e Agrícola Ferrari, que estimulam o plantio de milho pipoca na região, comprando a produção e fornecendo sementes importadas de híbridos americanos (Beling et al., 2013). Na safra de 2011, foram plantados no município de Campos Novos do Parecis cerca de 15 mil hectares de milho pipoca, com produtividade de 3.200 kg ha<sup>-1</sup>. Desse total, 7.500 hectares foram produzidos em contrato com a Yoki, 5.000 hectares em contrato com a Agrícola Ferrari e 2.500 hectares por produtores independentes, sem contrato. A produção dos 15.000 hectares foi de 48.000 mil toneladas, que correspondem provavelmente a mais da metade do consumo anual de milho pipoca no Brasil (Zeamays, 2013).

No Brasil, o estabelecimento de parâmetros econômicos relacionados à cultura do milho pipoca esbarra na escassez de dados sobre a área semeada, quantidade produzida, compradores de grãos e produtores de sementes. Portanto, essa informalidade do mercado de milho pipoca dificulta o acesso a índices

econômicos e mercadológicos (Pereira Filho et al., 2013). As informações obtidas normalmente referem-se a dados levantados pela mídia por meio de entrevistas com produtores e diretores de sindicatos rurais, divulgados em anuários, revistas agrícolas e jornais (Zeamays, 2013).

## **2.2. Características morfológicas e agronômicas**

O milho pipoca pertence à família *Poaceae*, subfamília *Panicoide*, tribo *Maydeae*, gênero *Zea*, espécie *Zea mays* L. (Hoseney et al., 1983). Portanto, pertence à mesma espécie botânica do milho comum, sendo classificado como um tipo especial de milho (Sawazaki, 2001). Para fins de registro de cultivares no Ministério da Agricultura, o milho pipoca é considerado uma subespécie de *Zea mays*, sendo denominado de *Zea mays* L. var. *everta* (Sturteu) L.H. Bailey (Sawazaki, 2001).

Quando comparado ao milho comum, o pipoca apresenta características peculiares, tais como: tamanho de pendão, precocidade e prolificidade, podendo serem obtidas até seis ou mais espigas por planta; plantas mais baixas, com mais folhas e colmos delicados; crescimento mais lento, produzindo espigas menores; maior suscetibilidade ao acamamento, pragas e doenças; menor produtividade e maior produção de pólen (Zinsly e Machado, 1987; Ziegler e Ashman, 1994). Apresenta ainda sementes pequenas e duras, as quais possuem capacidade de estourar quando aquecidas a aproximadamente 180°C (Sawazaki, 2001).

A capacidade de expansão (CE), característica mais importante para o consumidor, pode ser calculada por meio da relação entre o volume de pipoca e o volume de sementes ou ainda a relação entre o volume de pipoca e o peso de sementes (Alexander e Greech, 1977). Segundo Fantini et al. (2006), o fenômeno da expansão ocorre quando o vapor de água se infiltra no endosperma duro, amolecendo-o e tornando-o gelatinoso a uma temperatura acima de 150° C. Quando o amido gelatinoso atinge uma temperatura entre 180-190° C, o pericarpo estoura. A pressão de vapor expande através de pequenos orifícios em cada grânulo de amido, ocorrendo a formação de uma espuma sólida e branca.

Segundo Borrás et al. (2006), a expansão é o fator de qualidade mais crítico do milho pipoca. Guadagnin (1996) *apud* Tissot et al. (2001) citam que, quanto maior a capacidade de expansão, maior será a maciez das pipocas. Para Ziegler (2001), o

volume de expansão e o número de sementes de milho pipoca não expandidos são considerados os dois fatores de qualidade mais estudados em pipoca.

Muitos estudos têm demonstrado a influência de inúmeros fatores sobre a capacidade de expansão, como, por exemplo, efeitos genotípicos, densidade e tamanho da semente, danos e condições de armazenamento da semente. Segundo Fachin et al. (1993), a capacidade do milho pipoca em se expandir sob aquecimento é explicada pela resistência do pericarpo associada à presença de óleo e de umidade na semente.

O volume de expansão tem evidenciado ser uma característica quantitativa (três a cinco genes de efeitos principais) com elevada herdabilidade (Ziegler, 2001). O principal componente de variação genética da capacidade de expansão em milho pipoca relaciona-se aos efeitos genéticos aditivos, havendo, também, em alguns casos, a contribuição dos efeitos de dominância e os efeitos epistáticos não sendo significativos (Pereira e Amaral Júnior, 2001).

Entender os parâmetros físico-químicos correlacionados à capacidade de expansão é de grande importância, pois a partir dessas informações é possível contribuir de forma mais efetiva para a condução dos programas de melhoramento da cultura, como, por exemplo, a seleção de genitores (Sweley et al., 2012).

### **2.3. Características físico-químicas de sementes de milho pipoca associadas à capacidade de expansão**

Várias características físico-químicas estão relacionadas à capacidade de expansão. Zinsly e Machado (1978; 1987), Song e Eckhoff (1994 a, b) e Luz et al. (2005) atribuem a capacidade de expansão do milho pipoca à umidade. Nas análises realizadas por Luz et al. (2005), em três genótipos de milho pipoca, com relação ao efeito da umidade, que variou de 9% a 21%, foi possível concluir que 13% é a melhor porcentagem de umidade para que se consiga atingir a máxima capacidade de expansão.

Lyerly (1942) e Park e Maga (2002) citam que as propriedades físicas da pipoca, como tamanho da semente, forma e densidade afetam o volume de expansão. Segundo Willier e Brunson (1927), o volume de expansão aumenta enquanto o tamanho da semente diminui, fato este comprovado por Song et al. (1991). Esses autores observaram que sementes menores, curtas e redondas

apresentam maiores volumes de expansão. Por outro lado, uma correlação negativa foi observada entre o peso de mil sementes e a capacidade de expansão (Ertas et al., 2009; Sweley et al., 2012).

A esfericidade da semente é outro fator que pode interferir na capacidade de expansão, podendo ser uma correlação positiva (Ertas et al., 2009; Sweley et al., 2012). A esfericidade da semente é calculada por meio da relação do diâmetro médio geométrico (raiz cúbica do comprimento multiplicado, largura e espessura) de, no mínimo, 30 sementes da amostra em estudo, avaliadas aleatoriamente e com auxílio de um paquímetro digital. As sementes mais esféricas possuem grande estabilidade estrutural devido a uma menor área em relação ao volume, proporcionando maior potencial de energia antes que o estouro ocorra (Sweley et al., 2012).

Zinsly e Machado (1978; 1987) atribuem a capacidade de expansão do milho pipoca à resistência do seu pericarpo e Park e Maga (2002) e Singh et al. (2004) relacionam também à existência de danos no pericarpo e no endosperma como fatores que podem interferir sobre a CE.

A presença de óleo na semente e o perfil de ácidos graxos são fatores que influenciam a capacidade de expansão (Zinsly e Machado, 1978, 1987; Park et al., 2000; Luz et al., 2005). Park et al. (2000) relataram que a composição química é um importante fator para determinar a capacidade de expansão. Os autores observaram elevados níveis de ácidos linoleicos e oleicos, porém não estabeleceram em seu trabalho nenhuma relação entre a composição de óleos e a capacidade de expansão do milho pipoca.

Sementes de milho comum apresentam entre 4 a 6% de óleo (Liu et al., 2009b) e, desta fração, 85% encontra-se no embrião (Liu et al., 2009b; Alonso et al., 2010). Entretanto, em milho pipoca, Park et al. (2000) citam que o conteúdo de óleo total está entre 3,8 – 4,6%.

Vance e Huang (1988) e Rolletschek et al. (2005) observaram que os lipídios em sementes de milho comum acumulam-se principalmente no embrião e nas células do aleurona, bem como nas células do endosperma adjacentes à camada de aleurona.

Nas sementes de milho comum, as reservas lipídicas são sintetizadas e armazenadas em organelas simples, chamadas de corpos lipídicos (*oilbodies*). Essas pequenas organelas esféricas são constituídas por um núcleo de triacilglicerol

(TAG) envolto por uma única camada de fosfolipídios e proteínas. Quatro grandes polipeptídeos estão associados aos corpos lipídicos de milho e um deles é o L3, que corresponde a 30% das proteínas dos corpos lipídicos (Vance and Huang, 1988). Posteriormente, essas proteínas associadas aos corpos lipídios passaram a ser designadas como oleosinas (Tzen et al., 1990; Ting et al., 1996).

Borras et al. (2006), estudando linhagens de milho pipoca, observaram que o perfil de ácidos graxos compreendia: ácido linoleico (56,9 – 63,4%), seguido de ácido oleico (23,3 – 29,7%), ácido palmítico (9,1 – 12,1%) e ácido estearílico (1,2 – 1,9%). Mais importante foi a correlação positiva observada entre a capacidade de expansão e os valores de ácido oleico e linoleico (ácidos graxos insaturados), enquanto que a correlação da capacidade de expansão com os ácidos graxos saturados foi muito baixa.

Sweley et al. (2012), avaliando sementes de híbridos de milho pipoca, observaram em sua composição de ácido graxos, a presença do ácido linoleico em maior quantidade, seguido do ácido oleico e palmítico, enquanto o ácido estearílico, o linolênico e os demais contabilizaram menos de 2%. Em contrapartida, os autores observaram correlação negativa entre ácido oleico e ácido linoleico com a capacidade de expansão.

Mittelman et al. (2006) descreveram que o teor de óleo nas sementes de milho é um caráter quantitativo, sendo controlado por um grande número de genes e a variância genética aditiva parece ser o principal componente no controle deste caráter.

A expansão do endosperma está também fortemente relacionada à textura da sua matriz, pois a mesma é composta quase totalmente por amido duro (Bandel, 1987), sendo esse tipo de amido um dos caracteres que permite o pipocamento (Robbins Jr. e Ashman, 1984; Rooney e Serna-Saldívar, 1987). Assim, a composição do amido também pode ter um papel importante sobre as propriedades de expansão do milho pipoca (Mercier e Feillet, 1975; Zhang e Hosney, 1998).

Da mesma forma que a textura do endosperma é influenciada pela presença de amido, ela também está associada à quantidade e ao tipo de proteínas que o compõe (Wilson, 1987). Segundo Park et al. (2000), o conteúdo de proteínas totais em sementes de milho pipoca está entre 8,1-10,5%. As principais proteínas encontradas no endosperma são as zeína e gluteína, as quais estão significativamente correlacionadas ao volume de expansão (Borras et al., 2006).

## 2.4. Embriogênese em milho

Segundo Lee et al. (2002) e Vernoud et al. (2005), a embriogênese é definida como a soma de todos os processos de crescimento e diferenciação, que vão da fase de zigoto unicelular a embrião maduro – estrutura multicelular altamente organizada.

A totalidade do processo de embriogênese no milho comum é, para Lee et al. (2002), dividido em cinco etapas: divisão celular, alongamento celular, deposição de reservas, maturação e dessecação. No período próximo ao 20º DAP observa-se que a expressão de enzimas metabólicas é mais intensa, a divisão e a diferenciação param e os processos de armazenamento e dessecação se iniciam, sendo todas essas alterações correlacionadas às mudanças nos níveis de ácido abscísico (ABA).

Lee et al. (2002) e Liu et al. (2008) observaram mudanças drásticas na expressão gênica entre o 20º e 25º DAP nos embriões de milho comum. Mudanças na expressão gênica após 25º DAP foram muito pequenas. Foi observado que a primeira fase é um período em que são ativados os precursores da biossíntese, síntese de DNA e divisão celular. A segunda fase envolve a biossíntese e deposição de reservas, tais como armazenamento de proteínas, ácidos graxos e amido.

A embriogênese em *Z. mays*, segundo Vernoud et al. (2005), é dividida em três grandes fases (Figura 1). A primeira fase é dada pelo desenvolvimento e morfogênese, na qual se inclui a diferenciação celular para formar todos os órgãos do embrião com duração até o 15º DAP. A segunda fase compreende o período de maturação e crescimento do embrião e também o acúmulo de reservas, como proteínas e óleos, permanecendo o embrião nesta fase desde o 15º DAP até o 45º DAP. Durante a terceira fase, que se inicia a partir do 45º DAP, observa-se o processo de desidratação do embrião que entra em dormência, preparando-se para a separação da planta mãe.

Segundo Sánchez-Martínez et al. (1986), uma importante etapa no estudo dos mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento da plantas é a caracterização das proteínas diferentemente expressas durante os diferentes estádios de maturação.

A organogênese em embriões de milho corresponde à formação de três lobos (posterior, distal e anterior), os quais estão evidentes após o 10º DAP e que



segue até o 30<sup>o</sup> e 40<sup>o</sup> DAP e a maturação final e desidratação nos próximos 50<sup>o</sup> a 60<sup>o</sup> DAP (Sánchez-Martínez et al., 1986).

A realização de estudos proteômicos sobre o desenvolvimetro do embrião de milho pipoca é de extrema importância para a caracterização de proteínas envolvidas no processo de embriogênese, da mesma forma que outros processos metabólicos de interesse, como a via de lipídios e de carboidratos.

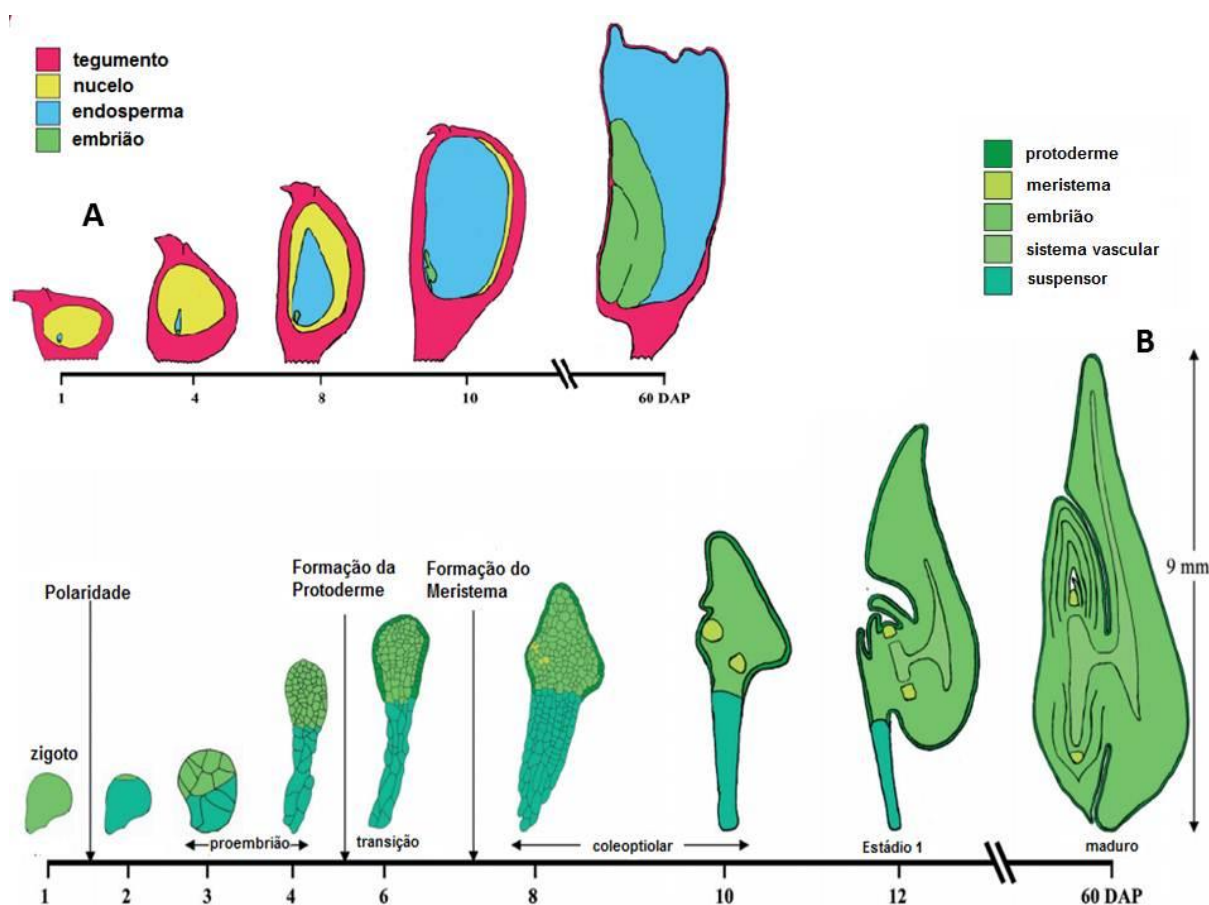


Figura – 1 (A) Desenvolvimento da semente de milho comum, em quem pode ser observado o desenvolvimento do tegumento, nucelo, endosperma e embrião; (B) Embriogênese em milho comum, nos diferentes estádios de zigoto, proembrião inicial e tardio, transição, fase coleoptilar inicial e tardia, estágio 1 e maturação, em uma escala de tempo dada em dias após a polinização (DAP) (Adaptado de Vernoud et al. 2005).

## 2.5. Proteômica e obtenção das amostras

Segundo Di Ciero e Bellato (2002), a proteômica indica as proteínas expressas em um genoma ou tecido. Contudo, enquanto o genoma representa a soma de todos os genes de um indivíduo, o proteoma não é uma característica fixa,

ms se altera conforme o estado de desenvolvimento ou mesmo sob condições nas quais um indivíduo se encontra. Elliott et al. (2009) citam que um dos principais objetivos da proteômica é quantificar com precisão as alterações na expressão de proteínas em resposta a uma variedade de mudanças na expressão das mesmas. Portanto, a proteômica engloba esforços para identificar e quantificar todas as proteínas de um proteoma, incluindo expressão, localização, suas interações, modificações pos-traducionais, assim como, quantificá-las em função do tempo, espaço e tipo de célula ou tecido (Zhang et al., 2013; Wang et al., 2014).

O estudo de proteínas é necessário, pois a caracterização dos genes não pode prever adequadamente a dinâmica das proteínas. Assim, a proteômica é um método direto para identificar, quantificar e estudar as modificações pós-traducionais das proteínas em uma célula, tecido ou mesmo organismos (Di Cierro e Bellato, 2002; Silva e Silva et al., 2007).

Di Cierro e Bellato (2002) sugerem a proteômica como metodologia de seleção da biologia molecular que, além de documentar, identificar e caracterizar proteínas, tem a principal função de elucidar as suas associações e funções. Para Liu et al. (2009b), a análise proteômica é uma poderosa ferramenta para visualizar e comparar uma mistura complexa de proteínas de um indivíduo frente a uma resposta biológica específica.

O proteoma reflete o estado atual de funcionamento do organismo sob condições fisiológicas específicas, ou seja, a expressão funcional do genoma, destacando-se como uma ferramenta apropriada para se entender o funcionamento dos genes, pois analisa o produto final do genoma (Rocha et al., 2005).

Houve uma substancial melhora das técnicas de separação e identificação de proteínas que, juntamente com a expansão do conhecimento genômico, levaram a um aumento da aplicação dos métodos proteômicos para responder os questionamentos biológicos (Isaacson et al., 2006). O progresso nos estudos proteômicos tem sido impulsionado pelo desenvolvimento de tecnologias de separação de proteínas e peptídeos, análises em espectrometria de massas, marcação química para quantificação e análise de dados pela bioinformática (Zhang et al., 2013).

A qualidade da amostra é o fator mais crítico de uma análise proteômica, ou seja, o procedimento de extração de proteínas tem grande importância, sendo o melhor método aquele que isola o maior número de proteínas possível, minimizando

a degradação e a contaminação. Uma metodologia de extração simples pode não isolar o proteoma total, devido às diferentes propriedades bioquímicas das diferentes proteínas, incluindo carga, tamanho, hidrofobicidade, suscetibilidade à proteólise e interação com outros componentes (Isaacson et al., 2006).

O proteoma total é difícil de ser obtido a partir de plantas e este fato é decorrência da baixa quantidade de proteínas nas células vegetais e da abundância de proteases, enzimas oxidativas e compostos secundários (Isaacson et al., 2006). Desta forma, a escolha de uma metodologia adequada depende da natureza do tecido do qual serão extraídas as proteínas e do tipo de análise que será realizada.

No tocante à semente como material vegetal escolhido para o estudo, Branlard e Bancel (2007) citam que a extração de proteínas, geralmente, é realizada sem muitas dificuldades. Entretanto, para que se tenha sucesso em uma análise proteômica, o primeiro fator a ser observado é que a semente não é um tecido homogêneo. As diferentes estruturas formadas a partir da fertilização, como escutelo, endosperma, embrião, cotilédone, possuem uma composição bioquímica diferente, a qual pode reduzir seriamente a extração de proteínas ou modificar a diversidade proteica revelada, usando-se eletroforese bi-dimensional (Branlard e Bancel, 2007). Outro ponto a ser observado é que as sementes frequentemente são ricas em polissacarídeos, lipídios e compostos do metabolismo secundário. Os tecidos que apresentam esses constituintes, geralmente, são pobres em proteínas e ricos em proteases, demandando certos cuidados, principalmente quanto à solubilidade de proteínas, para que se tenha uma extração satisfatória (Branlard e Bancel, 2007).

Dependendo do tipo de semente e da espécie em estudo, é possível que nem todas as proteínas sejam extraídas. Assim, muitos critérios devem ser observados na metodologia de extração uma vez que as proteínas não são os componentes mais abundantes das sementes e elas estão frequentemente agregadas ou ligadas a outros compostos, como, por exemplo, grânulos de amido (Branlard e Bancel, 2007).

Branlard e Bancel (2007) sugerem as metodologias de extração de proteínas de Damerval et al. (1986) e Granier (1998) que podem ser utilizadas para todas as sementes, incluindo as de milho. Um exemplo é o trabalho conduzido por Chen et al. (2002), no qual foi avaliado o perfil proteico de embriões de milho comum em genótipos resistentes e suscetíveis a *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Utilizando

um tampão de extração salino (50 mM Tris-HCl pH 8, 0,25 M NaCl e 14 mM de beta-mercaptoetanol), os autores observaram diferenças quantitativas e qualitativas na expressão de proteínas entre os genótipos de milho resistentes e suscetíveis aos patógenos.

Méchin et al. (2004) realizaram um mapa proteômico do endosperma de milho e, para tanto, utilizaram um tampão de extração de proteínas contendo acetona com 0,07% de beta-mercaptoetanol e 10% de ácido tricloroacético (TCA). Portanto, constata-se que existem diferentes metodologias de extração de proteínas para as sementes e a padronização dessa etapa constitui um evento imprescindível para o sucesso de uma análise proteômica. Frente a um novo tecido ou espécie, essas metodologias devem ser avaliadas, com vistas a aumentar a eficiência na extração.

## **2.6. Proteômica quantitativa**

A análise proteômica pode ser realizada frente à adoção de duas estratégias, quais sejam: “Bottom-up” e “Top-down”. A estratégia “Bottom-up” refere-se à caracterização de proteínas por meio da liberação de peptídeos a partir de uma reação de proteólise. Quando esta análise é realizada em uma mistura de proteínas ela é designada de “Shotgun”, nome este cunhado pelo laboratório de Yates, fazendo referência ao sequenciamento genômico “Shotgun” (Zhang et al., 2013).

A análise “Shotgun” para proteômica, indiretamente mensura as proteínas por meio dos peptídeos derivados da digestão proteolítica de proteínas. Subsequentemente, a mistura de peptídeos é fracionada por cromatografia líquida e analisada por espectrometria de massa. A identificação dos peptídeos é realizada pela comparação de espectros experimentais e teóricos. Os espectros teóricos são obtidos a partir de um banco de dados submetidos à digestão *in silico* (Alves et al., 2007; Lu et al., 2008; Zhang et al., 2013).

Segundo Matallana-Surget et al. (2010), a proteômica “Shotgun” consiste na separação multidimensional (MudPIT) de uma mistura complexa de peptídeos, gerados a partir do tratamento por uma protease específica, com posterior análise por espectrometria de massa, sendo a seguir submetidos a pesquisa em banco de dados.

Conforme Matallan-Surget et al. (2010), atualmente o conceito de análise proteômica “Shotgun” expandiu e não se refere apenas a uma metodologia isenta da utilização de géis para fracionamento de proteínas. Além da utilização do fracionamento por cromatografia líquida (LC) de troca catiônica – “strong cation exchange” (SCX) ou fase reversa (RP), acoplado a um espectrômetro de massas, adota-se fracionamentos alternativos como o SDS-PAGE, focalização isoelétrica e vários tipos de cromatografia líquida para separação de proteínas e peptídeos.

Os diferentes métodos acima citados estão disponíveis, mas dependendo dos objetivos do estudo proteômico devem ser considerados vários fatores como: a origem e o número das amostras, o número de tratamentos a ser comparado, o tipo de equipamento disponível, assim como, o custo e o tempo necessário (Elliott et al., 2009).

A análise proteômica “Shotgun” é extremamente poderosa no que se refere à quantidade de dados obtidos quando comparada com os dados dos géis 2-DE (eletroforese bi-dimensional), assim, a utilização de géis passa a ser uma abordagem complementar. Por isso, atualmente, a proteômica “Shotgun” tem sido extensivamente utilizada, não apenas para identificação, mas também para a quantificação de proteínas (Matallana-Surget et al., 2010).

Outra metodologia utilizada é a análise “Top-down”, cujo objetivo reside na análise de proteínas intactas, ou seja, essa técnica visa analisar as modificações pós-traducionais e o estudo de isoformas. Contudo, esta forma de análise apresenta algumas limitações quando comparada a análise “Shotgun”, as quais residem principalmente no fracionamento e ionização das proteínas e fragmentação em fase gasosa (Alves et al., 2007; Zhang et al., 2013).

A proteômica quantitativa segundo Elliott et al. (2009), pode ser classificada em dois tipos: absoluta e relativa. Na proteômica quantitativa absoluta determina-se mudanças na expressão da proteína em termos de uma quantidade ou concentração exata ( $\eta$ g ou  $\eta$ moles por grama de tecido) de cada uma das proteínas presentes. Em contrapartida, na proteômica quantitativa relativa determinasse o nível de expressão de proteínas baseado em uma amostra controle ou comparativa.

A quantificação relativa consiste na introdução de um equivalente químico de marcação química que possibilita a comparação quantitativa de diferentes proteínas em diferentes amostras, assim, a marcação altera a massa de uma proteína ou

peptídeo sem afetar as propriedades de separação por cromatografia (Elliott et al., 2009).

No ano de 2004 foi desenvolvida uma técnica de identificação de proteínas para quantificação absoluta e relativa sem a utilização de géis e que é baseada em marcação isotópica, esta nova técnica recebeu o nome de iTRAQ (Etiquetas isobáricas para quantificação relativa e absoluta) (Ross et al., 2004).

Ross et al. (2004) citam que a técnica é o resultado da combinação de uma cromatografia líquida multi-dimensional seguida de análise por espectrometria de massa, sendo eficiente porque analisa muitas amostras em uma única corrida, não necessitando de géis que podem causar a perda de moléculas de tamanho pequeno (<10 kDa) ou grande (>200 kDa).

Análises proteômicas que utilizam iTRAQ possuem a vantagem de reduzir os “viés” analíticos da técnica, causadas pelas diferentes hidrofobicidades, abundância, ou ponto isoelétrico, além de aumentar a sensibilidade e acurácia (Qin et al., 2013).

Ross et al. (2004) foram os pioneiros na aplicação do iTRAQ para amostras de proteínas de cepas selvagens e mutadas de *Saccharomyces cerevisiae* revelando expressão diferencial de proteínas. Os autores desenvolveram um conjunto multiplexado de reagentes para a análise quantitativa em proteínas que adiciona marcadores de massa isobáricos na região N terminal e nas cadeias laterais de lisina em uma mistura de peptídeos digeridos (Figura 2).

Os reagentes são diferentemente marcados isotopicamente, mas todos os peptídeos derivados da marcação são isóbaros e apresentam o mesmo padrão de coeluição na cromatografia líquida, contudo, produzem diferentes sinais dos íons repórteres quando submetidos à fragmentação por CID (Dissociação induzida por colisão) os quais são utilizados para identificar e quantificar individualmente cada amostra de mistura de peptídeos digeridos (Ross et al., 2004).

Conforme Qin et al. (2013), a técnica de iTRAQ é aplicada principalmente na pesquisa médica, e há poucos relatos de sua aplicação em análises proteômicas de plantas. Entre os trabalhos encontrados na literatura que utilizam a técnica do iTRAQ para milho destaca-se o trabalho de Robbins et al. (2013) que utilizaram a técnica em estudos proteômicos em pericarpos de sementes e, Silva-Sanchez et al. (2013) em estudos proteômicos da parte basal do endosperma de milhos mutantes e selvagens relacionado à biossíntese de amido.

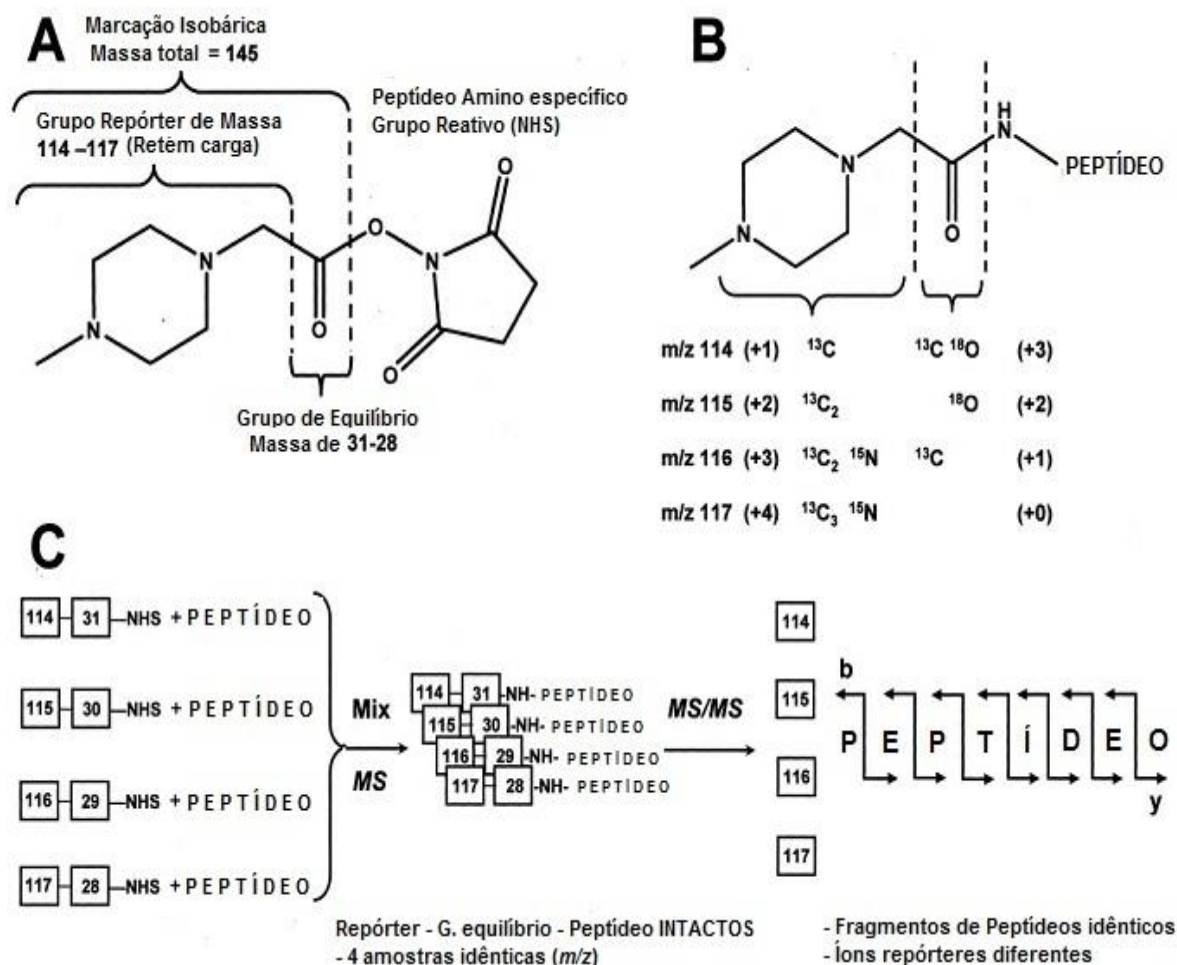


Figura 2 – A, o diagrama mostra os componentes químicos da marcação isobárica multiplex. A molécula completa consiste em um grupo repórter (baseado ou derivado de N-metilpiperazina), um grupo de equilíbrio de massa (carbonil), e um grupo peptídeo-reativo (NHSester). A massa total do grupo repórter e equilíbrio são mantidos constantes usando isótopos enriquecidos com átomos  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  e  $^{18}\text{O}$ , evitando assim, problemas na separação cromatográfica. O grupo repórter varia de  $m/z$  (proporção entre massa e carga) de 114,1 a 117,1, enquanto que o grupo de equilíbrio tem massa variável de 28 a 31 Da, de tal modo que a massa combinada permanece constante (145.1 Da) para cada um dos quatro diferentes marcadores. B, quando colocado para reagir com o peptídeo, o marcador forma uma ligação amida com qualquer grupo amino N-terminal ou com a lisina. Após a fragmentação do marcador com o peptídeo, o grupo de equilíbrio é perdido (perda neutra), enquanto a carga é retida no fragmento do grupo repórter (+0, +1, +2 e +3). C, ilustração da marcação isotópica utilizada para se chegar a quatro combinações isóbaras com quatro massas diferentes no grupo repórter. Uma mistura de quatro peptídeos idênticos, porém, cada um com marcação específica, apresentando idêntico  $m/z$  em MS (Espectrometria de massa). Após fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID), os quatro íons repórteres aparecem distintamente em MS/MS com massas de (114 – 117 Da) (Adaptado de Ross et al., 2004).

## 2.7. Análise proteômica em milho

O primeiro trabalho de proteômica em milho comum foi realizado por Porubleva et al. (2001), cujo objetivo foi estabelecer o protocolo para a realização da análise proteômica de folhas e identificação das proteínas por meio de sequências de genes e etiquetas de sequências expressas (ESTs). Subsequentemente, vários estudos proteômicos foram conduzidos em milho.

Hochholdinger et al. (2004; 2005) e Sauer et al. (2006) realizaram estudos proteômicos relacionados ao desenvolvimento das raízes secundárias de milho com intuito de estabelecer relações com o estresse hídrico. Requejo e Tena (2005) estudaram o perfil protéico de raízes de milho submetidas ao estresse oxidativo. George et al. (2011) investigaram a expressão diferencial em milho frente à infestação por *Spodoptera littoralis* e *Busseola fusca* por meio da técnica de 2-DE seguido de MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization).

Sun et al. (2013) utilizando cultura de tecidos associada a ferramentas como a 2-DE e sequenciamento de proteínas por MALDI-TOF-MS, investigaram a expressão diferencial entre calos embriogênicos e não embriogênicos na linhagem H99 de milho procurando proteínas associadas ao processo de embriogênese somática.

Guo et al. (2013) estabeleceram a expressão diferencial de proteínas em radículas de embriões de milho comum submetidas a germinação sem qualquer tipo de pré tratamento e sementes pré tratadas pela embebição em água por 24 horas, entre o híbrido Zong3/87-1 e seus parentais objetivando também aprimorar a compreensão das bases da heterose na espécie. O estudo de expressão diferencial foi realizado utilizando a técnica de eletroforese 2-DE, seguida de identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF-MS.

Em sementes de milho, os estudos proteômicos iniciaram-se com o trabalho de Chen et al. (2002) que avaliaram o perfil proteico de embriões de milho comum em genótipos resistentes e suscetíveis a *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Neste trabalho foi utilizada a técnica de focalização isoelétrica seguida por análise em eletroforese 2-DE e sequenciamento das proteínas diferentemente expressas. Este estudo possibilitou observar na linhagem resistente, maior expressão de proteínas como as *globulins* (1 e 2), *LEA proteins* (3 e 14), *osmotic stress-related proteins*



*WS118, aldose reductase, heat stress-related protein HSP16.9*, assim como a *glyoxalase I*.

Estudos proteômicos em sementes de milho comum foram conduzidos por outros autores, como por exemplo Méchin et al. (2004), que estabeleceram um mapa proteômico de referência para o endosperma de milho, utilizando para isso a ferramenta de eletroforese em gel 2-DE seguido pela identificação de proteínas por meio da análise via LC-MS/MS (Cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas).

Nesse mesmo ano, Campo et al. (2004) identificaram proteínas expressas em embriões de milho comum frente à infecção fúngica por *Fusarium verticillioides*. Inicialmente, os autores utilizaram duas metodologias para extração de proteínas desse tecido: uma metodologia utilizou um tampão fosfato-citrato de pH 2,8 e, na outra foi utilizado tampão salino Tris-HCl de pH 7,5.

Subsequentemente, por meio da análise em gel 2-DE, foram observados 36 spots de proteínas que apresentaram aumento de expressão durante a germinação de embriões infectados, dos quais 23 spots foram observados quando a metodologia utilizada para extração foi a utilização de um tampão fosfato-citrato (pH 2,8) e, 13 spots foram observados com o uso do tampão salino Tris-HCl (pH 7,5) (Campo et al., 2004)

Após o sequenciamento desses spots por meio de MALDI-TOF-MS, os autores observaram que as proteínas relacionadas aos mecanismos de defesa contra infecção fúngica durante a germinação foram basicamente a *fructose-bisphosphate aldolase*, *glutathione transferase*, *putative glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase*, *adenosina kinase*, *glyceraldehyde 3-phosphate*, *late embryogenesis abundant protein*, *superoxide dismutase*, *heat shock protein 17,2*, *initiation fator 5A*, *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*, *catalase* e *globulin-2* (Campo et al., 2004).

Utilizando gel unidimensional SDS-PAGE seguido pela análise em LC-MS/MS, Grimaud et al. (2008) realizaram estudo proteômico em sementes íntegras com o objetivo de compreender a biossíntese do amido em plantas de milho normal e plantas de milho mutantes para a síntese de amido. Os autores identificaram a presença das proteínas *starch synthase*, *starch branching enzyme* e *starch phosphorylase* internamente associadas aos grânulos de amido, assim como outras proteínas já identificadas.

Lu et al. (2008) analisaram o fosfoproteoma em embriões de milho submetidos ao processo de germinação com o objetivo de identificar proteínas fosforiladas, proteínas quinases e fosfatases. A obtenção da amostra proteica deu-se por meio da utilização de um tampão de extração constituído de ácido tricloroacético (TCA) 10% em acetona associado ao agente redutor 2-mercaptoetanol na concentração 0,07% e, após solubilização das proteínas extraídas, digestão trípica foi realizada. Assim, observa-se que este trabalho foi o primeiro a utilizar a análise *Shotgun* para embriões de milho.

Lu et al. (2008), com intuito de enriquecer a análise mediante simplificação da amostra biológica, antes de realizar o sequenciamento dos peptídeos obtidos pela digestão trípica, realizaram o fracionamento dos mesmos em oito partes utilizando a técnica de troca catiônica (*strong cation exchange* – SCX). Nesse estudo, os autores identificaram 776 proteínas, das quais 39 eram quinases, 16 fosfatases e 33 fosfoproteínas e que, de acordo com a anotação funcional, estas proteínas estão envolvidas no reparo do DNA, processo de transcrição, processamento do RNA, tradução de proteínas e ligação a outras proteínas.

Liu et al. (2009a) analisaram a expressão de proteínas em embriões de duas linhagens de milho comum, uma com elevado e outra com baixo teor de óleo no embrião, em diferentes estádios de desenvolvimento após a polinização. Para tal fim utilizaram como ferramenta o gel 2-DE, subsequentemente as proteínas com expressão diferencial foram sequenciadas pela técnica de MALDI-TOF-MS. Os autores observaram 620 spots de proteínas, sendo que destas 69 apresentaram expressão diferencial na linhagem com elevado teor de óleo. Após a identificação dos spots, constatou-se que a maioria das proteínas com expressão diferencial participa do metabolismo de carboidratos e proteínas, organização do citoesqueleto, resposta ao estresse e metabolismo de lipídios. As proteínas, *enoyl-ACP reductase*, *stearoyl-ACP desaturase*, *acetyl-CoA C-acyl-transferase* tiveram maior expressão na linhagem com elevado teor de óleo (Liu et al., 2009a).

Utilizando as mesmas ferramentas proteômicas, Liu et al. (2009b) avaliaram a expressão da proteína *stearoyl-acyl carrier desaturase* (SAD) em embriões de duas linhagens de milho comum com elevado e baixo teor de óleo no embrião nos estádios de desenvolvimento de 15<sup>o</sup>, 25<sup>o</sup> e 35<sup>o</sup> dias após a polinização (DAP). Os autores observaram a expressão da proteína SAD nas três épocas avaliadas, tendo aumento de expressão no 15<sup>o</sup> DAP na linhagem com teor de óleo elevado.

Huang et al. (2012) realizaram um proteoma diferencial para avaliar a tolerância à dessecação em embriões de milho durante o desenvolvimetro da semente e na germinação. Utilizando a técnica 2-DE, onze spots envolvidos como tolerância ao estresse foram identificados e, após sequenciamento realizado por MALDI-TOF-MS identificaram as seguintes proteínas: *late embryogenesis abundant (LEA) protein EMB564*, *OmpA/MotB family outer membrane protein*, *globulin 2*, *putative cystatin*, *heat shock class I*, *NBS-LRR resistance-like protein RGC456*, entre outras. Os autores observaram que estas proteínas acumularam durante a maturação de embriões tolerantes à dessecação, mas diminuíram sua expressão durante a germinação.

Gong et al. (2013) realizaram um estudo proteômico para avaliar mudanças de expressão de proteínas em embriões de sementes de milho submetidos a germinação por “hydropriming-induce” utilizando a técnica de 2-DE seguida por MALDI-TOF/TOF-MS. Este estudo revelou oito spots de proteínas com expressão diferencial, dos quais cinco apresentaram aumento na expressão e três diminuíram sua expressão nos embriões submetidos ao pré-tratamento de “hydropriming-induce”. Essas proteínas foram identificadas como *peroxiredoxin-5*, *1-cys peroxiredoxin*, *embryonic protein DC-8*, *cupin*, *globulin-1* e *late embryogenesis abundant protein* (Gong et al., 2013).

Robbins et al. (2013) realizaram um estudo proteômico em pericarpo de sementes de milho comum testando duas diferentes metodologias proteômicas; uma delas utilizando gel 2-DE-DIGE (Eletroforese bi-dimensional diferencial), e outra isenta de gel utilizando a técnica de iTRAQ para avaliar a expressão de proteínas em um mutante *Ufo1-1* da via metabólica de flavonóides.

A maioria das proteínas que foram identificadas estão envolvidas com a glicólise, síntese de proteínas, modificação pós-traducional, biossíntese de flavonoides e lignina e a comparação entre as duas técnicas evidenciou que 61 proteínas diferentemente expressas foram reveladas utilizando-se a técnica de 2-DE-DIG e 122 proteínas diferentemente expressas foram reveladas nos pericarpos de semente de milho comum utilizando-se a técnica de iTRAQ (Robbins et al., 2013)

Silva-Sanchez et al. (2013) utilizaram a abordagem proteômica *Shotgun* de proteínas expressas associadas ao uso da técnica de quantificação pelo uso do iTRAQ revelado por LC-MS/MS visando com isso avaliar a expressão diferencial de proteínas da parte basal do endosperma de um mutante *miniature1 (mn1)* para via

metabólica de carboidratos comparado com o selvagem *Mn1*. Um total de 2.518 proteínas foram identificadas na região basal do endosperma, das quais, 131 tiveram expressão diferencial entre os dois genótipos. Em sua maioria as proteínas estavam envolvidas no metabolismo de carboidratos, processos catabólicos e homeostasia celular.

Wang et al. (2014) analisaram o proteoma diferencial entre sementes de milho com desenvolvimento normal e sementes nas quais foi induzida seca artificialmente aos 40<sup>o</sup> DAP. Para tanto, as frações isoladas de embrião e endosperma foram separadas e, após a extração de proteínas utilizaram gel 2-DE para avaliar a expressão diferencial, seguido pelo sequenciamento por MALDI-TOF-TOF-MS. Segundo os autores, um número de 48 e 58 proteínas para embrião e endosperma, respectivamente, foram identificadas nas sementes submetidas à seca artificial, onde se observou grande número de proteínas relacionadas às reservas de proteínas no embrião e proteínas de defesa no endosperma.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio. M & S Mendes & Scotin. Editora Argos, 2013. 458p.

ALEXANDER, D.E.; CREECH, R.G. Breeding special industrial and nutritional types. In: SPRAGUE, G.F.; FUCCILLO, D.A. (eds.). **Corn and corn improvement**. (Agronomy, 18). Madison: American Society of Agronomy, 1977. p. 363-386.

ALONSO, A.P.; DALE, V.L.; SHACHAR-HILL, Y. Understanding fatty acid synthesis in developing maize embryos using metabolic flux analysis. **Metabolic Engineering**, 12:488-497, 2010.

ALVES, P.; ARNOLD, R.J.; NOVOTNY, M.V.; RADIVOJAC, P.; REILLY, J.; TANK, H. Advancement in protein inference from shotgun proteomics using peptide detectability. **Pacific Symposium on Biocomputing**, 12:409-420, 2007.

BANDEL, G. Genética. In: PATERNIANI, E. (eds.). **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 650p.

BELING, R.R.; KIST, B.B.; SANTOS, C.E.; CARVALHO, C.; REETZ, E.R.; POLL, H.; PRIEBE, C.; NEUMANN, R.I.; JUNGBLU, G. **Anuário Brasileiro de Milho 2013**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2013. 136p.

BORRAS, F.; SEETHARAMAN, K.; YAO, N.; ROBUTTI, J.L.; PERCIBALDI, N.M.; EYHERABIDE, G.H. Relationship between popcorn composition and expansion volume and discrimination of corn types by Using Zein Properties. **Cereal Chemistry**, 83:86-92, 2006.

BRANLARD, G.; BANCEL, E. Protein extraction from cereal seeds. In: THIELLEMENT, H.; ZIVY, M.; DAMERVAL, C.; MÉCHIN, V. **Plants proteomics: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology 335. Totowa: Humana Press Inc., 2007. p.15-25.

CAMPO, S.; CARRASCAL, M.; COCA, M.; ABIÁN, J.; SEGUNDO, B.S. The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: A proteomics approach. **Proteomics**, 4:383-396, 2004.

CHEN, Z.Y.; BROWN, R.L.; DAMANN, K.E.; CLEVELAND, T.E. Identification of unique or elevated levels of kernel proteins in aflatoxin-resistant maize genotypes through proteome analysis. **Phytopathology**, 92:1084-1094, 2002.

COIMBRA, R.R.; MIRANDA, G.V.; VIANA, J.M.S.; CRUZ, C.D. Correlações entre caracteres na população de milho pipoca DFT-1 Ribeirão. **Revista Ceres**, 48:427-435, 2001.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Preços mínimos em vigor**. Disponível em: <http://sisdep.conab.gov.br/precosiagroweb>. Acesso em: 1, jun, 2014.

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. **Electrophoresis**, 7:52–54, 1986.

DI CIERO, L.; BELLATO, C.M. Proteoma; Avanços recentes em técnicas de Eletroforese bidimensional e Espectrometria de Massa. **Biociência & Desenvolvimento**, 29:158-164, 2002.

DOFING, S.M.; D'CROZ-MASON, N.; THOMASCOMPTON, M.A. Inheritance of expansion volume and yield in two popcorn x dent corn crosses. **Crop Science**, 31:715-718, 1991.

ELLIOT, M.H.; SMITH, D.S.; PARKER, C.E.; BORCHERS, C. Current trends in quantitative proteomics. **Journal of Mass Spectrometry**, 44:1637-1660, 2009.

ERTAS, N.; SOYLU, S.; BILGICLI, N. Effects of kernel properties and popping methods on popcorn quality of different corn cultivars. **Journal of Food Process Engineering**, 32:478–496, 2009.

ERWIN, A.T. The origin and history of popcorn, *Zea mays* L. var. *indurata* (Sturt) Bailey mut. *Everta* (Sturt) Erwin. **Agronomy Journal**, 41: 53-56, 1949.

FACHIN, D.T.; SCHEER, A.P.; SAMPAIO, E.; LULLEZ, J.C.; CARREÑO, R.E.; RAMIREZ, C.; ROCCO, C.S.; FUGMANN, H.A.J. Elaboração de pós para bebidas utilizando milho pipoca. **Boletim do Ceppa**, 11:11-16, 1993.

FANTINI, P.C.; FUSON, M.M.; EVANS, T.A. Popping Popcorn Kernels: Expanding Relevance with Linear Thinking. **Journal of Chemical Education**, 83:414-416, 2006.

GEORGE, D.; BABALOLO, O.O.; GATEHOUSE, A.M.R. Differential protein expression in maize (*Zea mays*) in response to insect attack. **African Journal of Biotechnology**, 10:7700-7709, 2011.

GONG, F.; WU, X.; WANG, W. Comparative proteomic identification of embryo proteins associated with hydropriming induced rapid-germination of maize seeds. **Plant Omics Journal**, 6:333-339, 2013.

GRANIER, F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, 9:712-718, 1988.

GRIMAUD, F.; ROGNIAUX, H. JAMES, M.G.; M, YERS, A.M.; PLANCHOT, V. Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, 59:3395-3406, 2008.

GUO, B.; CHEN, Y.; ZHANG, G.; XING, J.; HU, Z.; FENG, W.; YAO, Y.; PENG, H.; DU, J.; ZHANG, Y.; NI, Z.; SUN, Q. Comparative proteomic analysis of embryos between a maize hybrid and its parental lines during early stages of seed germination. **PIOS ONE**, 8: 1-10, 2013.

HOCHHOLDINGER, F.; GUO, L.; SCHNABLE, P.S. Lateral roots affect the proteome of the primary root of maize (*Zea mays* L.). **Plant Molecular Biology**, 56:397–412, 2004.

HOCHHOLDINGER, F.; WOLL, K.; GUO, L.; SCHANBLE, P.S. The accumulation of abundant soluble proteins changes early in the development of the primary roots of maize (*Zea mays* L.). **Proteomics**, 5:4885–4893, 2005.

HOSENEY, R.C.; ZELEZNAK, K.; ABDELRAHMAN, A. Mechanism of popcorn popping. **Jornal of Cereal Science**, 1:43-52, 1983.

HUANG, H.; MOLLER, I.M.; SONG, S.Q. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. **Journal Proteomics**, 75:1247–1262, 2012.

ISAACSON, T.; DAMASCENO, C.M.B.; SARAVANAN, R.S.; YONGHUA, H.; CATALÁ, C.; SALADIÉ, M.; ROSE, J.K.C. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. **Nature Protocols**, 1:769-774, 2006.

KANDALA, C.V.K.; NELSON, S.O.; LAWRENCE, K.C. Nondestructive moisture determination in small samples of popcorn by RF impedance measurement. **Transactions of the ASAE**, 37:191-194, 1994.

LEE, J.M.; WILLIAMS, M.E.; TINGEY, S.V.; RAFALSKI, J.A. DNA array profiling of gene expression changes during maize embryo development. **Functional & Integrative Genomics**, 2:13-27, 2002.

LIU, X.; FU, J.; GU, D.; LIU, W.; LIU, T.; PENG, Y.; WANG, J.; WANG, G. Genome-wide analysis of gene expression profiles during the kernel development of maize (*Zea mays* L.). **Genomics**, 91: 378-387, 2008.

LIU, Z.; YANG, X.H.; FU, Y. SAD, a Stearoyl-acyl carrier protein desaturase highly expressed in high-oil maize inbred lines. **Russian Journal of Plant Physiology**, 56:709-715. 2009a.

LIU, Z.; YANG, X.H.; FU, Y.; ZHANG, Y.; YAN, J.; SONG, T.; ROCHEFORD, T.; LI, J. Proteomic analysis of early germs with high-oil normal inbred lines in maize. **Molecular Biology Reports**, 36:813-821, 2009b.

LU, T.C.; MENG, L.B.; YANG, C.P.; LIU, G.F.; LIU, G.J.; MA, W.; WANG, B.C. A shotgun phosphoproteomics analysis of embryos in germinated maize seeds. **Planta**, 228:1029-1041, 2008.

LUZ, M.L.S.; DALPASQUALE, V.D.; SCAPIM, C.A.; DE LUCCA E BRACCINI, A.; ROYER, M.R.; MORA, F. Influência da umidade das sementes na capacidade de expansão de três genótipos de milho pipoca (*Zea mays* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, 27:549-553, 2005.



LYERLY, P.J. Some genetic and morphologic characters affecting the popping expansion of popcorn. **Agronomy Journal**, 34:986-999, 1942.

MACHADO, P.F. **Efeito das condições de colheita e secagem sobre a capacidade de expansão de milho pipoca**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 41p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola).

MANGELSDORF, P.C.; SMITH JR, C.E. A discovery of remains of primitive maize in New Mexico. **Journal of Heredity**, 17: 39-43, 1949.

MATALLANA-SURGET, S.; LEROY, B.; WATTIEZ, R. Shotgun proteomics: concept, key points and data mining. **Expert Review of Proteomics**, 7: 5-7, 2010.

MÉCHIN, V.; BALLIAU, T.; CHATEAU-JOUBERT, S.; DAVANTURE, M.; LANGELLA, O.; NEGRONI, L.; PRIOUL, J.L.; THEVENOT, C.; ZIVY, M.; DAMERVAL, C. A two-dimensional proteome map of maize endosperm. **Phytochemistry**, 65:1609–1618, 2004.

MERCIER, C.; FEILLET, P. Modification of carbohydrate components by extrusion cooking of cereal products. **Cereal Chemistry**, 52:283-297, 1975.

MITTELMANN, A.; MIRANDA-FILHO, J.B.; LIMA, G.J.M.M.; HARA-KLEIN, C.; SILVA, R.M.; TANAKA, R.T. Análise dialéctica do teor de óleo em milho. **Revista Brasileira de Agrociência**, 12:139-143, 2006.

PACHECO, C.A.P.; GAMA, E.P.; GUIMARÃES, P.E.O.; SANTOS, M.X.; FERREIRA, A.S. Estimativas de parâmetros genéticos nas populações CMS-42 e CMS-43 de milho pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 33:1995-2001, 1998.

PARK, D.; ALLEN, K.G.D.; STERMITZ, F.R.; MAGA, J.A. Chemical composition and physical characteristics of unpopped popcorn hybrids. **Journal of Food Composition and Analysis**, 13:921-934, 2000.

PARK, D.; MAGA, J.A. Effects of storage temperature and kernel physical condition on popping qualities of popcorn hybrids. **Cereal Chemistry**, 79:572-575, 2002.

PEREIRA FILHO, I.A.; CRUZ, J.C.; PACHECO, C.A.P.; COSTA, R.V. **Milho pipoca**. Ageitec – Agência Embrapa De Informação Tecnológica. Disponível em:

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONT000fy9zxynl02wx5ok0pvo4k359f3bo9.html>. Acesso em: 16, agosto, 2013.

PEREIRA, M.G.; AMARAL JÚNIOR, A.T. Estimation of Genetic components in popcorn based on nested design. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:3-10, 2001.

PORUBLEVA, L.; VANDER, V.K.; KOTHARI, S.; OLIVER, D.J.; CHITNIS, P.R. The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. **Electrophoresis**, 22:1724–1738, 2001.

QIN, J.; FU, F.; LIU, D.; YIN, C.; ZHAO, S.; CHEN, H.; ZHANG, J.; YANG, C.; ZHAN, X.; ZHANG, M. Proteomic analysis of elite soybean Jidou17 and its parents using iTRAQ-based quantitative approaches. **Proteome Science**, 11:1-12, 2013.

REQUEJO, R.; TENA, M. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. **Phytochemistry**, 66:1519–1528, 2005.

ROBBINS, M.L.; ROY, A.; WANG, P-H.; GAFOOR, I.; SEKHON, R.S.; BUANAFINA, M.M.O.; ROHILA, J.S.; CHOPRA, S. Comparative proteomics analysis by DIGE and iTRAQ provides insight into the regulation of phenylpropanoids in maize. **Journal of Proteomics**, 93:254-275, 2013.

ROBBINS, W.A.JR.; ASHMAN, R.B. Parent-offspring popping expansion correlations in progeny of dent corn x popcorn and flint corn x popcorn crosses. **Crop Science**, 24:119-121, 1984.

ROCHA, T.L.; COSTA, P.H.A.; MAGALHÃES, J.C.C.; EVARISTO, R.G.S.; de VASCONCELOS, É.A.R.; COUTINHO, M.V.; PAES, N.S.; SILVA, M.C.M.; GROSSI-DE-SÁ. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Brasília: Embrapa, 2005. p. 1-12.

ROLLESTSCHEK, H.; KOCK, K.; WOBUS, U.; BORISJUK, L. Positional cues for the starch/lipid balance in maize kernels and resource partitioning to the embryo. **The Plant Journal**, 42:69-83, 2005.

ROONEY, L.W.; SERNA-SALDÍVAR, S.O. Food uses of whole corn and dry-milled fractions. In: WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. (eds.). **Corn: chemistry and technology**. St. Paul, AACCI International, 1987. p. 399-429.

ROSS, P.L.; HUANG, Y.N.; MARCHESE, J.N.; WILLIAMSON, B.; PARKER, K.; HATTAN, S.; KHAINOVSKI, N.; PILLAI, S.; DEY, S.; DANIELS, S.; PURKAYASTHA, W.; JUHASZ, P.; MARTIN, S.; BARTLET-JONES, M.; HE, F.; JACOBSON, A.; PAPPIN, D.J. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. **Molecular & Cellular Proteomics**, 3:1154-1168, 2004.

RUFFATO, S.; CORRÊA, P.C.; MARTINS, J.H.; MANTOVANI, B.H.M.; SILVA, J.N. Efeito das condições de colheita, pré-processamento e armazenamento na qualidade do milho pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35:591-597, 2000.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, D.; PUIGDOMÈNECH, P.; PAGÈS M. Regulation of gene expression. In developing *Zea mays* embryos. **Plant Physiology**, 82:543-549.

SAUER, M.; JAKOB, A.; NORDHEIM, A.; HOCHHOLDINGER, F. Proteomic analysis of shoot-borne root initiation in maize (*Zea mays* L.). **Proteomics**, 6:2530–2541, 2006.

SAWAZAKI, E. A cultura do milho pipoca no Brasil. **O Agrônomo**, 53:11-13, 2001.

SILVA E SILVA, A.M.; CORRÊA, G.C.; REIS, E.M. Proteômica – Uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde & Ambiente em Revista**, 2:1-10, 2007.

SILVA, W.J.; VIDAL, B.C.; MARTINS, M.E.Q.; VARGAS, H.; PEREIRA, C.; ZERBETTO, M.; MIRANDA, L.C.M. What makes popcorn pop. **Nature**, 362:417, 1993.

SILVA-SANCHEZ, C.; CHEN, S.; ZHU, N.; LI, Q-B.; CHOUREY, P.S. Proteomic comparison of basal endosperm in maize *miniature1* mutant and its wild-type *Mn1*. **Frontiers in Plant Science**, 4:1-16, 2013.

SINGH, S.K.; NARPINDER, S.; MANINDER, K. Characteristics of the different corn types and their grain fractions: physicochemical, thermal morphological and rheological properties of starches. **Journal of Food Engineering**, 64:119-127, 2004.

SONG, A.; ECKHOFF, S.R. Individual kernel moisture content of preshelled and shelled popcorn and equilibrium isotherms of popcorn kernels of different sizes. **Cereal Chemistry**, 71:461-463, 1994a.

SONG, A.; ECKHOFF, S.R. Optimum popping moisture content for popcorn kernels of different sizes. **Cereal Chemistry**, 71:458-460, 1994b.

SONG, A.; ECKHOFF, S.R.; PAULSEN, M.; LITCHFIELD, J.B. Effect of kernel size and genotype on popcorn popping volume and number of unpopped kernels. **Cereal Chemistry**, 68:464-467, 1991.

SUN, L.; WU, Y.; ZOU, H.; SU, S.; LI, S.; SHAN, X.; XI, J.; YUAN, Y. Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (*Zea mays* L.) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 113:103-119, 2013.

SWELEY, J.C.; ROSE, D.J.; JACKSON, D.S. Hybrid and environment effects on popcorn kernel physicochemical properties and their relationship to microwave popping performance. **Journal of Cereal Science**, 55:188-194, 2012.

TIAN, Y.; BURIK, P.; ECKHOFF, S.R. Effect of hybrid and physical properties of individual popcorn kernels on expansion volume. **Cereal Chemistry**, 78:578-582, 2001.

TING, J.T.; LEE, K.; RATNAYAKE, C.; PLATT, K.A.; BALSAMO, R.A.; HUANG, A.H. Oleosin gene in maize kernels having diverse oil contents are constitutively expressed independent of oil contents. Size and shape of intracellular oil bodies are determined by the oleosins/oils ratio. **Planta**, 199:158-165, 1996.

TISSOT, U.F.; ZAMBIAZI, R.C.; MENDONÇA, C.R.B. Milho Pipoca. Caracterização física, química, microbiológica e sensorial. **Boletim do CEPPA Curitiba** 19:1-12, 2001.

TZEN, J.T.C.; LAI, Y.K.; CHAN, K.L.; HUANG, A.C. Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oil bodies of diverse seed species. **Plant Physiology**, 94:1282-1289, 1990.

VANCE, V.B.; HUANG, A.H.C. Expression of lipid body protein gene during maize seed development. **The Journal of Biological Chemistry**, 263:1476-1481, 1988.

VERNOUD, V.; HAJDUCH, J.; KHALED, A.S.; DEPÈGE, N.; ROGOWSKY, P.M. Maize embryogenesis. **Maydica**: 469-483, 2005.

WANG, W.Q.; YE, J.Q.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; WOJDYLA, K.I.; JENSEN, O.N.; MOLLER, I.M.; SONG, S.Q. Proteomic comparison between maturation drying and prematurely imposed drying of *Zea mays* seeds reveals a potential role of maturation drying in preparing proteins for seed germination, seedling vigor, and pathogen resistance. **Journal Proteome Research**, 13:606-626, 2014.

WILLIER, J.G.; BRUNSON, A.M. Factors affecting the popping quality of popcorn. **Journal of Agricultural Research**, 35:615 - 624, 1927.

WILSON, C.M. Proteins of the kernel. In: WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. (eds.). **Corn: chemistry and technology**. St. Paul: AACCI International, 1987. p. 273-310.

ZANETTE, V.A. Análise da variabilidade genética em populações de milho pipoca (*Zea mays* L.): heterose da capacidade de expansão do grão. **Agronomia Sulriograndense**, 25:173-181, 1989.

ZEAMAYS. **Milho pipoca. Tecnologia de produção**. Disponível em: <http://www.zeamays.com.br/>. Acesso em: 16, agosto, 2013.

ZHANG, W.; HOSENEY, R.C. Factors affecting expansion of corn meals with poor and good expansion properties. **Cereal Chemistry**, 75:639-643, 1998.

ZHANG, Y.; FFONSLow, B.; SHAN, B.; BAEK, M-C.; YATES, J.R. Protein analysis by Shotgun/Bottom-up proteomics. **Chemical Reviews**, 113:2343-2394, 2013.

ZIEGLER, K.E. **Popcorn**. In: HALLUER, A.R. Specialty corns (eds.) CRC press USA, 2001. p. 199-234.

ZIEGLER, K.E.; ASHMAN, B. Popcorn. In: HALLAUER, A.R. (eds.). **Specialty corns**. Ames: CRC Press, 1994. p.189-223.

ZINSLY, J.R.; MACHADO, J.A. **Milho pipoca**. In: PATERNIANI, E; VIÉGAS, G.P. (eds.). Melhoramento e produção de milho no Brasil. Piracicaba: Fundação Cargill, 1978. p.339-348.

ZINSLY, J.R.; MACHADO, J.A. Milho pipoca. In: PATERNIANI, E; VIÉGAS, G.P. (eds.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 411-422.

## CAPÍTULO I

### PROTEÔMICA QUANTITATIVA BASEADA EM ITRAQ® EM EMBRIÕES DE LINHAGENS DE MILHO PIPOCA COM DIFERENTES CAPACIDADES DE EXPANSÃO

#### RESUMO

Este trabalho objetiva realizar um estudo sobre a expressão diferencial de proteínas de embriões de duas linhagens de milho pipoca com elevada e baixa capacidade de expansão, por meio da abordagem proteômica “Shotgun”, utilizando marcadores isobáricos – iTRAQ®, no 15º e 25º dias após a polinização. Inicialmente, três metodologias para extração de proteínas foram avaliadas e concluímos que a melhor metodologia para extração de proteínas de embriões de milho pipoca quantitativamente e qualitativamente e por meio da utilização de tampão salino (Chen et al., 2002). Observamos 1.189 proteínas altamente confiáveis em embriões de milho pipoca, das quais foi possível identificar 13 diferentes funções moleculares, sendo mais significativas as proteínas com função catalítica (37,9%). Da mesma forma, identificamos 16 diferentes anotações para localização celular e 103 diferentes funções biológicas para a totalidade de proteínas identificadas, sendo mais significativas as proteínas com funções em processos metabólicos (32,5%). Quantitativamente, foi possível observar 161 proteínas que diminuíram sua expressão entre as linhagens  $P11_{25}^{\circ}DAP/P11_{15}^{\circ}DAP$ , com elevada e  $P16_{25}^{\circ}DAP/P16_{15}^{\circ}DAP$  com baixa capacidade de expansão. Destas, 4 e 127 proteínas foram observadas exclusivamente na linhagem P11 e P16, respectivamente, e 30 proteínas foram comuns entre as linhagens de milho pipoca. Com relação a proteínas que aumentaram sua expressão, foi observado um total de 50 proteínas, sendo 9 e 7 proteínas exclusivas na linhagem P11 e P16, respectivamente, e 34 comum a ambas as linhagens. Este trabalho é o primeiro a estudar a expressão diferencial de proteínas em duas linhagens contrastantes quanto à capacidade de expansão, utilizando a abordagem “Shotgun” para a análise proteômica. Dentre as

características de interesse para estudos sobre capacidade de expansão, uma delas é o teor de óleo e o perfil de ácidos graxos. Desta forma, subsequente à avaliação das 1.189 proteínas observamos um total de 18 proteínas associadas às vias metabólicas de lipídios. As duas isoformas da *enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]* foram identificadas na via metabólica de biossíntese de ácidos graxos e tiveram uma diminuição na expressão em ambas as linhagens, sendo esta redução superior na linhagem P16. Foram observadas duas isoformas de oleosins não relacionadas à via metabólica de lipídio, mas com função de armazenamento de lipídios que aumentaram sua expressão conforme avançaram os dias da polinização. As informações obtidas permitirão estabelecer novos direcionamentos para elucidar outras questões biológicas associadas à capacidade de expansão e expressão de proteínas.

Palavras-chave: Proteômica, *Zea mays*, milho pipoca, iTRAQ, capacidade de expansão.



## QUANTITATIVE PROTEOMICS ITRAQ® BASED ON POPCORN LINES OF EMBRYOS WITH DIFFERENT EXPANSION CAPACITY

This work aimed to conduct a study on the differential expression of proteins in embryo from two lines of popcorn, with high and low expansion capacity through Shotgun proteomics, utilizing isobaric iTRAQ® tags, on the 15th and 25th day after pollination. Initially three methodologies for protein extraction were evaluated, of these, it was concluded that the best method for extracting proteins from popcorn embryos is qualitatively and quantitatively using a saline buffer (Chen et al., 2002). We observed 1,189 highly reliable proteins in popcorn embryos, of which it was possible to identify 13 different molecular functions, the most significant being proteins with catalytic function (37.9%), similarly we identified 16 different notes for cellular localization and 103 different biological functions over the totality of identified proteins, the most significant proteins being those with functions in metabolic processes (32.5%). Quantitatively it was possible to observe 161 proteins that decreased expression between lines P11<sub>25<sup>th</sup> DAP</sub>/P11<sub>15<sup>th</sup> DAP</sub>, with high and P16<sub>25<sup>th</sup> DAP</sub>/P16<sub>15<sup>th</sup> DAP</sub> with low capacity for expansion. Of these, 4 and 127 proteins were observed exclusively in lines P11 and P16, respectively, and 30 proteins were common among both. With respect to proteins which increased their expression, a total of 50 proteins were observed, 9 and 7 unique proteins to lines P11 and P16, respectively, and 34 common to both lines. This work is the first to study the differential expression of proteins in two contrasting lines regarding expansion capacity utilizing the Shotgun approach for proteomic analysis. Among characteristics of interest for study on expandability is the oil content and fatty acid profile, this way, subsequent evaluation of 1,189 proteins displayed a total of 18 proteins associated with metabolic pathways of lipids. The two isoforms of *enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]* were identified in the metabolic pathway of fatty acid biosynthesis and were decreased in expression in both lines, the greater reduction being in line P16. Two isoforms of oleosins were observed, not related to the metabolic lipid pathway, but with storage function for lipids, that increased their expression as pollination days progressed. The information obtained can establish new directions and bring light to other biological issues associated with expansion capacity and protein expression.

Keywords: Proteomics, *Zea mays*, pop corn, iTRAQ, expansion capacity.

## 1. INTRODUÇÃO

O pipocamento, ou seja, a explosão provocada pela expansão do amido sob pressão, é a característica que torna o milho pipoca (*Zea mays* L.) diferente dos demais tipos de milho, refletindo diretamente sobre a qualidade da pipoca (Weatherwax, 1922). Por sua vez, a qualidade do milho pipoca e conseqüentemente seu valor comercial são avaliados por meio da capacidade de expansão.

A capacidade de expansão é influenciada tanto por fatores físicos quanto químicos: umidade (Song e Eckhoff, 1994a, b; Luz et al., 2005), densidade da semente (Park e Maga, 2002), danos ao pericarpo e endosperma (Park e Maga, 2002; Singh et al., 2004), condições de armazenamento (Park e Maga, 2002), temperatura do pipocamento (Song et al., 1991) e pelo equipamento de avaliação (Dolfing et al., 1991; Machado, 1997), o teor e perfil de ácidos graxos e resistência do pericarpo, dado pelas concentrações de celulose e lignina (Zinsly e Machado, 1987; Luz et al., 2005), matriz e textura do endosperma (Bandel, 1987), tipo de amido (Mercier e Feillet, 1975; Robbins Jr. e Ashman, 1984; Rooney e Serra-Saldivar, 1987; Zhang e Hosney, 1998) e quantidade e tipo de proteínas que compõe o endosperma (Wilson, 1987; Borrás et al., 2006).

Os programas de melhoramento de milho pipoca visam, além da alta produtividade, a obtenção de híbridos com alta capacidade de expansão. As técnicas de biotecnologia podem ser utilizadas para auxiliar o melhorista na obtenção de cultivares em um tempo menor, atuando de forma mais precisa na identificação e transferência de genes de interesse. Dentre as inúmeras ferramentas biotecnológicas disponíveis, destaca-se a proteômica.

Segundo Di Ciero e Bellato (2002), a proteômica indica as proteínas expressas em um genoma ou tecido, porém, enquanto o genoma representa a soma de todos os genes de um indivíduo, o proteoma não é uma característica fixa. Ele se altera conforme o estado de desenvolvimento ou mesmo sob condições nas quais um indivíduo se encontra. Elliott et al. (2009) citam que um dos principais objetivos da proteômica é quantificar com precisão as alterações na expressão de proteínas em resposta a uma variedade de alterações na expressão das mesmas.

Uma análise proteômica pode ser realizada com a adoção de duas estratégias: “Bottom-up” e “Top-down”. A estratégia “Bottom-up” refere-se à caracterização de proteínas por meio da liberação de peptídeos a partir de uma reação de proteólise. Quando esta análise é realizada em uma mistura de proteínas ela é designada de “Shotgun” (Zhang et al., 2013).

Outra metodologia utilizada é a análise “Top-down”, cujo objetivo reside na análise de proteínas intactas, ou seja, essa técnica visa analisar as modificações pós-traducionais e o estudo de isoformas. Contudo, esta forma de análise apresenta algumas limitações quando comparada a análise “Shotgun”, as quais residem principalmente no fracionamento e ionização das proteínas e fragmentação em fase gasosa (Alves et al., 2007; Zhang et al., 2013).

A proteômica quantitativa, segundo Elliott et al. (2009), pode ser classificada em dois tipos: absoluta e relativa. Na proteômica quantitativa absoluta, determina-se mudanças na expressão da proteína em termos de uma quantidade ou concentração exata ( $\eta\text{g}$  ou  $\eta\text{moles}$  por grama de tecido) de cada uma das proteínas presentes. Em contrapartida, na proteômica quantitativa relativa, determina-se o nível de expressão de proteínas baseado em uma amostra controle ou comparativa.

No ano de 2004, foi desenvolvida uma técnica de identificação de proteínas para quantificação absoluta e relativa sem a utilização de géis, baseada em marcação isotópica. Esta nova técnica recebeu o nome de iTRAQ (Etiquetas isobáricas para quantificação relativa e absoluta) (Ross et al., 2004).

Análises proteômicas que utilizam iTRAQ possuem a vantagem de reduzir o viés analítico da técnica, causado pelas diferentes hidrofobicidades, abundância, ou ponto isoelétrico, além de aumentar a sensibilidade e acurácia (Qin et al., 2013).

Os reagentes são diferentemente marcados isotopicamente, mas todos os peptídeos derivados da marcação são isóbaros e apresentam o mesmo padrão de coeluição na cromatografia líquida. Os íons repórteres produzem diferentes sinais quando submetidos à fragmentação por CID (Dissociação induzida por colisão), os quais são utilizados para identificar e quantificar individualmente cada amostra de mistura de peptídeos digeridos (Ross et al., 2004).

Entre os trabalhos encontrados na literatura que utilizaram a técnica do iTRAQ para milho, destacam-se o trabalho de Robbins et al. (2013), que utilizaram a técnica em estudos proteômicos em pericarpos de sementes, e de Silva-Sanchez et

al. (2013), que realizaram estudos proteômicos da parte basal do endosperma de milhos mutantes e selvagens relacionados à biossíntese de amido.

Baseado no exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo sobre a expressão diferencial de proteínas de embriões de duas linhagens de milho pipoca, uma com elevada capacidade de expansão e outra com baixa capacidade de expansão por meio da abordagem proteômica “Shotgun”, utilizando marcação isobárica – iTRAQ, no 15<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> dias após a polinização.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Padronização da metodologia de extração de proteínas de embriões de sementes de milho pipoca**

#### **2.1.1. Material Vegetal**

O campo experimental foi instalado na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), ligada ao Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), nas duas últimas semanas do mês de outubro de 2011. Foram utilizadas duas linhagens de milho pipoca: a linhagem P11, de elevada capacidade de expansão, e a linhagem P16 de baixa capacidade de expansão, ambas pertencentes ao Programa de Melhoramento de Milho da UEM. A finalidade da instalação desse campo experimental foi realizar a multiplicação das sementes e obter gerações avançadas de autofecundação dessas linhagens. As parcelas de cada linhagem foram compostas por duas linhas com 10 m de comprimento e espaçamento de 0,90 m entre fileiras e 0,20 m entre plantas. Os tratos culturais foram realizados para a cultura, conforme recomendado por Sawazaki (2001).

Aproximadamente 50 dias após a implantação do campo experimental, iniciou-se o período de autopolinização, o qual prosseguiu até a primeira semana do mês de janeiro de 2012. Quinze dias após a polinização (DAP), as espigas foram coletadas para a obtenção das amostras.

As sementes das duas linhagens foram excisadas das espigas, separando-se o embrião, endosperma e pericarpo. Os embriões foram acondicionados em microtubos plásticos de 1,5 mL, sendo em seguida, instantaneamente, congelados na presença de nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados em freezer a -90°C (Figura 1).

#### **2.1.2. Avaliação de metodologias de extração de proteínas de embriões**

As amostras de embriões foram retiradas do freezer e pesadas em balança analítica de precisão digital. Foram utilizadas as quantidades: 100 mg, 200 mg, 300 mg e 400 mg.



Figura 1 – Preparo das amostras obtidas de sementes de milho pipoca para posterior extração de proteínas: a) Espiga de milho pipoca da linhagem P11 (15<sup>o</sup> DAP); b) retirada das sementes individuais da espiga com auxílio de um bisturi; c) corte longitudinal realizado no pericarpo da semente; d) excisão do embrião, e) armazenamento do embrião em microtubos plásticos estéreis e adição de nitrogênio líquido para congelamento instantâneo; f) tubo plástico contendo embriões congelados; g) pericarpos das sementes congelados e h) endospermas das sementes congelados.

As amostras foram submetidas à extração de proteínas, segundo as metodologias de Damerval et al. (1986), de Chen et al. (2002) e de Wang et al. (2003) (Quadro 1).

Quadro 1 – Metodologias avaliadas quanto à eficiência para a extração de proteínas de embrião de milho pipoca

Damerval et al. (1986)	Chen et al. (2002)	Wang et al. (2003)
Amostra vegetal macerada em almofariz na presença de nitrogênio líquido.	Amostra vegetal macerada em almofariz na presença de nitrogênio líquido.	Amostra vegetal macerada em almofariz na presença de nitrogênio líquido.
Adição do tampão de extração (acetona, 0,07% beta-mercaptoetanol, 10% TCA).	Adição do tampão de extração (0,25 M de NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 14 mM beta-mercaptoetanol).	Adição de 2 mL do tampão de extração “SDS/Fenol” (1 mL fenol + 1 mL tampão SDS, constituído por 30% sacarose, 2% SDS, 0,1 M Tris-HCl pH 8 e 5% de beta-mercaptoetanol)
Incubar a -20°C por 1 hora.	Homogeneizar em vórtex por 10 min. (4°C)	Homogeneizar e verter em tubos plásticos do tipo Falcon
Homogeneizar em vórtex por 10 min. (4°C)	Centrifugar à 35.000 g – 20 min – 4°C	Vórtexar (30 s)
Centrifugar a 30.000 g – 30 min – 4°C	Transferir o sobrenadante para novo tubo	Centrifugar a 10.000 g – 3 min – 4°C
Coletar o sobrenadante para novo tubo	Precipitar com cinco volumes de Acetona (-20°C).	Coletar a fase superior (fenol) para novo tubo
Precipitar com cinco volumes de Acetona + 0,07% beta-mercaptoetanol (-20°C)	Armazenar em freezer -20°C	Adicionar cinco volumes de 0,1 M acetato de amônio em metanol (gelado)
Armazenar em freezer -20°C		Armazenar em freezer -20°C – 30 min.
		Centrifugar 10.000 g – 5 min. – 4°C
		Lavar 2x com acetato de amônio em metanol (gelado)
		Lavar 2x com acetona (gelada)
		Armazenar em Freezer -20°C

Subsequente à extração das proteínas de cada amostra, as mesmas foram ressuspensas em 1% SDS (sódio dodecil sulfato) em água ultrapura Milli-Q®. A quantificação foi realizada com o método BCA (ácido bicinconínico) descrito por Smith et al. (1985). Para tal propósito, utilizou-se o padrão BSA (albumina de soro

bovino),  $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ . Foi adicionado às amostras 1 mL da solução de BCA e solução de  $\text{CuSO}_4$  4% - 50:1, sendo as amostras mantidas em banho-maria por 30 minutos, a  $60^\circ\text{C}$ . As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro a 562nm.

Utilizando-se os valores de absorvância do padrão, um gráfico (curva padrão) de dispersão foi construído no Microsoft Office Excel, obtendo, assim, o coeficiente angular da reta. Inicialmente, foi tomada a absorvância de uma amostra, a qual foi dividida pelo coeficiente angular da reta, sendo esse valor posteriormente dividido pelo volume inicial, que foi aliquotado para fazer a quantificação, dando uma concentração em  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ .

Subsequente à quantificação de proteínas, os perfis proteicos unidimensionais foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, 12%. Foi aplicado no gel o volume de amostra correspondente a uma concentração final de  $10 \mu\text{g}$ . A este volume foi adicionado o mesmo volume de tampão de amostra 2x (0,25 M Tris-HCL pH 6,8, 50% glicerol, 0,05% azul de bromofenol). Foram utilizados  $5 \mu\text{L}$  do padrão *prestained collor plus protein ladder* 10 kDa – 230 kDa (Biolabs).

As condições de eletroforese foram 70 volts por trinta minutos para o empilhamento, seguido por duas horas e trinta minutos a 150 volts, para a separação. Posteriormente, os géis foram fixados em solução de fixação (40% metanol, 7% ácido acético), por 30 minutos, e corados com comassie brilliant blue G-250, por 1 hora. Após este período, os géis foram descorados, utilizando-se solução descorante (40% metanol, 7% ácido acético) e subsequentemente fotodocumentados.

## **2.2. Proteômica quantitativa baseada em espectrometria de massa**

Novo experimento foi implantado para a obtenção das amostras definitivas, as quais foram utilizadas na análise proteômica, conforme a metodologia descrita a seguir.

### **2.2.1. Material vegetal**

As linhagens P11 (elevada capacidade de expansão) e P16 (baixa capacidade de expansão) de milho pipoca, que se encontravam na oitava geração de autofecundação (S8), foram semeadas a campo na FEI/CCA/UEM na última



semana do mês de outubro de 2012. A multiplicação das sementes foi realizada em campo experimental, constituída por parcelas contendo quatro linhas, duas para cada linhagem, cada uma com 10 m de comprimento, espaçamento de 0,90 m entre fileiras e 0,20 m entre plantas. Os tratamentos culturais foram realizados para a cultura, conforme o recomendado por Sawazaki (2001).

As linhagens foram autofecundadas na última semana de dezembro de 2012 por meio da cobertura dos pendões maduros com saco de papel tipo “kraft”. O pólen foi utilizado para o encobrimento da espiga da mesma planta.

Nos 15<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> dias após a polinização (15<sup>o</sup> DAP, 25<sup>o</sup> DAP), três espigas de cada tratamento foram coletadas e levadas ao Laboratório de Genômica e Expressão, localizado no Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri), UEM. As sementes de cada espiga foram excisadas das espigas e separadas conforme descrito anteriormente no item 2.1.2. (Figura 1). Ao mesmo tempo em que o processamento decorria, os embriões foram congelados em nitrogênio líquido e subsequentemente armazenados em freezer -90°C.

### **2.2.2. Preparo das amostras**

A parte inicial do processamento das amostras ocorreu no Laboratório de Genômica e Expressão – LaGEx/Nupagri/UEM. A extração de proteínas das amostras foi realizada conforme metodologia descrita por Chen et al. (2002). Inicialmente, foi realizada a pesagem das amostras, utilizando-se 300 mg de embriões por amostra, que foram colocados em almofariz para que se procedesse a maceração. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até formar um pó. Em seguida, foi adicionado o tampão de extração, constituído por 0,25 M de NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 14 mM beta-mercaptoetanol e inibidor de proteases 0,07% Pefabloc® (Sigma). As amostras foram transferidas para tubos falcon de 15 mL e homogeneizadas com o auxílio de um vórtex, por 10 minutos, a 4°C, e centrifugadas a 35.000 g, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos falcon de 15 mL, onde foi precipitado com acetona gelada (2,5 X). Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e armazenadas em freezer -90°C.

### **2.2.3. Quantificação, digestão e limpeza das amostras**

A continuidade do procedimento para análise proteômica das amostras ocorreu no Laboratório de Química de Proteínas – Instituto de Química / UFRJ. A ressuspensão das amostras foi realizada utilizando uma solução contendo ureia 7 M e tiouréia 2 M. Posteriormente, procedeu-se à quantificação das amostras, utilizando-se o método fluorimétrico Qubit® Fluorometer 2.0 (Invitrogen). As amostras foram diluídas em tampão bicarbonato de trietilamônio (TEAB) 200 mM (1:10), procedendo-se a seguir a redução das mesmas com ditioneitol (DTT) 10 mM durante 1 hora, na temperatura de 25°C. As amostras foram então alquiladas com iodoacetamida (IAA) 40 mM em temperatura ambiente no escuro.

As proteínas foram submetidas à reação de digestão, utilizando-se tripsina 1:50 (Promega) e a interrupção da reação foi realizada pela adição de ácido fórmico em concentração final de 1%. A limpeza e purificação das amostras foram realizadas utilizando-se Macro Spin Columns™ C-18 (Harvard Apparatus). A ativação das colunas foi realizada utilizando acetonitrila 100% (ACN), seguindo um período de equilíbrio com ácido trifluoroacético 0,1% (TFA). As amostras foram aplicadas em suas colunas específicas, lavadas e eluídas em duas fases. A primeira eluição foi realizada utilizando uma solução de acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 0,1%. Posteriormente, soluções de acetonitrila 70% e ácido trifluoroacético 0,1% foram utilizadas para realizar a segunda eluição. Em ambas as eluições, os peptídeos foram coletados em um mesmo tubo plástico.

Após digestão e limpeza, os peptídeos foram secos e, subsequentemente ressuspensos em tampão TEAB 50 mM. Realizou-se a quantificação dos peptídeos com intuito de alíquotar 25 µg de cada amostra, as quais foram utilizadas na próxima fase do experimento.

### **2.2.4. Marcação dos peptídeos**

A marcação isobárica dos peptídeos foi realizada utilizando-se iTRAQ® (Etiquetas isobáricas para quantificação relativa e absoluta - Sciex) 4 plex. Para tanto, as amostras contendo 25 µg de peptídeos foram organizadas de modo que ocorresse o agrupamento de amostras de embrião e suas respectivas épocas de coleta após a polinização.

Assim, peptídeos da linhagem P11<sub>15°DAP</sub> foram marcados pelo íon repórter de massa 114,1 Da; peptídeos da linhagem P11<sub>25°DAP</sub> foram marcados pelo íon repórter de 115,1 Da e peptídeos da linhagem P16<sub>15°DAP</sub> e P16<sub>25°DAP</sub> foram marcados pelos íons repórteres de 116,1 Da e 117,1 Da, respectivamente.

O preparo das marcações (114; 115; 116 e 117) foi realizado inicialmente pela adição de 95 µL de etanol gelado. Posteriormente, foram adicionados 30 µL de cada íon repórter nas suas respectivas amostras. Após instantânea agitação em vórtex e *spin* em centrífuga, as amostras foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente.

O término da marcação deu-se pela adição de 35 µL de tampão TEAB 50 mM. Ao término deste procedimento, as amostras foram concentradas em Speed-Vac até volume final de 5 µL.

No Quadro 2, estão disponibilizados os agrupamentos das amostras marcadas com os isóbaros iTRAQ® e suas respectivas replicatas biológicas (G1, G2 e G3).

Quadro 2 – Agrupamento das amostras para análise do proteoma quantitativo utilizando-se a técnica de marcadores isobáricos - iTRAQ®

Replicata biológica	Marcadores Isobáricos			
	114	115	116	117
G1	P11 (15) Emb.*	P11 (25) Emb.*	P16 (15) Emb.*	P16 (25) Emb.*
G2	P11 (15) Emb.*	P11 (25) Emb.*	P16 (15) Emb.*	P16 (25) Emb.*
G3	P11 (15) Emb.*	P11 (25) Emb.*	P16 (15) Emb.*	P16 (25) Emb.*

\* Linhagem (Dias após a polinização) Embrião.

### 2.2.5. Limpeza e pré-fracionamento das amostras após marcação isobárica

Após a marcação, as amostras foram pré-fracionadas, utilizando-se uma Macro SpinColumn™ de troca catiônica (SCX) Harvard Apparatus.

As amostras foram ressuspendidas em solução diluente de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM + ACN 25% (pH 3, ajustado com ácido fosfórico). A hidratação das colunas foi realizada com a solução diluente por 10 minutos, em temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 100 rpm por três minutos, sendo este passo de hidratação repetido mais uma vez.

A troca catiônica iniciou-se pela adição da amostra na coluna, procedendo-se à incubação por 10 minutos, em temperatura ambiente, e posterior centrifugação a 100 rpm por três minutos. O conteúdo que passou pela coluna foi coletado e novamente aplicado na mesma coluna. Após centrifugação, o conteúdo que passou pela coluna foi coletado e transferido para um novo tubo, designado por “Flow-Through” (FT).

A solução diluente foi aplicada às colunas e o conteúdo foi armazenado no tubo FT. O primeiro fracionamento foi realizado pela adição de 300 µL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM + ACN 25% + KCl 100 mM na SpinColumn. Após a centrifugação a 100 rpm por três minutos, o conteúdo foi coletado e armazenado em novo tubo (designado “100”). Na segunda etapa de fracionamento, adicionou-se 300 µL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM + ACN 25% + KCl 250 mM na SpinColumn. O conteúdo foi coletado e armazenado em novo tubo (designado “250”) após centrifugação a 100 rpm por três minutos. Por fim, a terceira etapa de fracionamento ocorreu pela adição de 300 µL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM + ACN 25% + KCl 500 mM na SpinColumn. O centrifugado obtido a 100 rpm por três minutos foi coletado e armazenado em novo tubo (designado “500”). Subsequentemente, todas as amostras (FT, “100”, “250” e “500”) foram concentradas em Speed-Vac.

A limpeza dos sais residuais do processo da troca catiônica foi realizada utilizando-se Macro Spin Columns™ C-18 (Harvard Apparatus). A ativação das colunas foi realizada utilizando acetonitrila 100% (ACN), seguido por um período de equilíbrio com ácido trifluoroacético 0,1% (TFA). Um volume de 300 µL de cada amostra foi aplicado em suas colunas específicas, lavadas e eluídas em duas fases. A primeira eluição ocorreu utilizando-se solução de acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 0,1%. Posteriormente, soluções de acetonitrila 70% e ácido trifluoroacético 0,1% foram utilizadas para realizar a segunda eluição. Decorrido o processo de dessalinização, todas as amostras foram concentradas utilizando-se Speed-Vac.

#### **2.2.6. Espectrometria de massa**

As amostras concentradas e contendo a mistura de peptídeos marcados e fracionados foram dissolvidas em 20 µL de ácido fórmico 0,1% e 1 µg destes peptídeos foi carregado numa pré coluna C18 de fase reversa (2 cm de

comprimento, 100  $\mu\text{m}$  diâmetro interno), tendo como resina a ReproSil-Pur C<sub>18</sub>-AQ 3  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, os peptídeos foram focalizados em uma coluna PicoFrit Self-Pack (18 cm de comprimento, 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno – New Objective) empacotada com o mesmo material.

As amostras foram analisadas em um sistema de EASY-nano LC (Proxeon Biosystems) acoplado em sequência a um espectrômetro de massa de alta resolução ESI-LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific).

Os peptídeos foram eluídos usando um gradiente que partiu de 100% fase A (0,1% de ácido fórmico, 5% de acetonitrila) até 35% da fase B (0,1% de ácido fórmico, 95% de acetonitrila), por 120 minutos; 35 – 100% da fase B, por cinco minutos; e 100% da fase B por oito minutos, totalizando 133 minutos em um fluxo de aproximadamente 250  $\text{nL min}^{-1}$ . Após cada corrida, a coluna foi lavada com 90% da fase B e reequilibrada com a fase A.

Os espectros  $m/z$  foram obtidos em modo positivo com aquisição automática dado-dependente (DDA – “Data Dependent Acquisition”) dos espectros de MS (espectrometria de massa) e MS/MS. Os espectros de MS foram obtidos em alta resolução no analisador Orbitrap com resolução de 60.000 para 400  $m/z$  (massa/carga), faixa de massa de 400 a 1800  $m/z$ , Automatic Gain Control (AGC) de  $1 \times 10^6$  e máximo de tempo de injeção de 500 ms. Os espectros de MS/MS foram adquiridos por HCD (Dissociação colisional de alta energia) em alta resolução no Orbitrap para os 10 íons mais intensos, com carga  $\geq 2$ , resolução de 7.500 para 400  $m/z$ , limite de sinal de 30.000, energia normalizada de colisão de 40 e exclusão dinâmica de 30 s.

Uma solução de amônia a 5% contida em um falcon de 15 mL, com a tampa aberta, foi colocada próxima à região do Eletrospray (agulha) para evitar o efeito de aumento de carga iônica, ocasionado pelo iTRAQ – 4 plex, fenômeno este já previamente descrito por Thingholm et al. (2010) e Nogueira et al. (2013).

Os resultados obtidos foram armazenados em arquivos RAW.

### **2.2.7. Análise dos dados**

Os arquivos RAW foram visualizados no software Xcalibur v.2.1 (Thermo Scientific), as pesquisas realizadas em bancos de dados e o processamento dos dados foi conduzido utilizando o software Proteome Discoverer v.1.4, com o

algoritmo Sequest concatenado ao banco de dados de *Zea mays* L., obtido a partir do UniProt (Fonte Universal de Proteínas), baixado em janeiro de 2014, apresentando 62.975 entradas.

As pesquisas foram realizadas com os seguintes parâmetros: acurácia do MS de 10 ppm, acurácia do MS/MS de 0,1 Da para HCD, digestão com tripsina com duas clivagens permitidas, modificação fixa de carbamidometilação na cisteína, modificações variáveis de oxidação da metionina e causada pela marcação isobárica do iTRAQ-4plex (massa monoisotópica – 144,102) nos aminoácidos de lisina e regiões N-terminais.

O número e grupos de proteínas e o número de peptídeos, assim como os valores quantitativos de cada marcador foi estimado utilizando o software Proteome Discovery por meio do algoritmo Sequest. A taxa de *false discovery* de 1% e um *peptide rank* de um foram aplicados como limites de cortes.

O experimento consistiu em um total de 36 corridas no espectrômetro de massa, oriundas de três replicatas biológicas (G1, G2 e G3), quatro etapas de fracionamento (100, 250, 500 e FT) e três replicatas técnicas (corridas no espectrômetro de massa).

O estudo de proteínas com expressão diferencial dentro das diferentes comparações estabelecidas pelo uso do marcador isobárico iTRAQ utilizou as diferentes intensidades dos picos para cada íon repórter (114; 115; 116; 117) para comparar quantitativamente a expressão diferencial dos tratamentos: P11<sup>15°DAP</sup>, P11<sup>25°DAP</sup>, P16<sup>15°DAP</sup> e P16<sup>25°DAP</sup>, que corresponderam, respectivamente, às marcações 114, 115, 116 e 117.

O critério utilizado para escolha das proteínas com expressão diferencial foi estabelecido considerando apenas as proteínas com expressão diferencial superior a 1,5x ou inferior a 1,5x ao se comparar dois tratamentos quaisquer, conforme Huang et al. (2002).

A análise das proteínas com expressão diferencial entre as diferentes comparações de tratamentos foi inicialmente realizada por meio da confecção dos Diagramas de Venn e isso foi possível mediante utilização do aplicativo Venny (Oliveros, 2007), disponível em <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>.

Considerando que as análises são realizadas entre as razões dos tratamentos e devido ao posicionamento da linhagem P16 ser no numerador destas razões (exceto para 115/114), observa-se que, ao afirmar que a proteína se

expressou mais na linhagem P16, assume-se automaticamente uma redução na expressão desta mesma proteína na linhagem P11, sendo o oposto também válido.

A classificação para função biológica, componente celular e função molecular de cada proteína identificada foi realizada pelas anotações do Gene Ontology, disponível em AgBase versão 2.0 Mississippi State University (<http://agbase.msstate.edu>), utilizando-se o banco de dado de *Zea mays* com última atualização em 16 de maio de 2014 e o número de identificação do Uniprot para a realização das buscas para cada proteína identificada (McCarthy et al., 2011).

As proteínas expressas nos embriões foram alocadas em vias metabólicas, utilizando-se o recurso Search & Color Pathways utilizando o KEGG Mapper (Kyoto Encyclopedia de Genes e Genomas), disponível em [http://www.genome.jp/kegg/tool/map\\_pathway2.html](http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html) (Kanehisa et al., 2012).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Padronização da extração de proteínas de embrião de sementes de milho pipoca

Os resultados referentes à quantificação de proteínas ( $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) nas massas iniciais de embriões de milho pipoca, obtidos pelo método BCA, para as três metodologias testadas encontram-se no Quadro 3.

A quantificação realizada pelo método BCA mostrou diferenças nas concentrações de proteínas, considerando as diferentes massas (g) de embrião para as diferentes metodologias avaliadas.

Quadro 3 – Concentração de proteínas quantificadas pelo método BCA (em  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ), extraídas de embrião de sementes de milho pipoca por diferentes metodologias

Massa (mg)*	Concentração de proteínas ( $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ )		
	Damerval et al. (1986)	Chen et al. (2002)	Wang et al. (2003)
100	0,00	1,68	0,24
200	0,04	2,16	0,30
300	0,04	2,23	0,00
400	0,05	2,60	-

\* Massa inicial de embrião de milho pipoca.

A extração de proteínas dos embriões utilizando a metodologia de Damerval et al. (1986) foi menos eficiente do que a metodologia de Wang et al. (2003). Em contrapartida, a metodologia de Chen et al. (2002) foi superior às demais metodologias, sendo observado um aumento na concentração de proteínas concomitantemente com o aumento de massa inicial utilizada para extração.

Observou-se que a massa inicial de 100 mg de embrião extraída pela metodologia de Chen et al. (2002) possibilitou a obtenção de  $1,68 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  de proteínas. Quando foi utilizada a massa inicial de 200 mg de embrião, foi obtida uma concentração de proteínas de  $2,16 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ , demonstrando, assim, um incremento de 35,7% na concentração. Este incremento não foi observado para as massas de 300 e 400 mg, nas quais as concentrações obtidas foram de 2,23 e  $2,60 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ , respectivamente.



O perfil eletroforético obtido evidenciou que massas iniciais de 300 e 400 mg foram mais efetivas para a obtenção de proteínas do embrião (Figura 2). Isso pode ser visualizado quando se compara o número e nitidez das bandas observadas entre 40 e 50 kDa para as massas iniciais de 300 e 400 mg em relação às massas iniciais de 100 e 200 mg.

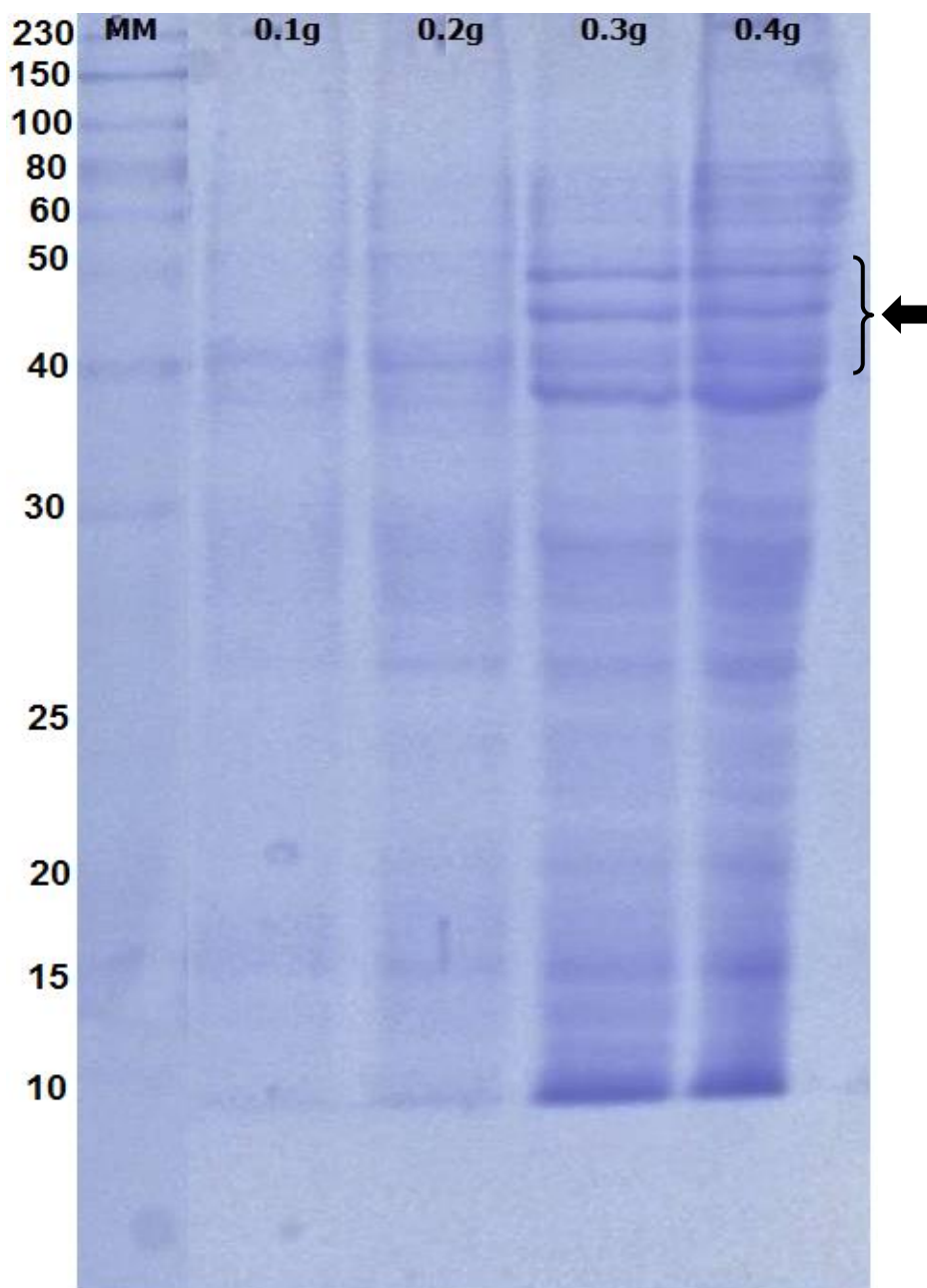


Figura 2 – Perfil proteico (SDS-Page 12% de 10 µg de proteínas) obtido de embriões de milho pipoca, mediante utilização da metodologia de Chen et al. (2002). A seta indica presença de bandas entre 40 a 50 kDa.

Desta forma, conclui-se que a extração de proteínas de embriões de milho pipoca deve ser realizada conforme a metodologia de Chen et al. (2002), com massa inicial de 300 mg, a qual utiliza um tampão de extração salino.

Branlard e Bancel (2007) citam que a extração de proteínas de sementes geralmente é realizada sem muitas dificuldades. Entretanto, deve-se observar que a semente não é um tecido homogêneo e elas frequentemente são ricas em polissacarídeos, lipídios e outros compostos, que são resultantes do metabolismo secundário e que podem interferir no processo de extração.

As duas observações levantadas por Branlard e Bancel (2007) não se tornam tão preocupantes neste trabalho, pois o material vegetal utilizado foi o embrião e não a semente inteira, mesmo considerando que o embrião é formado por diferentes tecidos. Ressalte-se ainda que a extração foi realizada em embriões no 15<sup>o</sup> ou 25<sup>o</sup> DAP, períodos que precedem à deposição de reservas em sementes de milho (Campo et al., 2004; Jiménez-López et al., 2011).

A metodologia de extração utilizada deve ser escolhida conforme os objetivos da análise proteômica que será realizada (Isaacson et al., 2006). Este fato pode ser observado no trabalho de Campo et al. (2004), no qual foram utilizadas duas metodologias de extração: uma com o tampão fosfato-citrato pH 2,8 e a outra com o tampão Tris-HCl salino pH 7,5. O objetivo do trabalho destes autores foi verificar o perfil protéico obtido, mediante utilização dos dois tampões de extração, em embriões de milho submetidos à germinação após infecção com *Fusarium verticillioides*. Os autores observaram 36 spots de proteínas que apresentaram aumento de expressão durante a germinação de embriões infectados. Desses spots, 23 foram observados quando foi utilizado o tampão fosfato-citrato (pH 2,8) e 13 quando o tampão utilizado foi o Tris-HCl salino (pH 7,5).

Entre as proteínas extraídas mediante utilização do tampão fosfato-citrato, destacaram-se: a *fructose-bisphosphate aldolase*, *glutathione transferase*, *putative glucan endo-1,3-beta-D-gluosidase*, *adenosine kinase*, *glyceraldehyde 3-phosphate*, *late embryogenesis abundant protein* e *superoxide dismutase* (Campo et al., 2004). Por outro lado, a extração realizada com o tampão Tris-HCl salino (pH 7,5) revelou que as proteínas *heat shock protein*, *initiation factor 5A*, *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*, *catalase* e *globulina-2* foram diferencialmente expressas. Isso evidenciou que as diferentes metodologias e, conseqüentemente, os tampões extraem

proteínas de diferentes naturezas bioquímicas e isso, dependendo do objetivo da pesquisa, deve ser considerado.

### 3.2. Proteínas extraídas de embriões de milho pipoca

A análise de variância referente às proteínas extraídas dos embriões das duas linhagens de milho pipoca, nas duas épocas de coleta, evidenciou diferenças estatísticas significativas a 1% de probabilidade pelo teste F (Quadro 4).

Quadro 4 - Análise de variância da concentração de proteína extraída de 300 mg de embrião das linhagens P11 e P16 de milho pipoca em duas épocas de coleta (15<sup>o</sup> DAP e 25<sup>o</sup> DAP) e desdobramento das interações Linhagem x Época

Fatores de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Linhagem (L)	1	1.669.548,0	1.669.548,0	13,028**	0,0069
Época (E)	1	7.470.252,0	7.470.252,0	58,293**	0,0001
L x E	1	1.251.948,0	1.251.948,0	9,769*	0,0141
L / E1	1	15.000,0	15.000,0	0,117 <sup>NS</sup>	0,7411
L / E2	1	2.906.496,0	2.906.496,0	22,680**	0,0014
E / L1	1	1.302.936,0	1.302.936,0	10,167*	0,0128
E / L2	1	7.419.264,0	7.419.264,0	57,895**	0,0001
Resíduo	8	1.025.208,0	128.151,0		
Total	11	11.416.956,0			

CV – 20,66%

GL – Graus de liberdade; SQ – Soma de quadrado; QM – Quadrado médio; Fc – Valor de F calculado; Pr>Fc – Probabilidade mínima significativa; E1 – Época de coleta realizada no 15<sup>o</sup> DAP; E2 – Época de coleta realizada no 25<sup>o</sup> DAP; L1 – Linhagem P11; L2 – Linhagem P16. \* Significativo pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ); \*\* Significativo pelo teste F ( $p \leq 0,01$ ); <sup>NS</sup> Não significativo.

A interação entre as linhagens e as épocas também evidenciou diferenças estatísticas significativas com probabilidade mínima de 0,0141 (Pr>Fc), indicando diferença na quantidade de proteínas extraídas dentro de uma mesma linhagem para as duas épocas de coleta e/ou em uma mesma época de coleta para as diferentes linhagens.

A análise de variância também foi realizada para o desdobramento do fator linhagem para as duas diferentes épocas de coleta e na época de coleta para as diferentes linhagens. Assim, constatou-se que não existem diferenças estatísticas significativas na quantidade de proteínas extraídas entre as linhagens de milho pipoca no 15<sup>o</sup> DAP, sendo que a concentração média de proteína nas linhagens P11 e P16 para esta época de coleta foi de 894  $\mu\text{g } 300 \text{ mg}^{-1}$  e 994  $\mu\text{g } 300 \text{ mg}^{-1}$ , respectivamente (Figura 3).

Contraopondo-se à situação anterior, foi possível observar diferença estatística significativa ( $P > F_c$  de 0,0014) na concentração de proteínas extraídas no 25º DAP, sendo obtida uma concentração média de  $1.826 \mu\text{g } 300 \text{ mg}^{-1}$  de proteínas na linhagem P11, quando comparado a  $3.218 \mu\text{g } 300 \text{ mg}^{-1}$  na linhagem P16 (Figura 3).

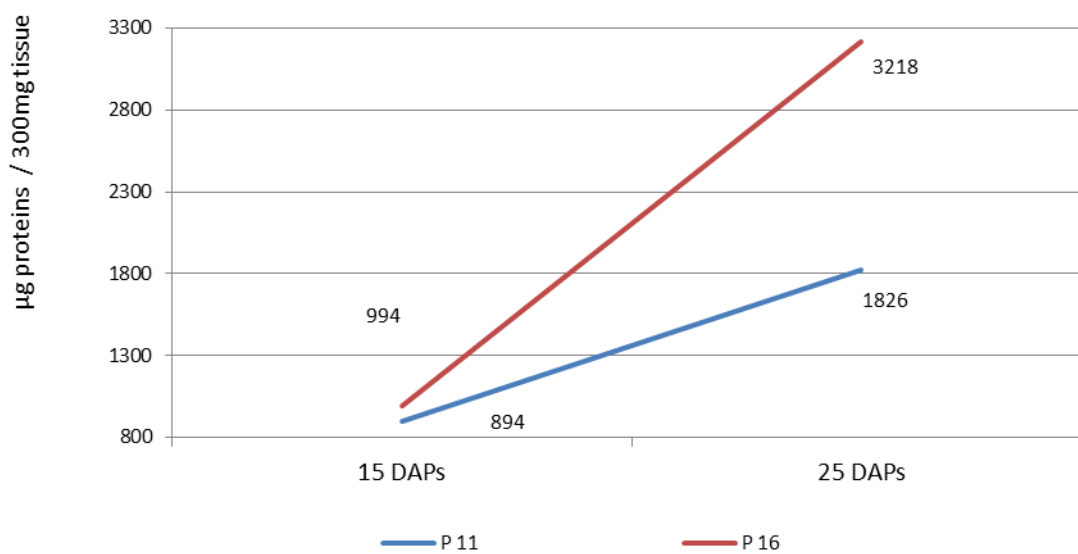


Figura 3 – Concentração de proteínas extraídas dos embriões das linhagens de milho pipoca P11 e P16 no 15º e 25º DAP, utilizando a metodologia de Chen et al. (2002).

O desdobramento do fator época revelou diferenças estatísticas significativas a 5% de probabilidade no 15º DAP e diferenças estatísticas a 1% de probabilidade entre as linhagens P11 e P16. Observa-se, assim, para ambas as linhagens, um incremento considerável na concentração de proteínas presentes em 300 mg de embriões no 25º DAP, ou seja, o processo de embriogênese propiciou um aumento na quantidade de proteínas nesta estrutura, fato esse bem evidenciado na linhagem P16 de milho pipoca.

### 3.3. Proteoma quantitativo baseado em espectrometria de massa

Inicialmente, os arquivos RAW obtidos das 36 corridas realizadas no espectrômetro de massa foram avaliadas quanto à reprodutibilidade dos cromatogramas entre as três replicatas técnicas, conforme o Quadro 2, para as replicatas biológicas (G1, G2 e G3). Para isso, os arquivos foram visualizados no software Xcalibur V.2.1 que possibilitou a análise conjunta dos cromatogramas.

Na Figura 4, estão disponibilizados os cromatogramas obtidos das replicatas técnicas para o fracionamento de “250”, realizado com 250 mM de KCl (mais informações constam no material e métodos). Os valores observados sobre os picos dos três cromatogramas correspondem ao tempo de retenção de determinados peptídeos. Pode-se observar a existência de variações inferiores a um minuto, indicando elevada reprodutibilidade entre os cromatogramas das diferentes replicatas técnicas para todas as etapas de fracionamento.

A análise conjunta das três replicatas biológicas de embrião utilizando o algoritmo Sequest por meio do software Proteome Discovery, evidenciou a identificação de 3.241 proteínas correspondentes a 917.520 espectros de peptídeo de partida - *peptide spectrum matches* (PSM) e a 223.142 peptídeos.

A mesma análise foi realizada utilizando-se filtros de busca no software proteome Discovery. Foram utilizados dois filtros para peptídeos, são eles: confiança do peptídeo/confiança mínima – elevada e ranqueamento do peptídeo/ranqueamento máximo – 1ª; e três filtros para proteínas, sendo: número mínimo de peptídeos – 2, contabilizar apenas o primeiro peptídeo do ranqueamento e contabilizar apenas peptídeo na proteína de maior score.

Assim, foi possível evidenciar a presença de 1.189 proteínas altamente confiáveis, correspondentes a 90.519 PSM e a 8.105 peptídeos. Desse total de proteínas (1.189), 83,85% corresponderam a 997 proteínas que apresentaram pH entre 4 e 9 ou ponto isoelétrico

O número de estudos relacionados à proteômica em embriões de milho é reduzido. Entre eles, alguns estão relacionados ao desenvolvimento (embriogênese), estudos relacionados à germinação, resposta de defesa frente à infecção fúngica seguido por processo de germinação, entre outros. Até o momento, nenhum trabalho de proteômica foi realizado em embriões de milhos especiais, como o pipoca.

Segundo Zhang et al. (2013) o estudo de proteômica tem sido impulsionado pelo desenvolvimento de tecnologias de separação de proteínas e peptídeos, análises em espectrometria de massas, marcação isotópica para a quantificação e análise de dados pela bioinformática. Assim, melhorias nas técnicas de separação e identificação de proteínas e a expansão do conhecimento genômico estão possibilitando respostas a diferentes questionamentos biológicos (Isaacson et al., 2006).

RT: 0.00 - 120.02

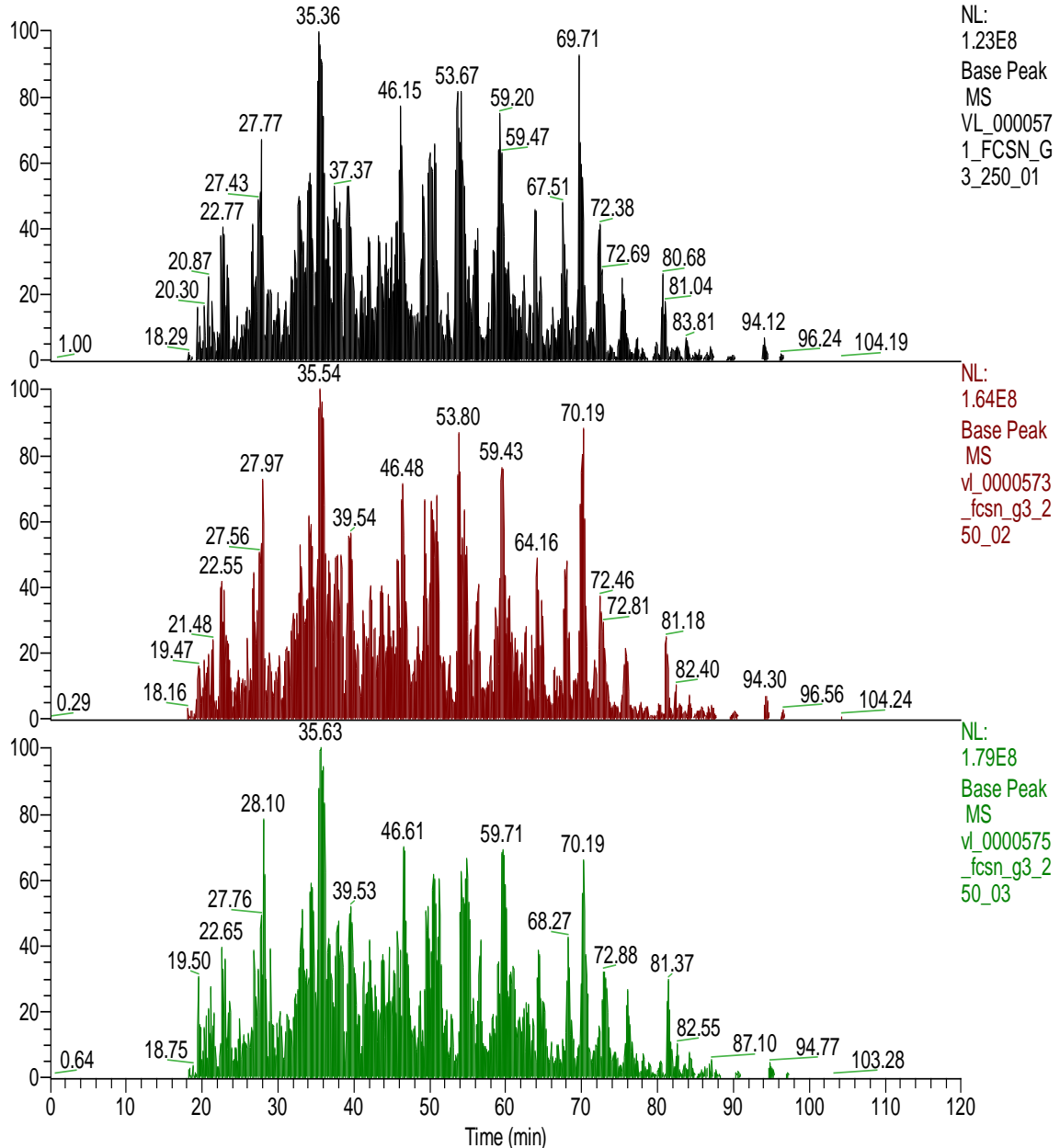


Figura 4 – Cromatogramas obtidos pelo software Xcalibur V.2.1 para as replicatas técnicas obtidas após fracionamento de 250 mM KCl. Os cromatogramas de cor preta, vermelha e verde correspondem, respectivamente, às replicatas técnicas das replicatas biológicas de G1, G2 e G3 para embrião de milho pipoca. Os valores sobre os picos indicam o tempo de retenção via cromatografia líquida dos peptídeos.

A melhoria nas técnicas de separação e identificação de proteínas é evidenciada na retrospectiva dos trabalhos de proteômica realizados com embriões de milho comum. A maioria dos pesquisadores adota a ferramenta de 2-DE para

avaliar a expressão diferencial de proteínas, como, por exemplo, Chen et al. (2002), Campo et al. (2004), Wang et al. (2004), Liu et al. (2009a) e Gong et al. (2013). Nesses trabalhos, o número máximo de spots observados em um gel foi 1.500 spots, obtido por Chen et al. (2002). Por outro lado, o número máximo de proteínas identificadas foi de 110 no 40º DAP, após indução à seca artificial (Wang et al., 2014), e somente um trabalho conduzido por Lu et al. (2008) sobre fosfoproteoma, durante o processo de germinação de embriões tolerantes à dessecação, utilizou a abordagem “Shotgun” para análise proteômica.

A análise proteômica realizada pela abordagem “Shotgun” é extremamente poderosa no que se refere à quantidade de dados obtidos, quando comparada com os dados dos géis 2-DE e, por isso, esta abordagem tem sido extensivamente utilizada, não apenas para identificação de sistemas proteicos, mas também para a quantificação de proteínas (Matallana-Surget et al., 2010).

Observa-se que a resolução da técnica 2-DE para análise proteômica quantitativa não é tão eficiente, quando comparada a outras técnicas, como a abordagem “Shotgun” e a utilização de marcadores isotópicos. Esta eficiência só é possível pela elevada resolução dos espectrômetros de massa, marcação isotópica para quantificação e o surgimento de novos e mais poderosos softwares para identificação de proteínas, isso também associado ao aumento de informações nos bancos de dados de proteínas de *Zea mays* L. e ao sequenciamento genômico da espécie. Esse resultado é evidenciado pelo trabalho de Lu et al. (2008) que, utilizando a abordagem proteômica “Shotgun”, associada ao fracionamento da amostra por troca catiônica (SCX), seguida pelo sequenciamento por LC-MS/MS, identificaram 776 proteínas com expressão diferencial.

Desta forma, evidencia-se a importância desse trabalho no desenvolvimento científico desta espécie, por ser o primeiro a adotar a abordagem de análise “Shotgun” na expressão diferencial entre linhagens de milho pipoca que apresentam diferentes índices para a característica de capacidade de expansão.

### **3.4. Função biológica, molecular e componentes celulares associados às proteínas identificadas nos embriões**

Visando a compreender as funções biológica e molecular, assim como os componentes celulares associados às 1.189 proteínas identificadas nos embriões de milho pipoca, realizou-se buscas no Gene Ontology (GO) do AgBase Search

(<http://agbase.msstate.edu/index.html>) do software AgBase v.2.0 – Mississippi State University (McCarthy et al., 2011).

### **3.4.1. Função molecular e componentes celulares**

Na Figura 5, pode-se observar o conjunto de proteínas em percentual, obtido a partir de buscas relacionadas à função molecular e componente celular, na qual cada proteína identificada no embrião foi anotada. No que se refere à função molecular, foram obtidas treze diferentes anotações. Da mesma forma, para a categoria de componentes celulares, foram obtidas dezesseis diferentes anotações que evidenciaram onde essas proteínas se encontraram alocadas nas células dos embriões de milho pipoca.

Quanto à função molecular das proteínas identificadas, as buscas revelaram que, aproximadamente, 37,9% apresentaram a função de atividade catalítica (Figura 5). É possível observar, ainda, proteínas com função molecular de ligação a nucleotídeos com percentual de 14,4%, ligação a íons metálicos (10,5%), ligação a outras proteínas (8,9%), com atividade molecular estrutural (6,5%) e função molecular de ligação ao RNA (4,6%).

Cinco outras funções moleculares também foram evidenciadas, mas estas apresentaram percentual igual ou abaixo de 2%. São elas: funções moleculares de atividade antioxidante, ligação ao DNA, atividade reguladora de enzimas, atividade de transdutor de sinais e atividade de transporte. Nessa análise, foram obtidas aproximadamente 11% das proteínas sem anotação para função molecular.

Com relação às anotações para componentes celulares, inicialmente, observou-se que 17,4% das proteínas não foram identificadas quanto à localização celular, percentual este superior quando comparado às proteínas que não tiveram notação em algum tipo de função molecular (11%). Observou-se, também, que 24,9% das proteínas identificadas nos embriões de milho pipoca localizaram-se no citoplasma da célula vegetal, da mesma forma que 19,4% das proteínas estão localizadas na membrana celular, 10,1% no citosol, 6,4% no núcleo, 5,3% apresentam função estrutural nos ribossomos, 3,2% das proteínas estão localizadas no vacúolo celular, 3% estão localizadas nas mitocôndrias e 2,5% estão localizadas no lúmen das demais organelas e também no espaço extracelular.



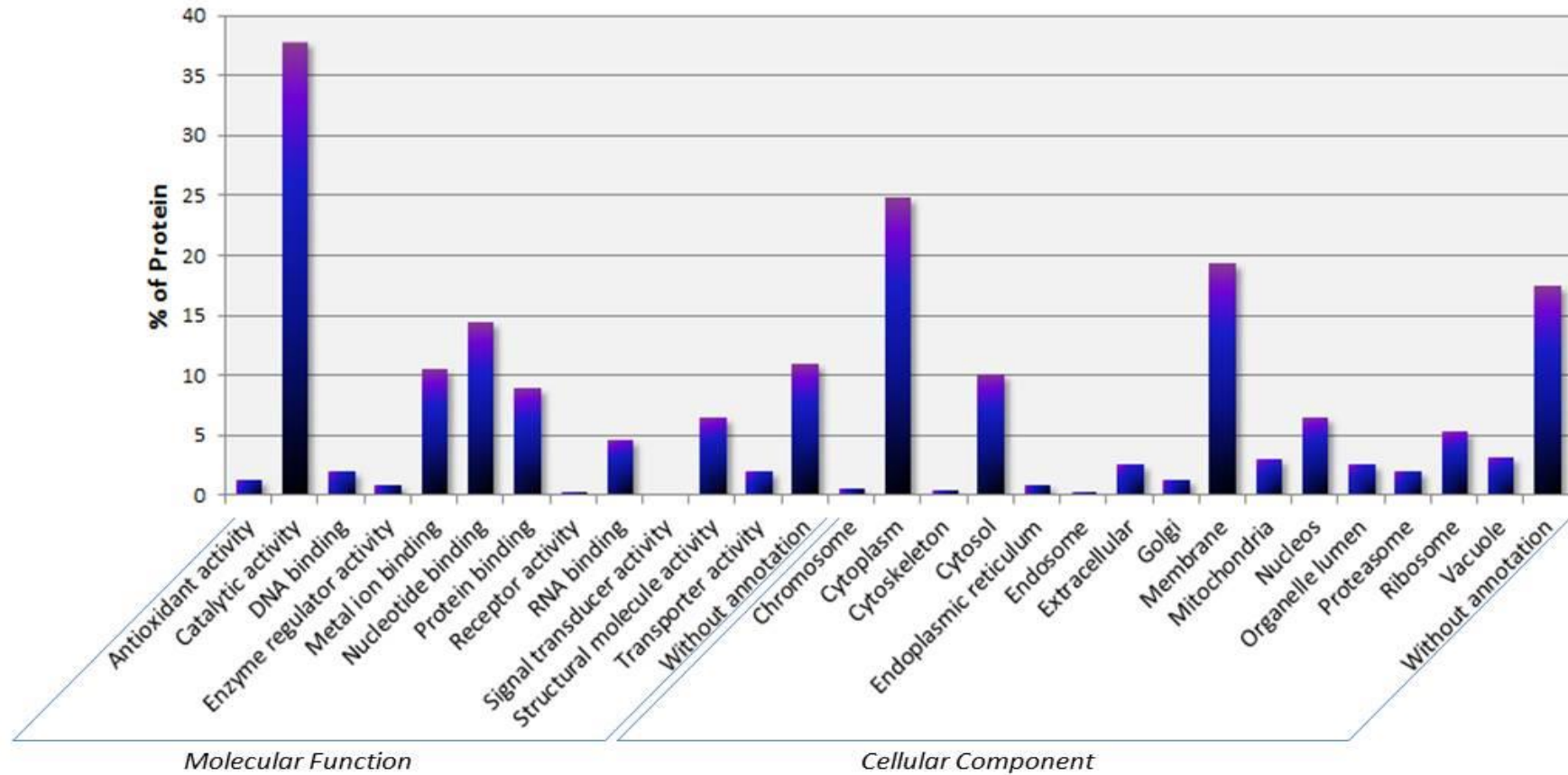


Figura 5 – Anotações para função molecular e componentes celulares, obtidas no Gene Ontology para as 1.189 proteínas identificadas em embrião de milho pipoca utilizando a ferramenta AgBase Search do software AgBase 2.0.

Seis componentes celulares foram observados, nos quais as proteínas identificadas em embriões foram alocadas. Contudo, foram obtidos percentuais iguais ou inferiores a 2%, nos cromossomos, no citoesqueleto, no retículo endoplasmático, em vesículas endocíticas, no complexo de Golgi e em proteossomas.

### **3.4.2. Função biológica**

A análise funcional das 1.189 proteínas identificadas nos embriões das duas linhagens de milho pipoca e nas duas épocas de coleta (DAP) foi realizada de maneira mais minuciosa, com intuito de pormenorizar os dados obtidos e facilitar sua interpretação. Utilizando-se as anotações do Gene Ontology do AgBase, foram obtidas 103 funções biológicas para a totalidade de proteínas identificadas e, destas, 797 apresentaram o número de apenas uma função biológica, segundo as buscas realizadas no banco de dados de *Z. mays* atualizado em 16 de maio de 2014. As 392 proteínas restantes apresentaram número variando de duas até oito diferentes funções.

Os dados foram compilados de forma que as proteínas que apresentaram duas ou mais funções tivessem apenas a sua primeira anotação funcional utilizada para as demais análises. As 103 diferentes funções foram agrupadas em 26 grandes grupos funcionais e, na Figura 6, estão dispostos os resultados das funções biológicas dessas proteínas. O grupo mais abundante, com 32,5% das proteínas, compreendeu aquelas que apresentaram funções ligadas a processos metabólicos; o segundo grupo, mais abundante, alocou 11,5% das proteínas que não apresentaram função biológica identificada por este mecanismo de busca.

Apresentando funções relacionadas à tradução e à regulação da tradução gênica, foram encontradas 8,8% das proteínas, seguida por 8,5% de proteínas com função associada aos processos de oxirredução, 5,5% que apresentaram anotação funcional de resposta a estímulos, 3,6% apresentam funções associadas ao transporte celular, 4,3% relacionadas à biossíntese e resposta ao estresse e 2,4% de proteínas associadas às funções de enovelamento de proteínas, fosforilação e processos glicolíticos. Foram observadas ainda proteínas com função biológica no ciclo do ácido tricarbóxico correspondente a 1,4%, proteínas com funções associadas à transcrição gênica (1,4%) e desenvolvimento do gametófito (1,2%).

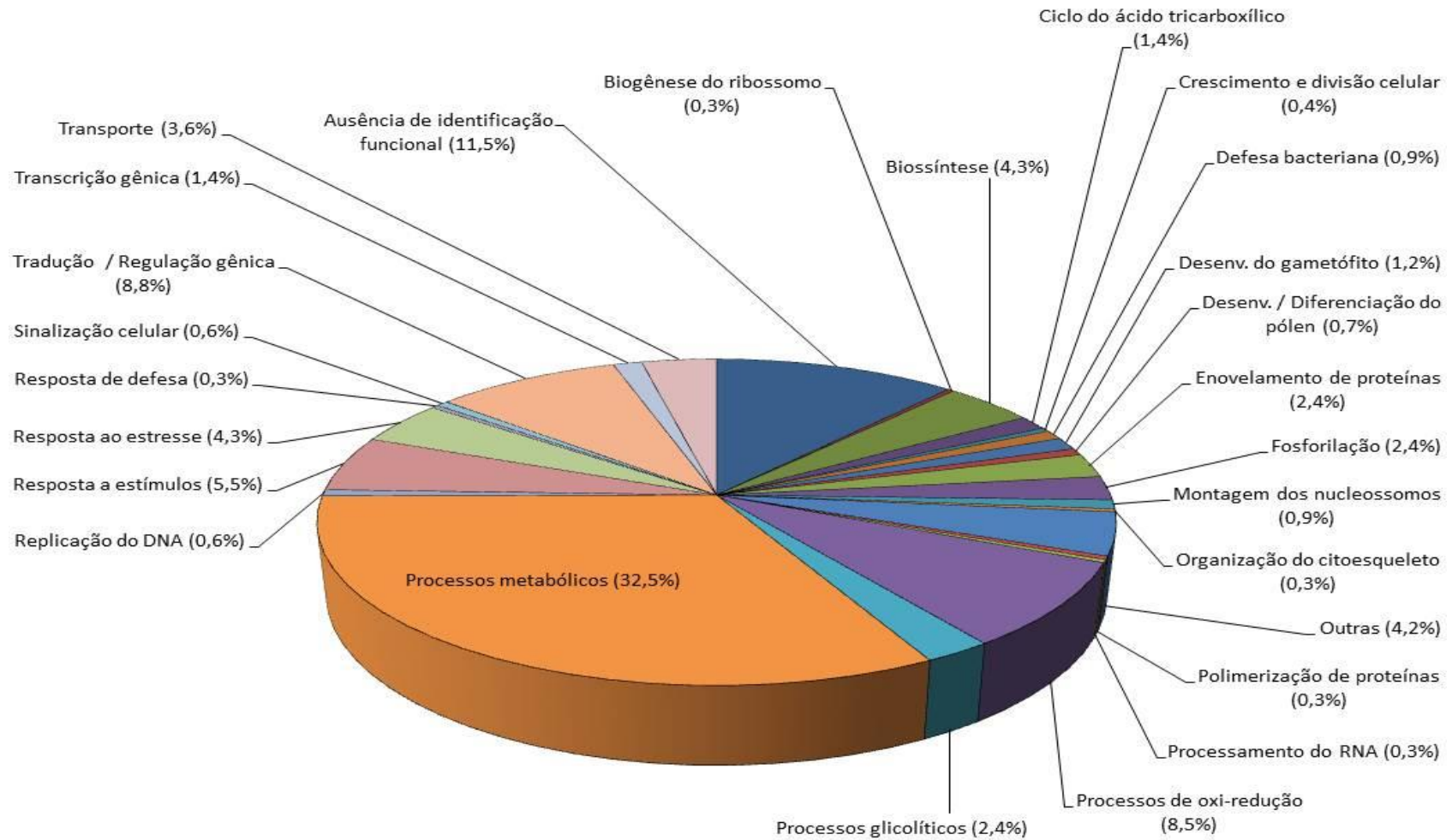


Figura 6 – Análise funcional das 1.189 proteínas identificadas nos embriões das linhagens P11 e P16 de milho pipoca, utilizando as anotações do Gene Ontology do AgBase.

As demais proteínas identificadas não excederam o percentual de 1% e estas corresponderam às funções de: biogênese do ribossomo, crescimento e divisão celular, defesa bacteriana, montagem dos nucleossomos, organização do citoesqueleto, polimerização de proteínas, processamento de RNA, replicação do DNA, resposta de defesa e sinalização celular.

Completando o percentual máximo de proteínas analisadas, 4,2% delas apresentaram outras funções de pouca representatividade, não excedendo o número máximo de quatro proteínas para uma determinada função. Entre as funções desempenhadas por essas proteínas, observou-se: apoptose, armazenamento de lipídios, assimilação de sulfatos, atividade antioxidante, oxirredutase e peroxidase, biogênese de corpos lipídicos, biossíntese de celulose, glutatona, porfirina, riboflavina, fosfolipídio, lignina, pantotenato e glicolipídios, defesa contra fungos, desenvolvimento da semente, do óvulo e do sistema radicular, germinação da semente, ligação a íons metálicos, metilação, reserva de nutrientes, respostas a anoxia, dessecação, fermentos, ácido abscísico, arsênio e estímulo luminoso, transporte de aminoácidos, lipídios e oxigênio.

Liu et al. (2008), avaliando a expressão de genes durante o desenvolvimento de sementes de milho, observaram, ao final do processo de desenvolvimento das sementes, que 31% dos genes relacionavam-se à categoria funcional de metabolismo e função relacionada a proteínas (síntese e endereçamento), seguido por 14% dos genes associados à função de biogênese de componentes celulares e 10% às funções de transporte. Neste mesmo trabalho, os autores realizaram análises para cada período de desenvolvimento da semente.

Embora os dados sejam para semente inteira e não apenas para o embrião, foi possível observar que no 15<sup>o</sup> DAP os maiores percentuais de proteínas associadas a funções foram: 35% para funções metabólicas, 16% para funções relacionadas a proteínas, 14% dos genes associados a funções energéticas e 13% para as funções de defesa celular e transporte celular. No 25<sup>o</sup> DAP, foram observados maiores percentuais para funções de metabolismo (60%) e para funções relacionadas ao metabolismo energético e ao transporte celular, ambos com 19% (Liu et al., 2008).

Na Figura 7A, observa-se o desmembramento das diferentes funções biológicas relacionadas aos processos metabólicos correspondentes a 32,5% conforme a Figura 6. Das 387 proteínas incluídas nesse grande grupo funcional,

42,71% tiveram sua função anotada em processos metabólicos gerais, sem nenhuma indicação sobre a qual processo metabólico as mesmas pertencem. Em contrapartida, 17,88% dessas proteínas tiveram função atribuída ao metabolismo de carboidratos e 17,19% foram associadas ao metabolismo de proteínas.

Proteínas associadas ao metabolismo de ácidos nucleicos e a ácidos graxos foram identificadas com percentuais de 5,9% e 5,38%, respectivamente. Também foram identificadas proteínas com funções associadas ao metabolismo do ATP (4,69%), processos catabólicos do GTP (4,34%) e metabolismo da pectina (1,91%).

O grupo funcional de resposta a estímulos, composto por 65 proteínas e correspondente a 5,5% do total (Figura 6), foi desmembrado, permitindo observar que 45,9% dessas proteínas corresponderam à função biológica de resposta ao íon cádmio e 24,5% tem funções associadas à resposta ao frio, 17,3% apresentaram anotação funcional de resposta ao calor e 6,1% de resposta à hipóxia e ao peróxido e hidrogênio (Figura 7B).

O grupo de resposta ao estresse, que correspondeu a 4,29% (Figura 6), apresentou 51 proteínas, das quais, 61,84% apresentaram anotação funcional de resposta ao estresse salino, 21,05% com função biológica associada ao estresse oxidativo e 17,11% com função associada ao estresse osmótico (Figura 7C).

Na Figura 7D, é possível observar as diferentes funções atribuídas às proteínas identificadas nos embriões de milho pipoca relacionadas ao transporte celular: 30,16% das proteínas apresentaram função de transporte de íons, 28,57% função de transporte de proteínas, 25,4% apresentaram função associada ao transporte intracelular e 15,87% das proteínas foram identificadas com função associada ao transporte de membrana.

Concluindo a análise da Figura 7, observa-se em E o desmembramento das funções relacionadas à biossíntese, assim, 85,53% das proteínas foram associadas à biossíntese de aminoácidos e 14,47% à função de biossíntese da tiamina e do tiazol.

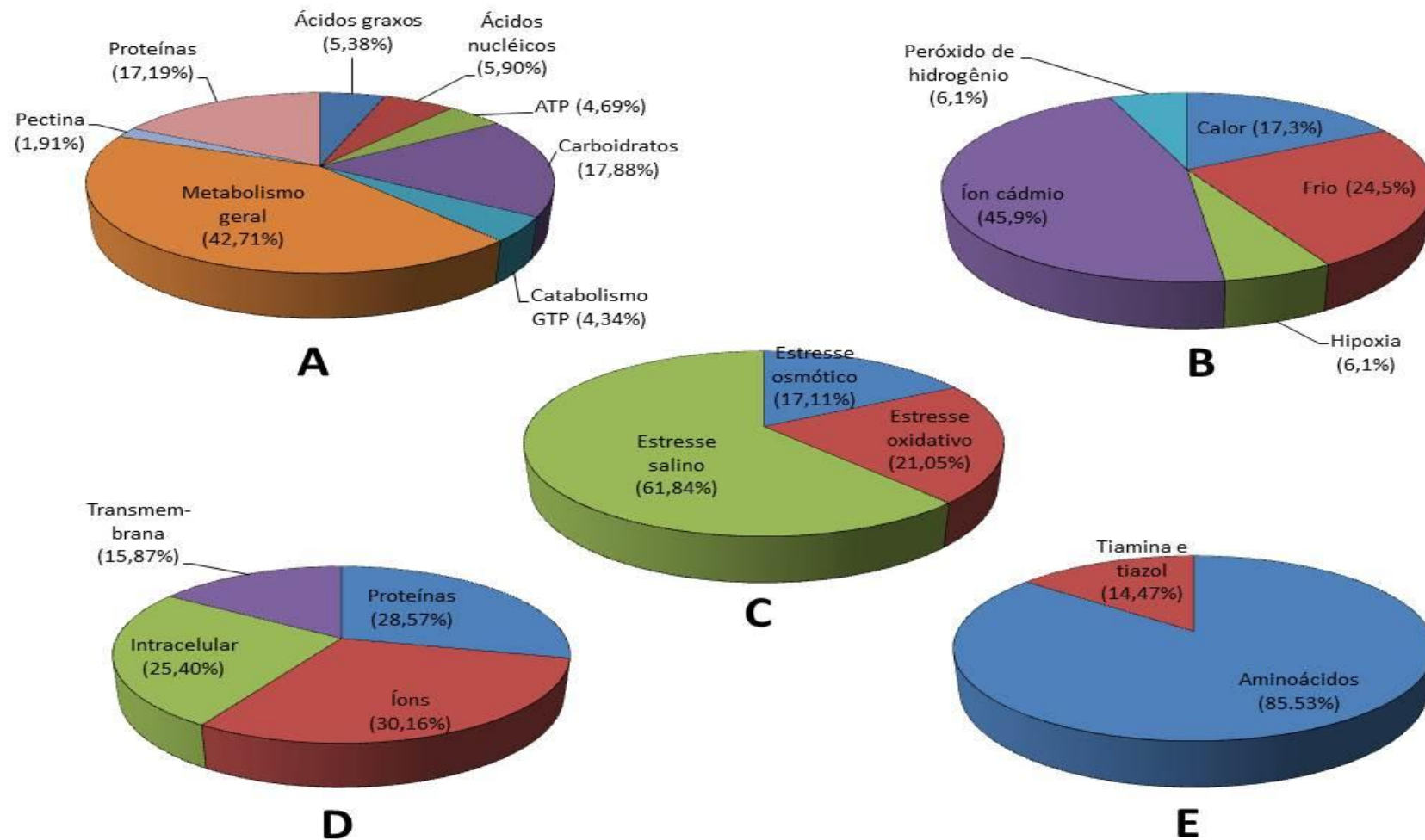


Figura 7 – (A) Análise funcional das 1.189 proteínas identificadas nos embriões das linhagens P11 e P16 de milho pipoca utilizando-se as anotações do Gene Ontology do AgBase. Funções biológicas relacionadas a processos metabólicos (B), resposta a estímulos (C), resposta ao estresse (D), transporte (E) e biossíntese (F).

### 3.5. Análise das proteínas identificadas em embriões de milho pipoca em diferentes vias metabólicas

As 1.189 proteínas identificadas nos embriões de milho pipoca foram comparadas no banco de dados do Kegg para milho (*Zea mays* L.). Com base nessa comparação, foi possível observar que 266 proteínas não tiveram coincidência (*matches*), ou seja, não foram incluídas em nenhuma via metabólica até o momento para *Z. mays*. As 923 proteínas restantes tiveram coincidência com o banco de dados e suas vias metabólicas serão abaixo discutidas.

Inicialmente, observou-se que das 923 proteínas com via metabólica elucidada, 93 delas (10,07%) eram proteínas ribossomais. As proteínas ribossomais são importantes pelo fato de estruturarem o ribossomo, sítio da síntese de proteínas nas células (Qin et al., 2013). O sequenciamento e sua comparação nos bancos de dados, seguido pela análise no software Kegg – Search & Color Pathways, revelou que 47 (50,54%) são proteínas estruturais da subunidade 60S do ribossomo, e 36 (38,71%) são proteínas estruturais da subunidade 40S do ribossomo. Um total de três proteínas (3,23%) foi simplesmente classificada como proteínas ribossomais e sete (7,53%) foram classificadas como proteínas ribossomais hipotéticas (Figura 8).

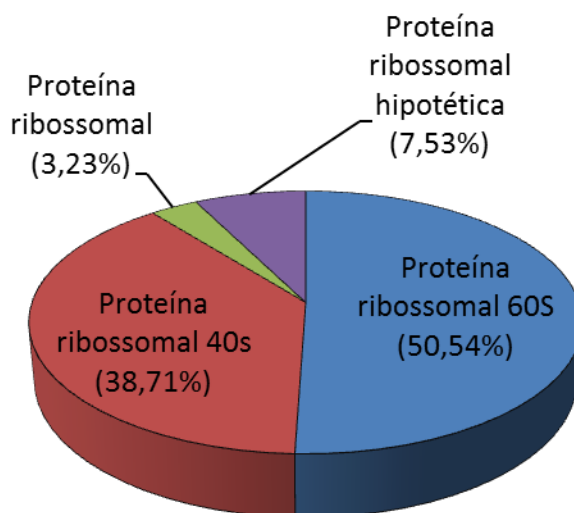


Figura 8 – Composição diferencial das 93 proteínas ribossomais estruturais encontradas em embriões de milho pipoca.

Na Figura 9, estão disponibilizadas as proteínas expressas na via metabólica de formação do ribossomo em embriões de milho pipoca. Observam-se nos quadros destacados em azul as proteínas expressas: 27 estão localizadas na subunidade



maior do ribossomo (subunidade 60S) e 21 na subunidade menor do ribossomo (subunidade 40S).

Excluindo-se as sete proteínas hipotéticas da via de formação do ribossomo e as três proteínas ribossomais de classificação inconclusivas, do total de 93 proteínas ribossomais. As 83 proteínas restantes não corresponderam ao total evidenciado na Figura 9, que apresenta apenas 27 proteínas para subunidade maior e 21 proteínas para a subunidade menor, totalizando 48 proteínas ribossomais. Isso se deve ao fato de muitas proteínas serem encontradas em duplicatas em uma mesma região ribossomal, mas apresentando código de acesso no Uniprot e, obviamente, a sequência de aminoácidos diferenciada. Como exemplo, observa-se a proteína ribossomal 60S L18 (ID: B6SJ08) e a proteínas ribossomal 60S L18 (ID: B6SJC8).

As 830 proteínas restantes analisadas apresentaram-se relacionadas a diferentes vias metabólicas.

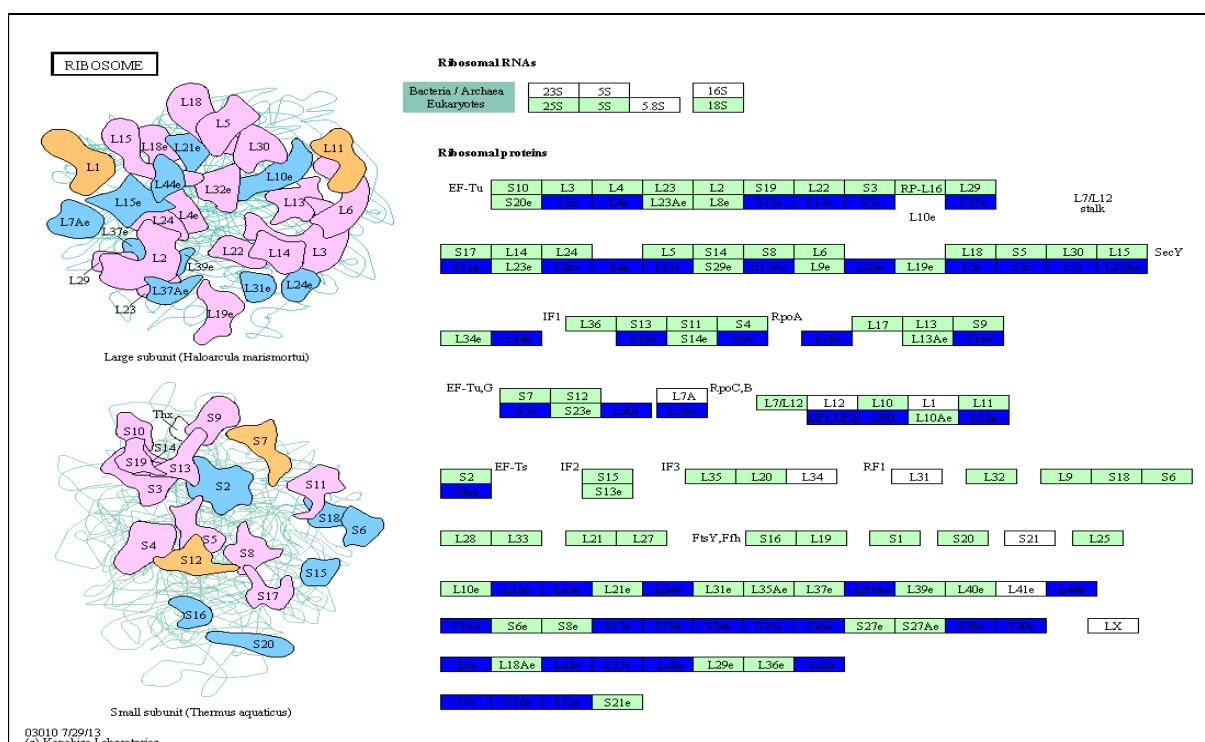


Figura 9 - Proteínas expressas no embrião de milho pipoca relacionadas à via de formação de ribossomos. Os quadros evidenciados em azul indicam proteínas expressas em embriões de milho pipoca que foram identificadas no banco de dados de *Z. mays*. já existente.



Na Figura 10, estão representadas, de forma resumida, as vias metabólicas com as quais cada proteína encontrada no embrião de milho pipoca foi relacionada.

No presente trabalho, 425 proteínas observadas foram relacionadas às vias metabólicas gerais, correspondendo a 51,3%, parte mais representativa do gráfico (Figura 10A). O segundo grupo mais representativo correspondeu a 200 proteínas, relacionadas às vias metabólicas de biossíntese (24,2%). Pertencentes a diferentes vias metabólicas, 43 proteínas (5,3%) foram agrupadas em “outras”, grupo este que será discutido posteriormente.

O quarto grupo mais representativo foi o de proteínas associadas às vias metabólicas de degradação, correspondendo a 25 proteínas (3,1%). Além das citadas acima, foram observadas proteínas associadas às vias metabólicas específicas de glicólise e gliconeogênese (3%), vias do ácido tri-carboxílico (2,6%), vias de fixação de carbono (2,1%), vias de processamento de proteínas no retículo endoplasmático, vias de transporte do RNA (1,7%) e vias associadas à formação de proteossomas (1,6%).

Os grupos menos representativos estão relacionados às vias metabólicas de fosforilação oxidativa, vias de formação dos peroxissomos e vias de mecanismo de reparo, com 1,3%, 1,2% e 1,1%, respectivamente.

Na Figura 10B, está representado o percentual de proteínas encontradas em embriões de milho pipoca que estão relacionadas a diferentes vias metabólicas. A análise destas proteínas no Kegg – Search & Color Pathways revelou que 32,4% estão associadas às vias metabólicas gerais: via metabólica dos carboidratos, compreendendo 62 proteínas (14,6%); via metabólica do piruvato, com 20 proteínas (4,9%); e proteínas associadas à via metabólica dos aminoácidos, com 41 proteínas (9,7%), as quais foram distribuídas em percentuais menores para os seguintes aminoácidos: alanina, aspartato, glutamato, arginina, prolina, cisteína, metionina, fenilalanina, glicina, serina, treonina e triptofano.

Foram identificadas 17 proteínas (4%) relacionadas com a via metabólica dos ácidos carboxílicos: 14 proteínas (3,3%) relacionadas à via metabólica do glioxalato e dicarboxilato; proteínas com participação em vias metabólicas da frutose e manose (2,9%), via do amido e açúcar (2,7%), vias metabólicas de nucleotídeos, via das purinas e via da glutatona (2,5%), via de ácidos graxos (2,2%), vias metabólicas das pirimidinas e inositol (1,4%), vias metabólicas do ascorbato,

aldarato e butanoato (1,3%) e, por fim, proteínas associadas à via metabólica do ácido alfa-linolênico (1%), C5-branched e propanoato.

67

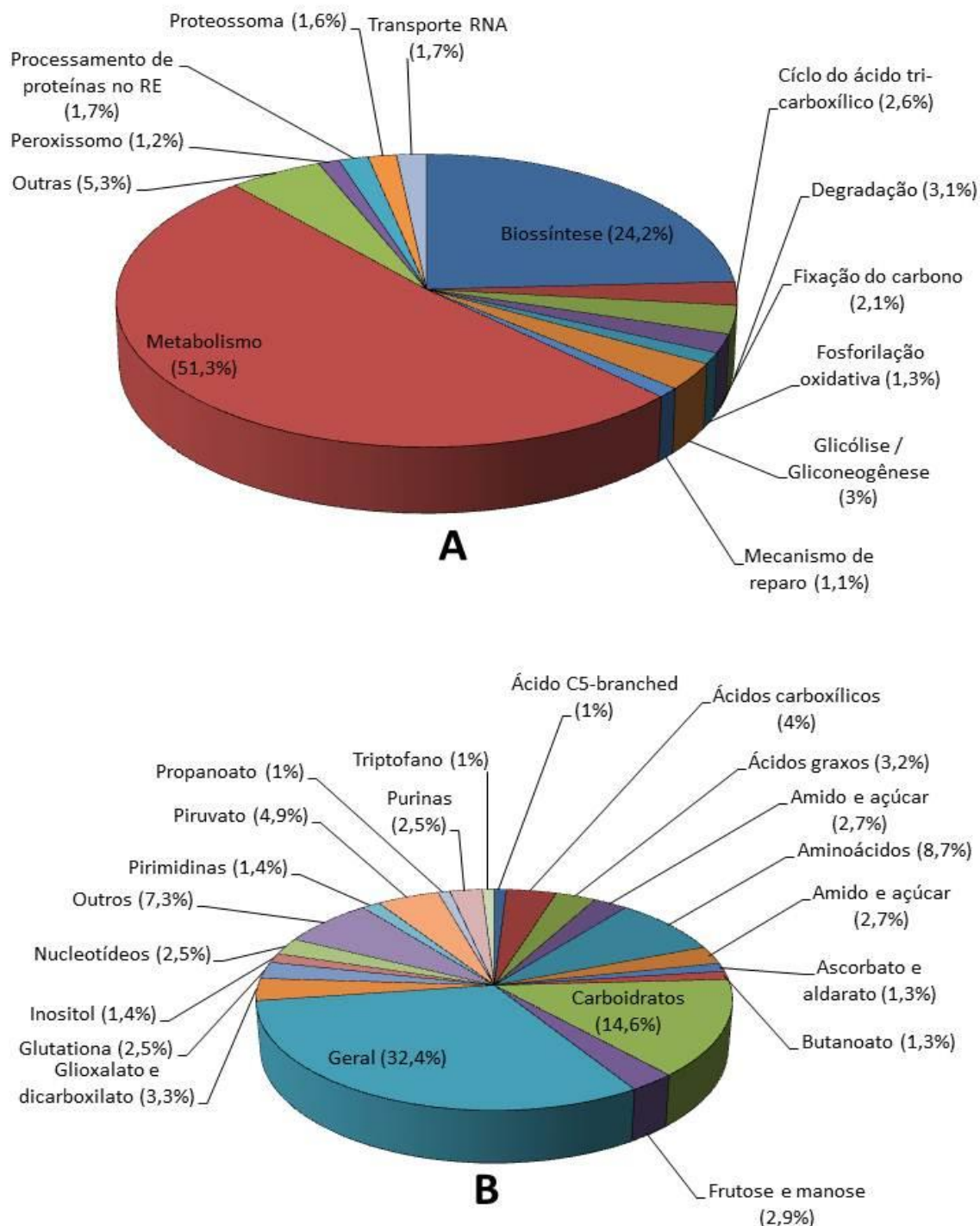


Figura 10 – Representação sumarizada da participação de 830 proteínas encontradas em embriões de milho pipoca em suas respectivas vias metabólicas (A). Sumarização das proteínas relacionadas a diferentes vias metabólicas (B).

No que se refere às proteínas relacionadas às vias metabólicas de biossíntese (Figura 11A), foram identificadas 47,4% de proteínas associadas à via de biossíntese de metabólitos secundários, 31,2% à via de biossíntese de aminoácidos, 4,5% à via metabólica de ácidos graxos e 3,8% de proteínas associadas a outras vias metabólicas de biossíntese.

Foram observadas, ainda, proteínas associadas às vias metabólicas de degradação, conforme pode ser observado na Figura 11B. Incluídas nas vias metabólicas de degradação de aminoácidos (valina, lisina, leucina e isoleucina), foram agrupadas 42,5% das proteínas, seguidas por 30,4% de proteínas das vias de degradação de RNA, 21,1% relacionadas às vias de degradação de ácidos graxos e, por fim, 3,2% relacionadas às vias de degradação de glicosaminoglicanos e outros glicanos.

Incluídas em “outras” vias metabólicas (Figura 11C), foram agrupadas 14,3% das proteínas, as quais estão associadas às vias metabólicas dos fagossomos, spliceossomo e via de *surveillance* do RNAm; 9,5% das proteínas associadas às vias metabólicas de interação planta-patógeno, vias de conversão de pentose e glucoronato e vias de replicação do DNA; 7,9% foram associadas às vias metabólicas endocíticas; 6,3% relacionadas às vias metabólicas de recombinação homóloga e vias de sinalização mediadas por fosfatidilinositol; 4,8% correlacionadas às vias de exportação de proteínas e, por fim, 1,6% de proteínas associadas às vias metabólicas de biogênese do ribossomo e vias metabólicas da RNA polimerase.

### 3.6. Marcação isobárica iTRAQ

O estudo de proteínas com expressão diferencial dentro das comparações estabelecidas foi realizado mediante uso do marcador isobárico iTRAQ, no qual diferentes intensidades dos picos para cada íon repórter foram utilizadas para comparar quantitativamente a expressão diferencial dos tratamentos, destacando-se: P11<sub>15°DAP</sub>, P11<sub>25°DAP</sub>, P16<sub>15°DAP</sub> e P16<sub>25°DAP</sub>, que corresponderam, respectivamente, às marcações 114, 115, 116 e 117.

O cromatograma apresentado na Figura 12 foi obtido pela leitura dos peptídeos da primeira replicata técnica de embrião da replicata biológica G1, no fracionamento de “100” com 100 mM de KCl.

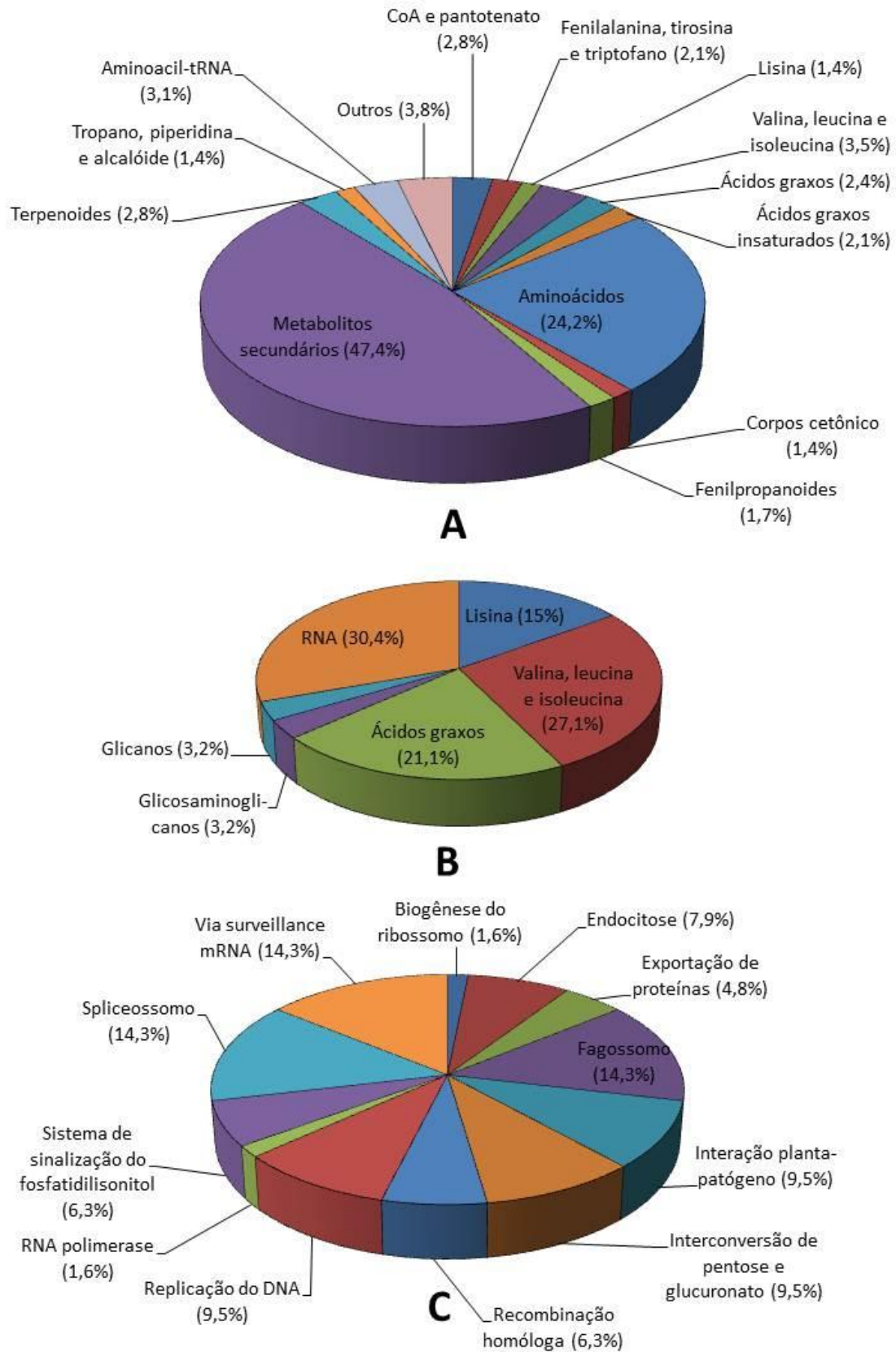


Figura 11 – Representação sumarizada da participação de 830 proteínas encontradas em embriões de milho pipoca em suas respectivas vias metabólicas. Sumarização das proteínas associadas às vias de biossíntese de diferentes componentes celulares (A), associadas às vias metabólicas de degradação (B) e associadas a “outras” vias metabólicas (C).

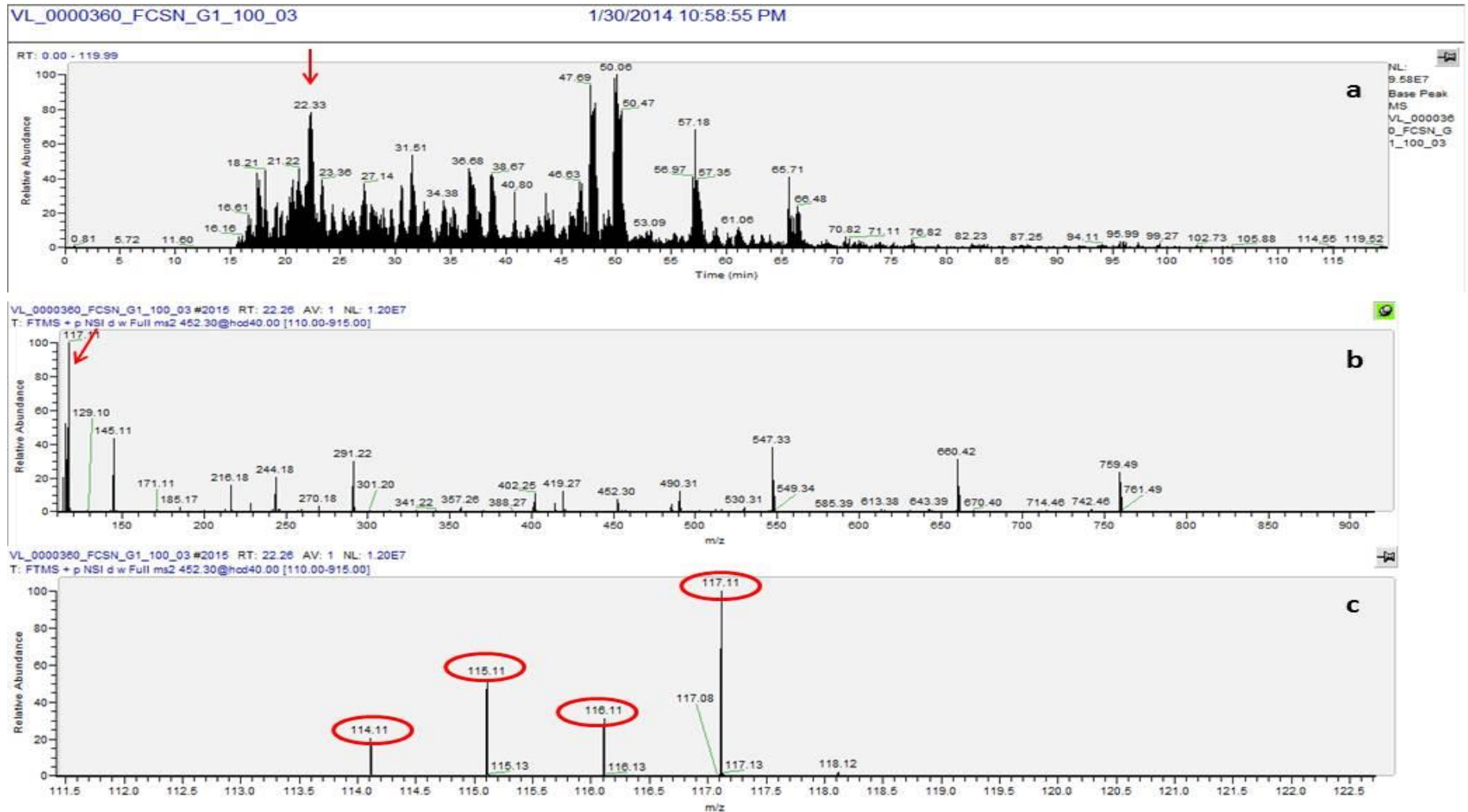


Figura 12 – Cromatogramas e espectros obtidos por meio do software Xcalibur V.2.1 a partir dos peptídeos da primeira replicata experimental (G1) no fracionamento de “100” realizado com 100 mM de KCl. (a) Cromatograma; (b) Espectro de um peptídeo retido em 22,26 minutos; (c) abundância relativa observada pelos picos entre os diferentes íons repórteres da marcação iTRAQ.

Na Figura 12A, pode-se observar o cromatograma com tempo de corrida total de 120 minutos e a seta em vermelho está indicando a escolha do peptídeo selecionado para esta análise no tempo de retenção da cromatografia líquida de fase reversa (LC-RP) de 22,26 minutos. Para este peptídeo, observou-se apenas um único espectro MS/MS (Figura 12B). A seta em vermelho nesta figura é o ponto onde foi realizada a ampliação do espectro para poder visualizar os diferentes íons repórteres gerados pela marcação isobárica de iTRAQ, compreendido entre as massas de 114,1 a 117,1  $m/z$ , conforme a Figura 12C.

Na Figura 12C, observam-se diferentes intensidades nos picos referentes à abundância relativa do peptídeo selecionado nas diferentes amostras. Assim, a maior abundância desse peptídeo é observada para o íon repórter 117,1  $m/z$ , que foi utilizado para a marcação das amostras da linhagem P16<sub>25°DAP</sub>. Se este peptídeo compuser uma proteína selecionada em embrião de milho pipoca (após utilização de filtros de qualidade), infere-se que a abundância relativa dos íons repórteres presentes para este peptídeo é visualizada conforme a abundância desta proteína no embrião para as duas linhagens nas duas épocas de coleta avaliadas.

### **3.7. Proteínas que reduziram a expressão entre as linhagens de milho pipoca P11 e P16**

Visando a avaliar as proteínas diferencialmente expressas entre as linhagens de milho pipoca P11 (alta capacidade de expansão) e a linhagem P16 (baixa capacidade de expansão), foram confeccionados Diagramas de Venn.

O critério utilizado para a escolha das proteínas foi estabelecido considerando, ao se comparar dois tratamentos quaisquer, conforme Huang et al. (2002), apenas as que apresentaram com expressão diferencial superior a 1,5x ou inferior 1,5x. Na Figura 13A, observa-se o número de proteínas que diminuíram sua expressão entre as linhagens P11<sub>25°DAP</sub>/P11<sub>15°DAP</sub>, com elevada capacidade de expansão e P16<sub>25°DAP</sub>/P16<sub>15°DAP</sub> com baixa capacidade de expansão. O diagrama evidencia que quatro proteínas diminuíram sua expressão sendo essas exclusivamente detectadas na linhagem que apresenta elevada capacidade de expansão (P11). Em contrapartida, 127 proteínas diminuíram sua expressão na linhagem com baixa capacidade de expansão (P16). Da mesma forma, observa-se um número de 30 proteínas que diminuíram sua expressão e foram comuns entre as



linhagens de milho pipoca, quando se comparou a época de coleta de 25° DAP em relação ao 15° DAP.

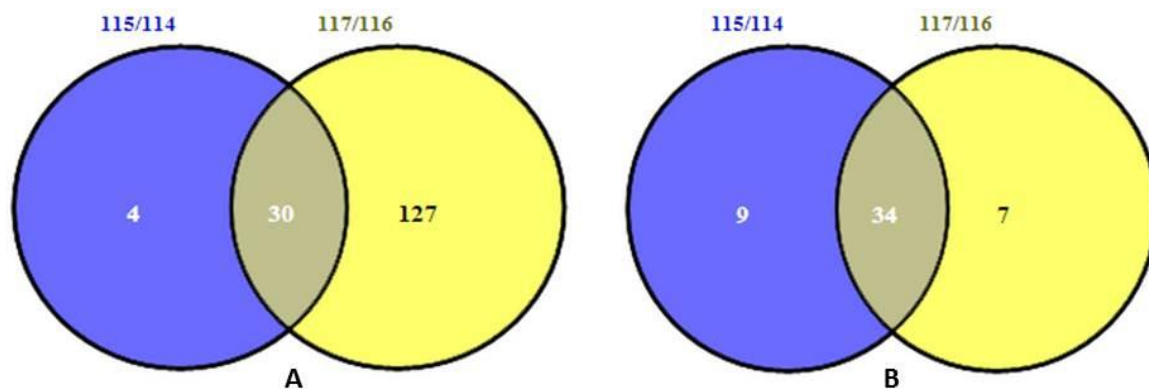


Figura 13 – Diagramas de Venn, evidenciando proteínas diferentemente expressas em embriões de linhagens com elevada (P11) e baixa (P16) capacidade de expansão. (A) Número de proteínas que tiveram diminuição de sua expressão. (B) Número de proteínas que tiveram aumento na sua expressão. 114 – P11<sub>15°DAP</sub>; 115 – P11<sub>25°DAP</sub>; 116 – P16<sub>15°DAP</sub> e 117 – P16<sub>25°DAP</sub>.

Entre as quatro proteínas que diminuíram sua expressão na linhagem P11, observam-se: a, *ribosomal 40S – S28*, duas *chaperonin* e *stress-related protein*. A análise funcional destas proteínas evidencia que três delas estão envolvidas no metabolismo de proteínas, como a *ribosomal 40S*, proteína estrutural da subunidade menor do ribossomo, sítio ativo da síntese proteica e as *chaperonin*, que estão envolvidas com o enovelamento de proteínas. Assim, infere-se que a linhagem com elevada capacidade de expansão apresentou menor expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo de proteínas.

Esta redução na expressão de proteínas relacionadas à via metabólica de proteínas na linhagem P11 pode gerar uma redução no teor de proteínas presentes nos embriões de milho pipoca de linhagens com elevada capacidade de expansão.

A existência de correlação negativa entre o teor de proteínas nas sementes com a capacidade de expansão já foi observada em alguns trabalhos, como os de Park et al. (2000) e de Sweley et al. (2012). Os resultados obtidos no presente trabalho, referentes à concentração de proteínas obtidas na extração, evidenciaram que a concentração de proteínas extraídas na linhagem P11, em ambas as épocas de coleta, foram menores quando comparadas à da linhagem P16 (Figura 3).

A redução na expressão das proteínas na linhagem com baixa capacidade de expansão (P16) foi observada em 127 proteínas. Estas proteínas estão listadas no Quadro 5 e algumas informações funcionais relevantes sobre elas podem ser observadas na Figura 14. Houve redução na expressão dessas proteínas do 15<sup>o</sup> para o 25<sup>o</sup> DAP, ou seja, conforme o embrião foi se desenvolvendo.

Quadro 5 – Proteínas que reduziram a expressão na linhagem P16 conforme o embrião foi se desenvolvendo

Acesso	Descrição	Relação média P16 <sub>25<sup>o</sup> DAP</sub> /P16 <sub>15<sup>o</sup> DAP</sub>
B6TL59	<i>3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase</i>	0,575 ± 0,014
B6T8A3	<i>3-oxoacyl-reductase</i>	0,464 ± 0,047
B6UF55	<i>5-methyltetrahydropteroyltriglutamate</i>	0,603 ± 0,009
B4FHI7	<i>60S ribosomal protein L38</i>	0,413 ± 0,081
B6SIY6	<i>60S ribosomal protein L44</i>	0,529 ± 0,078
B4F9B2	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 1</i>	0,373 ± 0,123
Q41765	<i>Acyl carrier protein</i>	0,351 ± 0,062
B4FFE7	<i>Acyl carrier protein</i>	0,312 ± 0,030
Q9XGC6	<i>Adenosine kinase (Fragment)</i>	0,572 ± 0,055
B6T440	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	0,533 ± 0,029
B4FAV4	<i>Argininosuccinate lyase</i>	0,614 ± 0,022
B6T9J4	<i>Aspartate aminotransferase</i>	0,589 ± 0,028
B6SVV9	<i>ATP synthase subunit beta</i>	0,611 ± 0,049
Q43712	<i>Calcium-binding protein</i>	0,547 ± 0,064
B4FBW7	<i>Calmodulin</i>	0,565 ± 0,041
B6TPA4	<i>Carnitine racemase/ catalytic</i>	0,633 ± 0,003
B4FN43	<i>Catalytic/ hydrolase isoform 1</i>	0,565 ± 0,022
B4FUK9	<i>COP9 signalosome complex subunit 5b</i>	0,489 ± 0,021
B4FU01	<i>Cystathionine gamma-synthase</i>	0,524 ± 0,034
B4G1C9	<i>Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex</i>	0,477 ± 0,030
B6TCA9	<i>Diphosphomevalonate decarboxylase</i>	0,578 ± 0,050
Q43704	<i>DNA replication licensing factor MCM3 homolog 1</i>	0,420 ± 0,062
P26301	<i>Enolase 1</i>	0,508 ± 0,030
C0P790	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B</i>	0,594 ± 0,027
B6SP06	<i>Glycine-rich protein 2b</i>	0,403 ± 0,033
B6SP74	<i>Glycine-rich RNA-binding protein 2</i>	0,585 ± 0,008
P10979	<i>Glycine-rich RNA-binding, abscisic acid-inducible</i>	0,437 ± 0,082



Quadro 5, cont.

Q5EBY7	<i>Heat shock protein 70 (Fragment)</i>	0,554 ± 0,050
Q9FYS5	<i>High mobility group I/Y-2</i>	0,537 ± 0,023
B4FN97	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP]</i>	0,515 ± 0,020
B4FLJ3	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP]</i>	0,545 ± 0,009
B4G249	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP]</i>	0,551 ± 0,009
Q71RX2	<i>Isopentenyl pyrophosphate isomerase</i>	0,371 ± 0,045
B4FX16	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>	0,602 ± 0,029
B4FZU8	<i>Malate dehydrogenase</i>	0,563 ± 0,011
B6SLL8	<i>Malate dehydrogenase</i>	0,396 ± 0,081
B4FVH1	<i>Malate dehydrogenase</i>	0,556 ± 0,009
B6TGF1	<i>Malate dehydrogenase</i>	0,557 ± 0,010
B4FRJ1	<i>Malate dehydrogenase</i>	0,573 ± 0,010
Q08062	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	0,407 ± 0,040
Q8L8G5	<i>Nucleosome/chromatin assembly factor group A</i>	0,577 ± 0,056
Q8L8G4	<i>Nucleosome/chromatin assembly factor group C</i>	0,614 ± 0,022
B4FT80	<i>OB-fold nucleic acid binding domain containing protein</i>	0,489 ± 0,103
B4FSC5	<i>OB-fold nucleic acid binding domain containing protein</i>	0,552 ± 0,044
B6SHT0	<i>OB-fold nucleic acid binding domain containing protein</i>	0,605 ± 0,035
B4FZZ2	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>	0,517 ± 0,009
B4G0K4	<i>Phosphoglycerate kinase</i>	0,598 ± 0,033
Q84JX6	<i>Phosphoglycerate kinase (Fragment)</i>	0,603 ± 0,030
C0P567	<i>Ppi-phosphofructokinase</i>	0,597 ± 0,028
Q43266	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	0,586 ± 0,016
B4FAR8	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	0,568 ± 0,032
B6TJB6	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	0,576 ± 0,021
B6TGF0	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	0,578 ± 0,013
B6TAJ3	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	0,615 ± 0,003
B6UFQ0	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	0,558 ± 0,032
B6T504	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	0,591 ± 0,019
B4FCX3	<i>Proteasome subunit beta type</i>	0,513 ± 0,144
K7VEK3	<i>Proteasome subunit beta type</i>	0,519 ± 0,082
B4FN21	<i>Proteasome subunit beta type</i>	0,528 ± 0,107
B4FRQ7	<i>Proteasome subunit beta type</i>	0,564 ± 0,039
B4FH61	<i>Protein transporter</i>	0,462 ± 0,100
B6SR40	<i>Putative uncharacterized protein</i>	0,477 ± 0,022
B4FQM2	<i>Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase beta subunit</i>	0,601 ± 0,026
B6T565	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta</i>	0,357 ± 0,022
B6TQ36	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta</i>	0,377 ± 0,025
B6T6H3	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta</i>	0,603 ± 0,043

Quadro 5, cont.

B4FS78	<i>Pyruvate kinase</i>	0,477 ± 0,027
B4FYH2	<i>Pyruvate kinase</i>	0,509 ± 0,030
B6T5R1	<i>Ran-binding protein 1</i>	0,475 ± 0,091
B6TQ25	<i>RNA-binding protein-like</i>	0,588 ± 0,029
B4FAD1	<i>S-adenosylmethionine synthase</i>	0,438 ± 0,064
B6UAE3	<i>Small nuclear ribonucleoprotein E</i>	0,521 ± 0,042
B4FP70	<i>Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein</i>	0,218 ± 0,068
B4FQW0	<i>Stem-specific protein TSJT1</i>	0,541 ± 0,013
B6T428	<i>Succinyl-CoA ligase alpha-chain 2</i>	0,550 ± 0,042
B4FRH5	<i>Succinyl-CoA ligase beta-chain</i>	0,561 ± 0,019
B6TS21	<i>Succinyl-CoA ligase beta-chain</i>	0,577 ± 0,024
C0P6F8	<i>Sucrose synthase</i>	0,340 ± 0,018
B6U1D7	<i>Sucrose synthase</i>	0,375 ± 0,009
Q7SIC9	<i>Transketolase, chloroplastic</i>	0,471 ± 0,016
B6T773	<i>Tryptophanyl-tRNA synthetase</i>	0,506 ± 0,027
B6TS72	<i>U2 small nuclear ribonucleoprotein A</i>	0,599 ± 0,019
B4FSN1	<i>Uncharacterized protein</i>	0,316 ± 0,036
C0HFI8	<i>Uncharacterized protein</i>	0,425 ± 0,022
B4F938	<i>Uncharacterized protein</i>	0,431 ± 0,025
B4FWQ0	<i>Uncharacterized protein</i>	0,441 ± 0,030
C0P972	<i>Uncharacterized protein</i>	0,443 ± 0,034
C0PFQ7	<i>Uncharacterized protein</i>	0,444 ± 0,065
B4FBC2	<i>Uncharacterized protein</i>	0,451 ± 0,009
C0HJ53	<i>Uncharacterized protein</i>	0,464 ± 0,014
C0P3K4	<i>Uncharacterized protein</i>	0,482 ± 0,047
C0P820	<i>Uncharacterized protein</i>	0,484 ± 0,024
B4F7Y3	<i>Uncharacterized protein</i>	0,538 ± 0,011
K7V645	<i>Uncharacterized protein</i>	0,539 ± 0,026
B4FS03	<i>Uncharacterized protein</i>	0,558 ± 0,049
C4J4W3	<i>Uncharacterized protein</i>	0,575 ± 0,020
B4FVU6	<i>Uncharacterized protein</i>	0,588 ± 0,037
C0HHC1	<i>Uncharacterized protein</i>	0,591 ± 0,022
B4FL79	<i>Uncharacterized protein</i>	0,594 ± 0,036
K7UF17	<i>Uncharacterized protein</i>	0,594 ± 0,012
C0PBL7	<i>Uncharacterized protein</i>	0,603 ± 0,018
B8A334	<i>Uncharacterized protein</i>	0,609 ± 0,009
C0P5Y3	<i>Uncharacterized protein</i>	0,613 ± 0,012
K7UDG5	<i>Uncharacterized protein</i>	0,628 ± 0,009
C4J757	<i>Uncharacterized protein</i>	0,367 ± 0,040

Quadro 5, cont.

B4F8B8	<i>Uncharacterized protein</i>	0,379 ± 0,028
B4FAA3	<i>Uncharacterized protein</i>	0,415 ± 0,066
B7ZY87	<i>Uncharacterized protein</i>	0,434 ± 0,109
B8A348	<i>Uncharacterized protein</i>	0,472 ± 0,029
K7UW74	<i>Uncharacterized protein</i>	0,481 ± 0,010
B4F8M8	<i>Uncharacterized protein</i>	0,492 ± 0,096
B4FFF1	<i>Uncharacterized protein</i>	0,496 ± 0,092
B7ZZ42	<i>Uncharacterized protein</i>	0,511 ± 0,035
B4FTD4	<i>Uncharacterized protein</i>	0,536 ± 0,094
K7VYD0	<i>Uncharacterized protein</i>	0,564 ± 0,061
C0PA91	<i>Uncharacterized protein</i>	0,574 ± 0,036
B4FQQ1	<i>Uncharacterized protein</i>	0,579 ± 0,020
C4J9Y2	<i>Uncharacterized protein</i>	0,593 ± 0,012
B4FQT3	<i>Uncharacterized protein</i>	0,594 ± 0,030
K7VW90	<i>Uncharacterized protein</i>	0,598 ± 0,021
C0PM74	<i>Uncharacterized protein</i>	0,603 ± 0,048
K7WDQ7	<i>Uncharacterized protein</i>	0,605 ± 0,022
B4FSE0	<i>Uncharacterized protein</i>	0,606 ± 0,027
C0P558	<i>Uncharacterized protein</i>	0,609 ± 0,020
C4J093	<i>Uncharacterized protein</i>	0,625 ± 0,025
C4J040	<i>Uncharacterized protein</i>	0,523 ± 0,063
B6UH55	<i>Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A</i>	0,592 ± 0,021

Acesso: Identificação Uniprot.

As 127 proteínas tiveram suas funções anotadas no GO e um resumo se encontra na Figura 14. Inicialmente, identificou-se 41 diferentes funções, as quais foram agrupadas em 24 grandes categorias funcionais.

Os percentuais mais expressivos foram encontrados para proteínas, cuja função está associada ao metabolismo geral, com 72 proteínas agrupadas nessa categoria, correspondendo a 34,62%. Vinte proteínas (9,62%) estavam associadas à função de estresse, 15 (7,21%) não tiveram função identificada, 12 (5,77%) foram associadas a processos de oxirredução e 11 proteínas (5,22%) foram associadas a respostas a estímulos.

Nas proteínas que tiveram redução na expressão e estão relacionadas ao metabolismo geral (72 proteínas), observou-se que 29 corresponderam ao metabolismo em geral, sem indicação a qual metabolismo pertenciam, 16 foram



Huang et al. (2012) identificaram a expressão diferencial para as proteínas *acetyl-CoA acetyltransferase cytosolic 1*, *glycine-rich protein*, *heat shock protein 70* e *malate dehydrogenase*, durante o processo de germinação em embriões de milho tolerantes à dessecação.

Quarenta e quatro, das 127 proteínas expressas, não foram caracterizadas. Sendo assim, a análise dessas proteínas no GO permitiu caracterizar funcionalmente 29 proteínas, permanecendo assim 15 sem anotação funcional. Contudo, após a realização de buscas individuais no Blast (Algoritmo de comparação e alinhamento de sequências biológicas primárias), para cada proteína não caracterizada, foi possível realizar o alinhamento de 32 proteínas, assim como sua caracterização, conforme apresentado no Quadro 6.

Quadro 6 – Alinhamentos realizados entre as proteínas não caracterizadas encontradas em embriões de milho pipoca com possíveis, proteínas alocadas no banco de dados do Uniprot via Blast

Proteína não caracterizada <sup>1/</sup>	Proteína de maior identidade no alinhamento <sup>1/</sup>		% de identidade
B4FSN1	B6TCA2	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 1</i>	99,75
C0HF18	Q948Y5	<i>Replication licensing factor MCM7 homologue</i>	99,58
B4F938	Q2F7H8	<i>Plastid coproporphyrinogen III oxidase</i>	95,25
B4FWQ0	--	--	--
C0P972	--	--	--
C0PFQ7	O48888	<i>ATP sulfurylase</i>	98,36
B4FBC2	B6T588	<i>GDP-mannose 3,5-epimerase 1</i>	99,73
C0HJ53	--	--	--
C0P3K4	B6U0R8	<i>Subtilisin-like protease</i>	67,84
C0P820	Q94LR9*	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal</i>	90,00
B4F7Y3	B6TZM6	<i>Oleoyl-acyl carrier protein thioesterase</i>	99,72
K7V645	B4FNC9	<i>SUMO1a protein</i>	75,78
B4FS03	B6T920	<i>Adenine phosphoribosyltransferase 1</i>	99,40
C4J4W3	B6U6S4	<i>Heat shock protein STI</i>	95,18
B4FVU6	B6TCA9	<i>Diphosphomevalonate decarboxylase</i>	98,81
C0HHC1	B4G1P4	<i>GTP-binding nuclear protein Ran-A1</i>	78,28
B4FL79	B6T903	<i>Nascent polypeptide-associated complex alpha subunit-like protein</i>	90,38
K7UF17	--	--	--
C0PBL7	--	--	--
B8A334	C4IZ94	<i>Ornithine carbamoyltransferase</i>	74,46

Quadro 6, cont.

C0P5Y3	Q8W529	<i>Methionine synthase (Fragment)</i>	99,60
K7UDG5	--	--	--
C4J757	--	--	--
B4F8B8	--	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit***</i>	--
B4FAA3	B6T7Q4	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase</i>	99,78
B7ZY87	B6TT83	<i>SRC2</i>	85,79
B8A348	--	--	--
K7UW74	C0PHH5	<i>Dihydrolipoyl dehydrogenase</i>	85,68
B4F8M8	Q9LLB8	<i>Exoglucanase</i>	99,83
B4FFF1	B6T9E7	<i>Ran-binding protein 1</i>	99,04
B7ZZ42	X4Z319**	<i>Hsp70</i>	99,23
B4FTD4	B6TL64	<i>Xaa-Pro dipeptidase</i>	96,85
K7VYD0	--	--	--
C0PA91	Q6ZI55	<i>NAD-dependent isocitrate dehydrogenase</i>	89,41
B4FQQ1	--	--	--
C4J9Y2	Q2RAK8*	<i>Os11g0147800 protein</i>	88,65
B4FQT3	B6U6S4	<i>Heat shock protein STI</i>	99,48
K7VW90	Q943K7*	<i>70 kDa heat shock</i>	96,00
C0PM74	--	--	--
K7WDQ7	Q2R2X2*	<i>ATP-binding cassette sub-family E member 1</i>	97,68
B4FSE0	--	--	--
C0P558	B6TV58	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3</i>	90,88
C4J093	Q08480*	<i>Adenylate kinase B</i>	90,00
C4J040	B6U9M4	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase</i>	95,48

<sup>1</sup>ID Uniprot; \*alinhamento com *Oryza sativa*; \*\* alinhamento com *Saccharum sp*; \*\*\* caracterização da proteína realizada pelo Search & Pathways Color do Kegg.

Vinte e seis proteínas foram alinhadas com proteínas já disponíveis em bancos de dados para *Z. mays*, com percentuais de identidade entre as sequências de aminoácidos variando de 74,46%, como pode ser visualizado entre a *uncharacterized protein* (ID: B8A334) e a *ornithine carbamoyltransferase* (ID: C4IZ94) a 99,83% entre a *uncharacterized protein* (ID: B4F8M8) e a *exoglucanase* (ID: Q9LLB8).

Cinco *uncharacterized protein* foram alinhadas com proteínas existentes no banco de dados para proteínas de *O. sativa* e uma *uncharacterized protein* (ID: B7ZZ42) foi alinhada com *heat-shock protein - Hsp70* (ID: B7ZZ42) de *Saccharum sp*, com 99,3% de identidade.

A proteína identificada *adenylate kinase*, que apresentou 90% de identidade com a sequência de uma *adenylate kinase* em *O. sativa*, foi observada por Lu et al. (2008) durante o processo de germinação em embriões de milho comum com função relacionada à duplicação do DNA.

Para treze *uncharacterized proteins*, não foi encontrada sequência idêntica no banco de dados que possibilitasse a caracterização das mesmas. Contudo, uma nova pesquisa realizada no Kegg – Search & Color Pathways revelou que a *uncharacterized protein* (ID: B4F8B8) é uma proteína participante da via metabólica da glicólise e gliconeogênese e foi caracterizada como a proteína *pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit*.

As vias metabólicas das 127 proteínas foram obtidas mediante pesquisas realizadas no Kegg – Search & Color Pathways. Desse total, 16 delas não apresentaram funções associadas às diferentes vias metabólicas em milho. Foram identificadas 15 proteínas atuantes na via do ácido cítrico (TCA): *argininosuccinate lyase*, *dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex*, *isocitrate dehydrogenase [NADP]* (três isoformas), *malate dehydrogenase* (três isoformas), *pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta* (três isoformas), *succinyl-CoA ligase beta-chain* (duas isoformas) e duas *uncharacterized proteins*.

Fato interessante a ser observado é que a maioria das 127 proteínas que diminuiu sua expressão na linhagem de baixa capacidade de expansão apresentou funções relacionadas ao metabolismo de carboidratos, proteínas e ácidos graxos. Partindo desta informação, alguns pontos devem ser observados com relação à linhagem com baixa capacidade de expansão.

A linhagem com baixa capacidade de expansão expressa em menor quantidade essas proteínas no 25<sup>o</sup> DAP, pelo fato de já tê-las expressas em quantidade maior em algum período anterior, entre o 15<sup>o</sup> e o 25<sup>o</sup> DAP, ou alguns processos metabólicos relacionados às vias de carboidratos, proteínas e ácidos graxos, durante o desenvolvimento do embrião, estejam sendo executados de maneira ineficiente, a ponto de reduzir a quantidade total dessas proteínas na linhagem na referida época de coleta ou, ainda, o processo de desenvolvimento embrionário esteja ocorrendo mais precocemente quando comparada com a linhagem de elevada capacidade de expansão (P11).

Trinta proteínas diminuíram a expressão nas duas linhagens de milho pipoca (Figura 15). Destas, três proteínas apresentaram resultados altamente significativos, a 1% de probabilidade pelo teste F, quando realizada a comparação entre P11<sub>115/114</sub> e P16<sub>117/116</sub>: *dihydrolipoyl dehydrogenase* (ID: COPHH5), *fructokinase-2* (ID: B6TB39) e uma *uncharacterized protein* (ID: COP493).

A proteína *dihydrolipoyl dehydrogenase* apresenta função molecular de oxirredutase, participando de processos de oxirredução e resposta a substâncias contendo arsênio. Constatou-se que a linhagem P16 apresentou menor expressão desta proteína quando comparada a P11. Em busca realizada no Kegg Mapper – Search & Color Pathways, foi possível observar que esta proteína participa da via metabólica da glicólise e gliconeogênese, via metabólica do piruvato, via do ciclo do ácido cítrico, via de biossíntese de metabólitos secundários e via de degradação de aminoácidos.

A *fructokinase-2*, por sua vez, participa do processo biológico de fosforilação. A linhagem P16 teve menor expressão dessa proteína no 25<sup>o</sup> DAP quando comparada à linhagem P11. Segundo Zhang et al. (2013), esta proteína desempenha papel importante na manutenção do fluxo de carbono para a formação do amido. Esses pesquisadores observaram elevada expressão do gene desta proteína no 7<sup>o</sup> DAP, com diminuição gradativa após o 15<sup>o</sup> DAP e tornando-se indetectável no 29<sup>o</sup> DAP.

Por fim, a *uncharacterized protein* (ID: COP493) apresenta função molecular de ligação com nucleotídeos. Buscas realizadas no Blast e no Kegg Mapper – Search & Color Pathways evidenciaram valores baixos de identidade com outras duas proteínas de *Z. mays* e de outras espécies.

Oito, das 30 proteínas, apresentaram resultados significativos a 5% de probabilidade pelo teste F, quando foi realizada a comparação entre as linhagens P11<sub>25<sup>o</sup>DAP</sub>/P11<sub>15<sup>o</sup>DAP</sub> e P16<sub>25<sup>o</sup>DAP</sub>/P16<sub>15<sup>o</sup>DAP</sub>, quais sejam: *APx1-cytosolic ascorbate peroxidase* (ID: B6U9S8), *APx1-cytosolic ascorbate peroxidaseII* (ID: B6TM55), *Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]* (ID: B6TYG2), *enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase isoform1* (ID: B4FFA7), *inositol-3-phosphate synthase* (ID: B6T9P4), *peptidyl-prolylisomerase* (ID: B6T1T8), duas *uncharacterized protein* (ID: B4GO31 e B4G101).



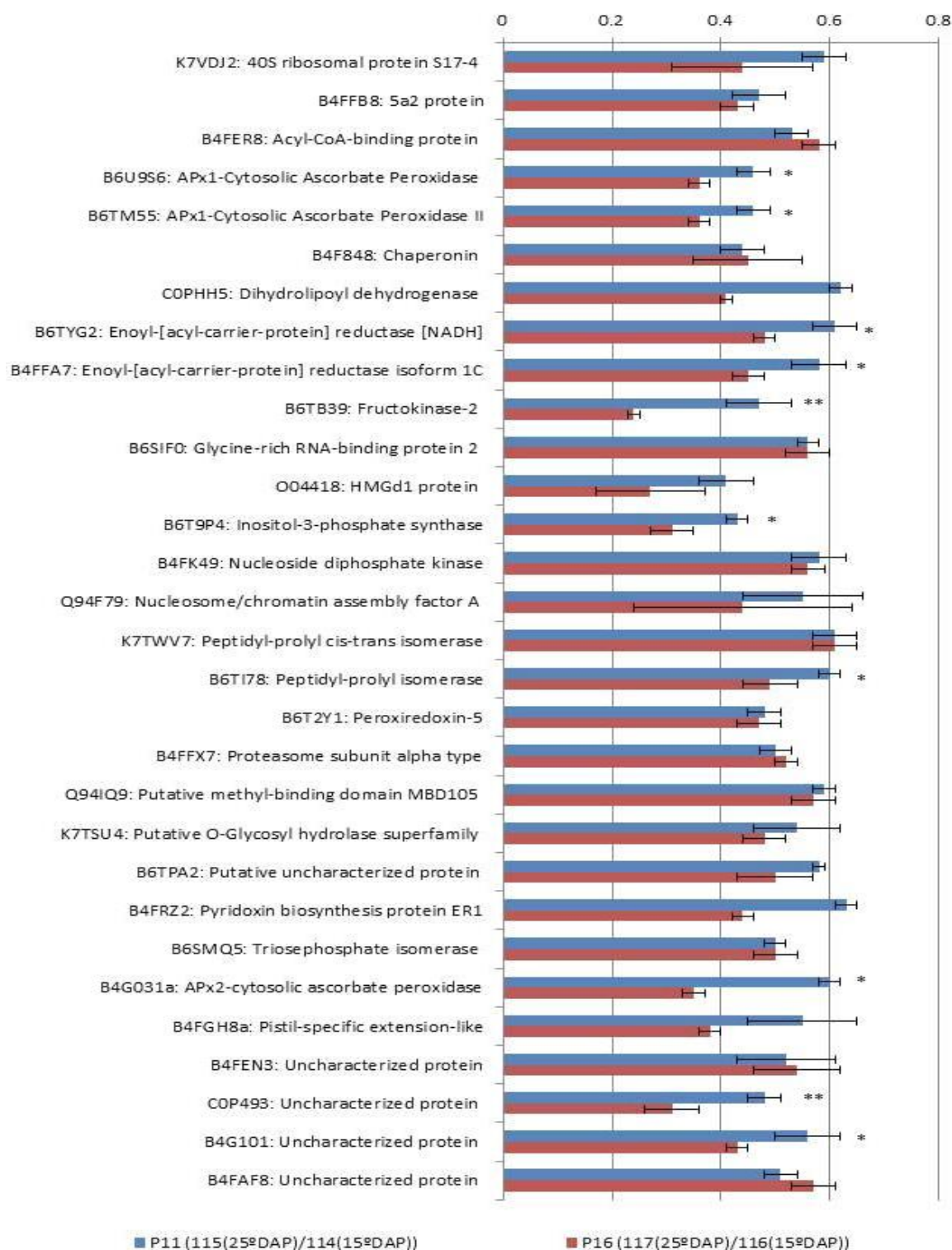


Figura 15 – Proteínas que tiveram redução na sua expressão em embriões de milho pipoca de linhagens com diferentes capacidades de expansão. P11(linhagem com elevada capacidade de expansão), P16 (linhagem com baixa capacidade de expansão, \* Significativo pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), \*\* Significativo pelo teste F ( $p \leq 0,01$ ), barras que não apresentam estes símbolos, não apresentam diferenças estatísticas significativas pelo teste F.

As proteínas *APx1-cytosolic ascorbate peroxidase* apresentam a função molecular de atividade de peroxidase, participação nos processos biológicos de respostas ao estresse oxidativo e associada aos processos de oxirredução. A linhagem de baixa capacidade de expansão apresentou maior redução na expressão dessas proteínas, podendo, desta forma, inferir que a função peroxidase desta enzima está sendo menor nesta linhagem.

A proteína *enoyl-[acyl-carrier] reductase*, assim como a *enoyl-[acyl-carrier] reductase isoform1 [NADH]*, não apresentaram notação funcional identificada, mas existe entre elas identidade de 96,46% (Figura 16B). Contudo, em uma busca realizada no Blast, foi possível observar que ambas apresentaram elevada identidade com a proteína *enoyl-[acyl-carrier] reductase [NADH]* (ID: Q6Z014) de *Oryza sativa* subsp. japônica, cuja função anotada está relacionada à biossíntese de ácidos graxos e, conseqüentemente, de lipídios.

O percentual de identidade entre as proteínas *enoyl-[acyl-carrier] reductase [NADH]* de *Zea mays* L. com a *enoyl-[acyl-carrier] reductase [NADH]* de *Oryza sativa* foi de 88%, enquanto a proteína *enoyl-[acyl-carrier] reductase isoform1 [NADH]*, após alinhamento com *enoyl-[acyl-carrier] reductase [NADH]* de *Oryza sativa*, apresentou identidade de 88,6%.

Um alinhamento conjunto das três proteínas *enoyl-[acyl-carrier] reductase [NADH]* acima citadas evidenciou uma identidade de 88,26% (Figura 16A). Assim, assim foi atribuída a função de biossíntese de ácidos graxos para as proteínas *enoyl-[acyl-carrier] reductase [NADH]* de *Z. mays*. Uma árvore filogenética (Figura 16B), baseada na sequência de aminoácidos das três *enoyl-[acyl-carrier] reductase [NADH]*, foi criada para validação dos dados, sendo observada uma alta identidade entre as sequências de aminoácidos das proteínas *enoyl-[acyl-carrier] reductase [NADH]* de *Z. mays*.

A *enoyl-[acyl-carrier] reductase [NADH]* é uma enzima chave no metabolismo de ácidos graxos porque é responsável pela redução de uma ligação dupla (trans-2) para formar um ácido graxo saturado (Liu et al., 2009b). A diminuição na expressão destas duas isoformas de *enoyl reductase* no 25º DAP foi mais evidente na linhagem P16 e, desta forma, a diminuição na expressão desta proteína nesta linhagem poderá ocasionar diminuição no teor de ácidos graxos saturados nos embriões.

1	MTASARAAGVQMVAARPCISASPGILTARVAVSRIDCMLSTTATF---FKISCSWELR-FK	56	B6TFF6	B6TFF6_MAIZE
1	MTASARAAGVQMVAARPCISASPGILTARV--SRIDCMLSTTATF---FKISCSWELR-FK	54	B4FFA7	B4FFA7_MAIZE
1	MGASAATGMQMVAAARPCISASQGLTSSRAAVSRIGRALSTTTGATCPRIICYSSPLGSSK	60	Q6Z0I4	FAB11_ORYSJ
57	RNDVVVRAISEECQFPQGLPIDLRGKRAFIAGVADDNGYCHAIKALAAAGAEILVGTWVP	116	B6TFF6	B6TFF6_MAIZE
55	RNDVVVRAISEECQFPQGLPIDLRGKRAFIAGVADDNGYCHAIKALAAAGAEILVGTWVP	114	B4FFA7	B4FFA7_MAIZE
61	RSGVAIPAMSSSESPQGLPIDLRGKRAFIAGVADDNGYCHAIKALAAAGAEILVGTWVP	120	Q6Z0I4	FAB11_ORYSJ
117	ALNIFETSLRRGKFDESRLPDGSLMDIVKVYPLDAVYDSDVDVFNKRYAGASNM	176	B6TFF6	B6TFF6_MAIZE
115	ALNIFETSLRRGKFDESRLPDGSLMDIVKVYPLDAVYDSDVDVFNKRYAGASNM	174	B4FFA7	B4FFA7_MAIZE
121	ALNIFETSLRRGKFDESRLPDGSLMEIVKVYPLDAVYDSDVDVFNKRYAGSSNM	180	Q6Z0I4	FAB11_ORYSJ
177	TVKEVVESVRNDFGSDILVHSLANGPEVTKPLETSRRGYLAASASSYSYVSLQHFLL	236	B6TFF6	B6TFF6_MAIZE
175	TVKEVVESVRNDFGSDILVHSLANGPEVTKPLETSRRGYLAASASSYSYVSLQHFLL	234	B4FFA7	B4FFA7_MAIZE
181	TVKEVAESVRNDFGSDILVHSLANGPEVTKPLETSRRGYLAALSASSYSFVSLQHFLL	240	Q6Z0I4	FAB11_ORYSJ
237	PIMNPGGASISLTYIASERAIPGYGGGMSAKAALES DTRVLAFAEGRGKIRVNTISAG	296	B6TFF6	B6TFF6_MAIZE
235	PIMNPGGASISLTYIASERAIPGYGGGMSAKAALES DTRVLAFAEGRGKIRVNTISAG	294	B4FFA7	B4FFA7_MAIZE
241	PIMNPGGASISLTYIASERAIPGYGGGMSAKAALES DTRVLAFAEGRGKIRVNTISAG	300	Q6Z0I4	FAB11_ORYSJ
297	PLGSRAAKAIGFIEKMIIEYSYVNAFLQKELLADEVGNTAAFLVSSLASAITGSTVYVDNG	356	B6TFF6	B6TFF6_MAIZE
295	PLGSRAAKAIGFIEKMIIEYSYVNAFLQKELLADEVGNTAAFLVSSLASAITGSTVYVDNG	354	B4FFA7	B4FFA7_MAIZE
301	PLGSRAAKAIGFIEKMIIEYSYVNAFLQKELLADEVGNTAAFLVSPLASAITGSTVYVDNG	360	Q6Z0I4	FAB11_ORYSJ
357	LNTMGLAIDSPIITS	371	B6TFF6	B6TFF6_MAIZE
355	LNTMGLAIDSPIITS	369	B4FFA7	B4FFA7_MAIZE
361	LNTMGLAIDSPIISS	375	Q6Z0I4	FAB11_ORYSJ

A



B

Figura 16 – (A) Alinhamento entre as proteínas *enoyl-[acyl-carrier] reductase [NADH]* (ID: B6TYG2 e B4FFA7) e a proteína *enoyl-[acyl-carrier] reductase [NADH]* (ID: Q6Z0I4) de *O. sativa*. (B) Árvore filogenética obtida pelo alinhamento de aminoácidos das proteínas acima citadas.

Liu et al. (2009b) observaram o aumento na expressão da *enoyl-[acyl-carrier] reductase [NADH]* em embriões da linhagem By804, que tem elevado teor de óleo, no 15<sup>o</sup> DAP apresenta aumento na expressão quando comparada a linhagem B73, com teor normal de óleo. Lee et al. (2002) observaram elevados níveis de expressão desta proteína entre o 15<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> DAP durante o desenvolvimento do embrião de milho. Os autores atribuíram o aumento no teor de óleo nas sementes de milho ao aumento da expressão desta proteína, uma vez que ela está envolvida na síntese de ácidos graxos. Esses dados também foram confirmados pela análise de transcriptoma em embriões de milho realizado por Liu et al. (2008), que observaram um incremento na expressão deste gene a partir do 10<sup>o</sup> DAP.

A *inositol-3-phosphate synthase* é atuante na biossíntese do inositol e presente no desenvolvimento pós embriogênico e desenvolvimento final de sementes dormentes. Esta proteína também foi identificada em sementes de milho com expressão elevada entre o 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> DAP por Méchin et al. (2007). Quanto às duas linhagens analisadas, esta proteína se expressou menos na P16.

A proteína *peptidyl-prolyl isomerase* tem função associada ao enovelamento de proteínas, ou seja, apresenta atividade molecular de isomerase e participativa do processo biológico de enovelamento de proteínas. Essa proteína se expressou menos na linhagem P16. Campo et al. (2004) observaram a presença dessa proteína durante a germinação de embriões de milho infectados por *Fusarium verticillioides*.

A *uncharacterized protein* (ID: B4G031) apresentou notação funcional relacionada aos processos de oxirredução e resposta ao estresse oxidativo, devido à sua atividade de peroxidase, e ligação ao grupo heme. Esta proteína apresentou identidade de 99,6% com a proteína também de *Z. mays APx2-cytosolic ascorbate peroxidase* (ID: B6TVL8) (Figura 17). Assim, é possível inferir que essa proteína, até o momento não caracterizada, é uma isoforma da *APx2-cytosolic ascorbate peroxidase*.

1	MVKAYPTVNEDYLKAVDKAKRRLRGLIAEKNCAPLMRLRLAWHSAGTFDVAITKTGGPFGTM	60	B4G031	B4G031_MAIZE
1	MVKAYPTVNEDYLKAVDKAKRRLRGLIAEKNCAPLMRLRLAWHSAGTFDVAITKTGGPFGTM	60	B6TVL8	B6TVL8_MAIZE
61	KNPAEQAHGANAGLEIAIRLLEPIKEQFPILSYADFYQLAGVVAVEVTGGPDVVPFHGGRQ	120	B4G031	B4G031_MAIZE
61	KNPAEQAHGANAGLEIAIRLLEPIKEQFPILSYADFYQLAGVVAVEVTGGPDVVPFHGGRQ	120	B6TVL8	B6TVL8_MAIZE
121	DKPEPPPEGRLPDATQGSDDLRLQVFSTQMGLSDQDIVALSGGHTLGRCHKDRSGFEGAWT	180	B4G031	B4G031_MAIZE
121	DKPEAPPEGRLPDATQGSDDLRLQVFSTQMGLSDQDIVALSGGHTLGRCHKDRSGFEGAWT	180	B6TVL8	B6TVL8_MAIZE
181	SNPLIFDNSYFKELLSGEKEGLLQLPSDKALLSDPSFRPLVDKYAEDDAFFADYAE AHL	240	B4G031	B4G031_MAIZE
181	SNPLIFDNSYFKELLSGEKEGLLQLPSDKALLSDPSFRPLVDKYAEDDAFFADYAE AHL	240	B6TVL8	B6TVL8_MAIZE
241	KLSELGFAEA 250	B4G031	B4G031_MAIZE	
241	KLSELGFAEA 250	B6TVL8	B6TVL8_MAIZE	

Figura 17 - Alinhamento entre a *uncharacterized protein* (ID: B4G031) e *APx2-cytosolic ascorbate peroxidase* (ID: B6TVL8) de *Z. mays*.

A *APx2-cytosolic ascorbate peroxidase* é uma proteína atuante na detoxicação celular. Conforme Méchin et al. (2007), no início do desenvolvimento da semente de milho, o pericarpo é permeável ao oxigênio, da mesma forma que o processo de respiração celular é elevado. Assim, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o controle destas espécies deve ser realizada por uma gama de proteínas, entre as quais se inclui a *APx2-cytosolic ascorbate peroxidase*.

Para a linhagem P16, foi evidenciada uma maior redução na expressão da *APx2-cytosolic ascorbate peroxidase* quando comparada à P11 (significativo a 5% de probabilidade). Considerando a análise funcional, pode-se inferir que a linhagem

P16 estaria sofrendo menos influência de espécies reativas de oxigênio e, portanto, menor estresse oxidativo, ou que o desenvolvimento dos embriões e consequentemente das sementes para esta linhagem estivesse mais adiantado e a impermeabilização do pericarpo reduz a quantidade de oxigênio e, consequentemente, diminui a quantidade de espécies reativas e a necessidade desta proteína.

Méchin et al. (2007), avaliando o perfil proteico em diferentes fases de desenvolvimento do endosperma de milho, evidenciaram a presença da proteína *ascorbate peroxidase* no período do 4º ao 14º DAP, ocorrendo posteriormente a diminuição de sua expressão.

Duas *uncharacterized protein* (ID: B4FGH8 e B4G101) não apresentaram notação funcional definida. Desta forma, buscas foram realizadas no Blast e evidenciaram alinhamentos com outras sequências de elevados percentuais de identidade. A *uncharacterized protein* (ID: B4FGH8) apresentou identidade de 99,5% com a proteína *pistil-specific extensin-like* (ID: K7V6L8) de *Z. mays*, contudo, esta proteína não apresenta notação funcional estabelecida (Figura 18).

1	MASLKDHCAVVAVVVAICFVVLAALPSHASTAVDEPAKYKPSRAPAPSPASASSYVPPP	60	B4FGH8	B4FGH8_MAIZE
1	MASLKDHCAVVAVVVAICFVVLAALPSHASTAVDEPAKYKPSRAPAPSPASASSYVPPP	60	K7V6L8	K7V6L8_MAIZE
61	VQPVIVVQGVVIYCKSCKLRGYNMGDASPLPNATASLVCYGDASKEYRVLNQTSTATDTN	120	B4FGH8	B4FGH8_MAIZE
61	VQPVIVVQGVVIYCKSCKLRGYNMGDASPLPNATASLVCYGDASKEYRVLNQTSTATDTN	120	K7V6L8	K7V6L8_MAIZE
121	GYFIVMVYDVGMFDRSCLYLRSSPTALCAAPFIPSNPKLGLTLVRDRAATAPRGARGI	180	B4FGH8	B4FGH8_MAIZE
121	GYFIVMVYDVGMFDRSCLYLRSSPTALCAAPFIPSNPKLGLTLVRDRAATAPRGARGI	180	K7V6L8	K7V6L8_MAIZE
181	FHPKTALMYAPGTGGKCPPY	200	B4FGH8	B4FGH8_MAIZE
181	FHPKTALMYAPGTGGKCPPY	200	K7V6L8	K7V6L8_MAIZE

Figura 18 – Alinhamento entre a *uncharacterized protein* (B4FGH8) e a proteína *pistil-specific extensin-like* (K7V6L8) de *Z. mays*.

Da mesma forma, a *uncharacterized protein* (ID: B4G101) apresentou identidade de 85,66% com a proteína *indole-3-acetic acid-amido synthetase* (ID: B6U4E2), porém com notação funcional ainda não estabelecida (Figura 19).

As 19 proteínas restantes não apresentaram resultados estatísticos significativos a 5% de probabilidade, pelo teste F, quando as linhagens P11 e P16 foram comparadas. Entretanto, reduziram a expressão do 15º para o 25º DAP dentro das linhagens.



As proteínas *5a2 protein* (ID: B4FFB8), *putative uncharacterized protein* (ID: B6TPA2) e a *HMGd1 protein* (ID: O04418) não apresentaram resultados satisfatórios nas buscas realizadas no Blast.

Proteínas com notação funcional de ligação com o DNA foram observadas. A *uncharacterized protein* (ID: B4FAF8) e a *putative methyl-binding domain MBD105 DNA binding* (ID: Q94IQ9) apresentam função molecular de ligação com nucleotídeos. Buscas realizadas no Blast evidenciaram valores baixos de identidade com outras proteínas de outras espécies ou de *Z. mays* propriamente dita, impedindo, assim, uma caracterização consistente destas proteínas. Da mesma forma, as buscas realizadas no Kegg Mapper – Search & Color Pathway não apresentaram resultados satisfatórios.

B4G101	B4G101_MAIZE	1	-----	0
B6U4E2	B6U4E2_MAIZE	1	MAVMAEVVSTTGAALRSPASQPLPAAVKNADAEXLQFIEEMTSNVDAVQERVLGEILARN	60
B4G101	B4G101_MAIZE	1	-----MATYEDLQPYIRRIADGDRSPILSGHPVSEFLT	34
B6U4E2	B6U4E2_MAIZE	61	AGTEYLAKYGLAAATDRATFRAKVPMATYEDLQPYIRRIADGDRSPILSGHPVSEFLT	120
B4G101	B4G101_MAIZE	35	SGTSAGERKLMPTIEDELNRRQLLYSLQMPVMNLYVPGMDKGGKALHFLFKVSETKTPGGL	94
B6U4E2	B6U4E2_MAIZE	121	SGTSAGERKLMPTIEDELNRRQLLYSLQMPVMNLYVPGMDKGGKALHFLFKVSETKTPGGL	180
B4G101	B4G101_MAIZE	95	AARPVLTSYYKSNHFKNRPFDAYNNYTSPTAAILCADAQSMYAQMLCGLCQRQDVLRVG	154
B6U4E2	B6U4E2_MAIZE	181	AARPVLTSYYKSNHFKNRPFDAYNNYTSPTAAILCADAQSMYAQMLCGLCQRQDVLRVG	240
B4G101	B4G101_MAIZE	155	AVFASGLLRAIRFLQLNWEQLAEDIEAGSLTPRVTDPSVREAVAGILRADPELAALVRSE	214
B6U4E2	B6U4E2_MAIZE	241	AVFASGLLRAIRFLQLNWEQLAEDIEAGSLTPRVTDPSVREAVAGILRADPELAALVRSE	300
B4G101	B4G101_MAIZE	215	CSKGDWAGIITRIWPSTKYLDVIVTGAMAQYIPTLKYYSGGLPMACTMYASSECYFGLNL	274
B6U4E2	B6U4E2_MAIZE	301	CSKGDWAGIITRIWPSTKYLDVIVTGAMAQYIPTLKYYSGGLPMACTMYASSECYFGLNL	360
B4G101	B4G101_MAIZE	275	RPMCDPSEVSYTLMPNMCFEFLPMDSAAAASGGDASQLVDLARVEVGREYELVITTYAGL	334
B6U4E2	B6U4E2_MAIZE	361	RPMCDPSEVSYTLMPNMCFEFLPMDSAAAASGGDASKLVDLARVEVGREYELVITTYAGL	420
B4G101	B4G101_MAIZE	335	NRYRVGDVLTQVTFGHNSAPQFRFVRRKNVLLSIESDKTDEAELQRAVERASALLRPHGAA	394
B6U4E2	B6U4E2_MAIZE	421	NRYRVGDVLTQVTFGHNSAPQFRFVRRKNVLLSIESDKTDEAELQRAVERASALLRPHGAA	480
B4G101	B4G101_MAIZE	395	VWEYTSQAYTKSIPGHYVIYWELLAKGPAGGAAVGEGTLERCCLMEEEALNTVYRQSRVA	454
B6U4E2	B6U4E2_MAIZE	481	VWEYTSQAYTKSIPGHYVIYWELLAKGPAGGAAVGEGTLERCCLMEEEALNTVYRQSRVA	540
B4G101	B4G101_MAIZE	455	DGSIIGPLEIRVVRPGTFEELMDYAIISRGASINQYKVPKRCVTFPPPIEELLSRWSSHFSP	514
B6U4E2	B6U4E2_MAIZE	541	DGSIIGPLEIRVVRPGTFEELMDYAIISRGASINQYKVPKRCVTFPPPIEELLSRWSSHFSP	600
B4G101	B4G101_MAIZE	515	ALPHWTPGQRS	528
B6U4E2	B6U4E2_MAIZE	601	ALPHWTPGQRS	614

Figura 19 – Alinhamento entre a *uncharacterized protein* (B4G101) e a proteína *indole-3-acetic acid-amido synthetase* (B6U4E2) de *Z. mays*.

A *nucleoside diphosphate kinase* (ID: B4FK49), com atividade molecular de ligação ao ATP e nucleotídeo, apresenta a função biológica de biossíntese de GTP, CTP e UTP. Lu et al. (2008) identificaram esta proteína durante o processo de germinação de embriões de milho comum. Pan et al. (2000) citaram que esta enzima

é requerida durante a germinação no processo de alongação do coleóptilo em sementes de arroz e catalisa a transferência do gama-fosfato do ATP para NDP por meio de autofosforilação. Portanto, é uma enzima importante para a manutenção nos níveis de GTP para as diferentes vias metabólicas.

A *nucleosome/chromatin assembly fator A* (ID: Q94F79) apresenta a função molecular de ligação à cromatina e às histonas, participando dos processos biológicos de proliferação celular e montagem dos nucleossomos. A *glycine-rich RNA-binding protein 2* (ID: B6SIF0) tem atividade molecular de ligação a ácidos nucléicos e apresenta inúmeras funções relacionadas a respostas ao estresse osmótico, frio, estresse salino e hídrico.

A proteína *chaperonin* (ID: B4F848) participa do processo de enovelamento de proteínas e tem função molecular de ligação ao ATP. Méchin et al. (2007) observaram 27 *chaperonin* durante o desenvolvimento do endosperma em sementes de milho e estas apresentaram baixos níveis antes do 14<sup>o</sup> DAP, atingindo níveis elevados do 14<sup>o</sup> ao 21<sup>o</sup> DAP e uma leve redução na sua expressão até o 40<sup>o</sup> DAP, de acordo com a dinâmica de deposição de proteínas. Esta proteína também foi identificada em embrião de milho no 15<sup>o</sup> DAP com expressão aumentada em uma linhagem com elevado teor de óleo (Liu et al., 2009a).

A proteína *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase* (ID: K7TWV7) tem funções associadas ao enovelamento de proteínas e atividade molecular de cis-trans isomerase.

A proteína *putative O-glycosyl hydrolase superfamily* (ID: K7TSU4) detectada entre as 30 proteínas que diminuíram a atividade nos embriões entre o 15<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> DAP, participa do metabolismo de carboidratos, mas especificamente no catabolismo de xilanas.

Três proteínas apresentaram funções relacionadas ao metabolismo de proteínas. Inicialmente, observa-se a *proteasome subunit alpha type* (ID: B4FFX7), que apresenta atividade de endopeptidase do tipo treonina e é atuante em processos biológicos de proteólise, processos catabólicos dependentes de ubiquitina, em resposta ao íon zinco e em defesa bacteriana. Esta proteína também foi identificada em embrião de milho no 15<sup>o</sup> DAP com expressão aumentada em uma linhagem com elevado teor de óleo (Liu et al., 2009b).

A *pyridoxin biosynthesis ER1* (ID: B4FRZ2) tem função molecular de heterodimerização de proteínas e participa de processos biológicos de resposta ao

estresse oxidativo, salino e ao excesso de UV-B. A *uncharacterized protein* (ID: B4FEN3) apresenta função molecular ligada ao enovelamento de proteínas.

A *acyl-CoA-binding protein* (ID: B4FER8) é uma proteína que apresenta a função molecular de ligação entre *fatty-acyl-CoA*. A *40S ribosomal S17-4* (ID: K7VDJ2) tem papel importante como proteína estrutural da subunidade menor do ribossomo e sua função está associada à síntese proteica.

Na Figura 20, está disponibilizado um resumo das funções das 30 proteínas, obtidas pelas análises no GO (Gene Ontology). O maior percentual dessas proteínas (22,7%) evidenciou ausência de anotação funcional e este valor foi seguido por 20,5% de proteínas relacionadas a processos metabólicos, 13,6% associadas a funções de respostas a estresse, 9,1% correlatas com funções nos processos de oxirredução e 6,8% de proteínas associadas à função de enovelamento de proteínas.

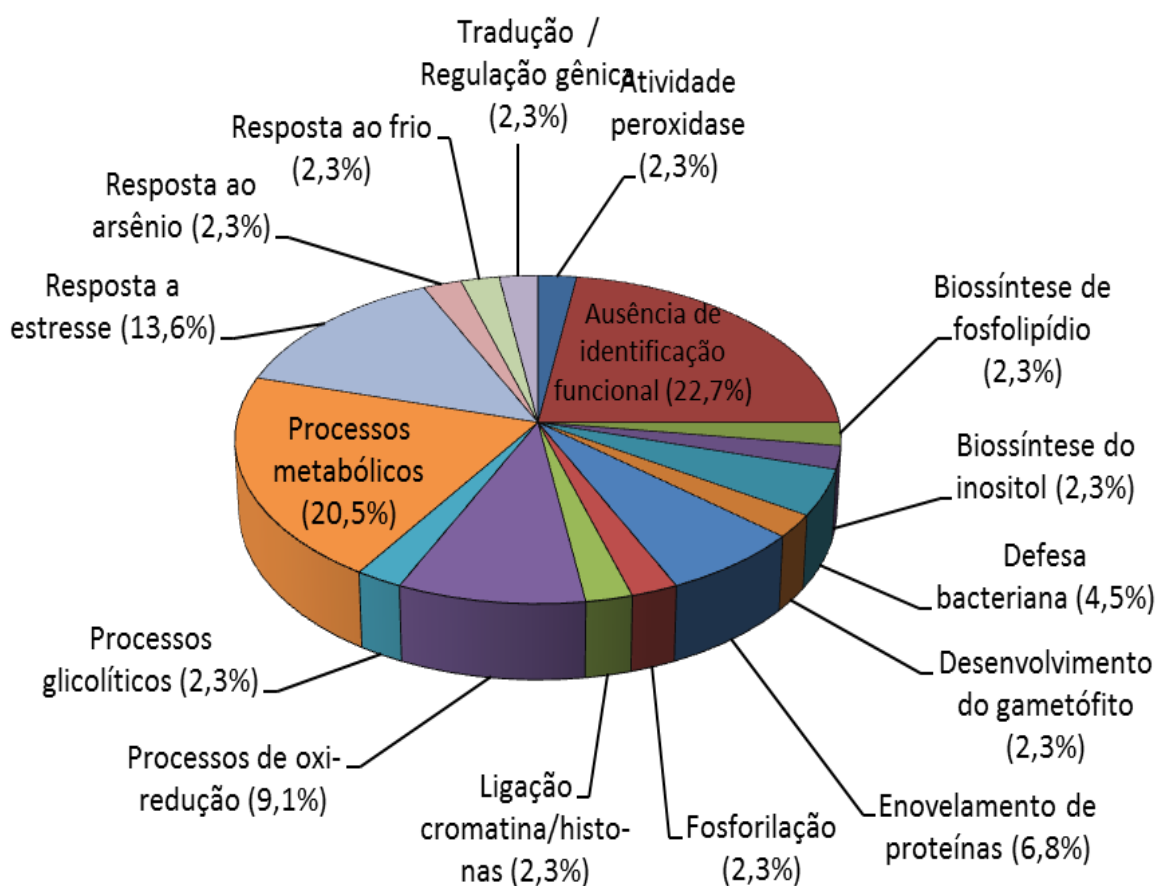


Figura 20 – Função das 30 proteínas expressas nos embriões de sementes de milho pipoca que apresentaram redução da expressão nas linhagens de milho pipoca P11 e P16 no 25º DAP quando comparadas ao 15º DAP.



Apresentando atividade molecular de oxirredutase, foi encontrada a proteína *peroxiredoxin-5* (ID: B6T2Y1), que participa dos processos biológicos de oxirredução e resposta de defesa bacteriana. Gong et al. (2013) observaram um aumento de três vezes na expressão da proteína *peroxiredoxin-5* em embriões submetidos à germinação sem a realização de pré-tratamento “hydropriming”.

Os menores percentuais foram obtidos para proteínas associadas às funções de: atividade peroxidase, biossíntese de fosfolípidios e inositol, defesa bacteriana, desenvolvimento do gametófito, fosforilação, ligação cromatina/histona, processos glicolíticos, resposta ao arsênio e ao frio e, por fim, tradução gênica.

### 3.8. Proteínas que aumentaram sua expressão entre as linhagens de milho pipoca P11 e P16

Na análise das proteínas que aumentaram a expressão entre as linhagens P11<sub>25°DAP</sub>/P11<sub>15°DAP</sub> e P16<sub>25°DAP</sub>/P16<sub>15°DAP</sub> (Figura 13B) foi possível verificar que 43 proteínas tiveram aumento de sua expressão na linhagem com elevada capacidade de expansão (P11). Nove proteínas foram exclusivas para esta linhagem e 34 foram comuns entre as duas linhagens. Na linhagem P16, além dessas 34 proteínas, observou-se a presença de sete proteínas exclusivas.

Com relação às proteínas exclusivas para as duas linhagens, constatou-se que as nove proteínas da linhagem P11, descritas no Quadro 7, são: *3-N-debenzoyl-2-deoxytaxol N-benzoyltransferase*, *jasmonate-induced protein*, *putative aminotransferase class III superfamily protein* (duas isoformas) e *ZCN9* com anotação funcional ainda não definida.

Quadro 7 – Proteínas que aumentaram a expressão no 25° DAP na linhagem P11 de milho pipoca quando comparada aos 15° DAP

Acesso	Descrição	Relação P11 <sub>25°DAP</sub> /P11 <sub>15°DAP</sub>
B6TJ78	<i>3-N-debenzoyl-2-deoxytaxol N-benzoyltransferase</i>	1,87 ± 0,35
B4FUH2	<i>Aspartate aminotransferase</i>	1,76 ± 0,23
B6TD54	<i>ATP-citrate synthase</i>	1,84 ± 0,31
B6TG62	<i>Caffeic acid 3-O-methyltransferase</i>	2,26 ± 0,49
B4F7S2	<i>Jasmonate-induced protein</i>	2,39 ± 0,39
B4G0T5	<i>Putative aminotransferase class III superfamily protein</i>	1,62 ± 0,12
K7TSU8	<i>Putative aminotransferase class III superfamily protein</i>	1,82 ± 0,05
K7W482	<i>Putative serine peptidase S28 family protein</i>	1,80 ± 0,04
A8WES1	<i>ZCN9</i>	1,68 ± 0,12

Acesso: Identificação Uniprot; 114 – P11<sub>15°DAP</sub>; 115 – P11<sub>25°DAP</sub>.

A *Putative serine peptidase S28 family protein* e a *caffeic acid 3-O-methyltransferase*, a *ATP-citrate synthase*, participam da via metabólica do ciclo do ácido cítrico e biossíntese de metabólitos secundários e a *aspartate aminotransferase* está relacionada à via metabólica de aminoácidos.

As proteínas *jasmonate-induced protein* (ID: B4F7S2) e *ZCN9* (ID: A8WES1) não apresentam notação funcional estabelecida. Em uma busca realizada no Blast, seguida pelo alinhamento das sequências, também não foi possível obter informações que permitissem inferir sobre suas funções.

A proteína *3-N-debenzoyl-2-deoxytaxol N-benzoyltransferase* (ID: B6TJ78) possui atividade de transferase, participando de processos metabólicos gerais, assim como as duas proteínas *putative aminotransferase class III superfamily* (ID: B4G0T5 e K7TSU8). Esta última também possuindo atividade de transaminase.

A *putative serine peptidase S28 family protein* (ID: K7W482) apresenta atividade de peptidase a um tipo de serina e a proteína *caffeic acid 3-O-methyltransferase* (ID: B6TG62) tem atividade de metiltransferase, além de participar de processos biológicos de metilação.

Por fim, duas importantes proteínas atuantes em diferentes vias metabólicas foram encontradas. A *aspartate aminotransferase* (ID: B4FUH2), que participa das vias metabólicas de aminoácidos, biossíntese de metabólitos secundários (isoquilonila e tropanos) e fixação de carbono em organismos fotossintetizantes, e a proteína *ATP-citrate synthase* (ID: B6TD54), que participa da via metabólica do ciclo do ácido cítrico e biossíntese de metabólitos secundários.

Sete proteínas apresentaram aumento na sua expressão durante a embriogênese da linhagem P16 (baixa capacidade de expansão). Duas *uncharacterized protein* (ID: K7VM99 e B4G0K5) e uma *embryonic protein DC-8* (ID: B6SGN7) não apresentaram anotação funcional estabelecida, enquanto a *aspartic proteinase oryzasin-1* (ID: C0P3K6) é participante de processos biológicos de proteólise e metabolismo de lipídios; *DNA-binding protein MNB1B* (ID: P27347) participa dos processos biológicos de regulação da transcrição ligada ao DNA; a *major latex protein 22* (ID: Q19VG6) é uma proteína de defesa e a *17.4 kDa class I heat shock protein 3*, de resposta ao estresse térmico.

No total, 34 proteínas tiveram aumento de expressão no embrião no 25º DAP quando comparados ao 15º DAP nas linhagens P11 e P16 de milho pipoca

(Figura 21). Estas proteínas aumentaram sua expressão a medida que o embrião foi se desenvolvendo após a fecundação.

As proteínas *1-cys peroxiredoxin PER1* (ID: A2SZW8), *embryonic protein DC-8* (ID: K7UNW7) e *non-specific lipid-transfer protein* (ID: B8QW69) apresentaram aumento na expressão e este foi altamente significativo (1% de probabilidade pelo teste F) do 15º ao 25º DAP nas linhagens P11 e P16, sendo este aumento mais pronunciado na linhagem P16.

O mesmo ocorreu com as proteínas *embryonic protein DC-8* (ID: B6TK66), *ethylene-responsive protein* (ID: B6U2R1), *late embryogenesis abundant* (ID: B6SJ28), duas *uncharacterized protein* (ID: C0PGM3 e K7W272) e *vicilin-like embryo storage protein* (ID: Q03865), que apresentaram aumento de expressão, sendo este significativo a 5% de probabilidade pelo teste F e novamente a linhagem P16 foi a que teve o aumento mais pronunciado. As demais proteínas não apresentaram aumento de expressão significativo pelo teste F na comparação entre as duas linhagens.

Nove, das 34 proteínas, não apresentaram notação funcional definida e, quando foram realizadas buscas no Blast, os resultados obtidos não foram satisfatórios. Estas proteínas são: a *antimicrobial peptide MBP-1* (ID: B6SLF6), *glyoxalase family protein superfamily* (ID: B6SGF3), duas *jasmonate-induced proteins* (ID: B4FN23, B6SJJ4), uma *secreted protein* (ID: B6UI56), duas *uncharacterized proteins* (ID: B4G019 e K7VBJ4), uma *late embryogenesis abundant protein, group 3* (ID: B6SJ28) e por fim, duas *embryonic protein DC-8* (ID: B6TK66 e K7UNW7).

Wang et al. (2014) observaram acúmulo no endosperma de *glyoxalase I* (*lactoylglutathione lysase*) durante o desenvolvimento de sementes de milho, atribuindo à *glyoxalase* a função de detoxicação do metilglioxal (methylglyoxal-MG), um aldeído altamente reativo derivado da glicólise.

A maior expressão da *uncharacterized protein* ocorreu no 25º DAP na linhagem P11, enquanto a *vicilin-like embryo storage protein* apresentou sua maior expressão no 25º DAP na linhagem P16.

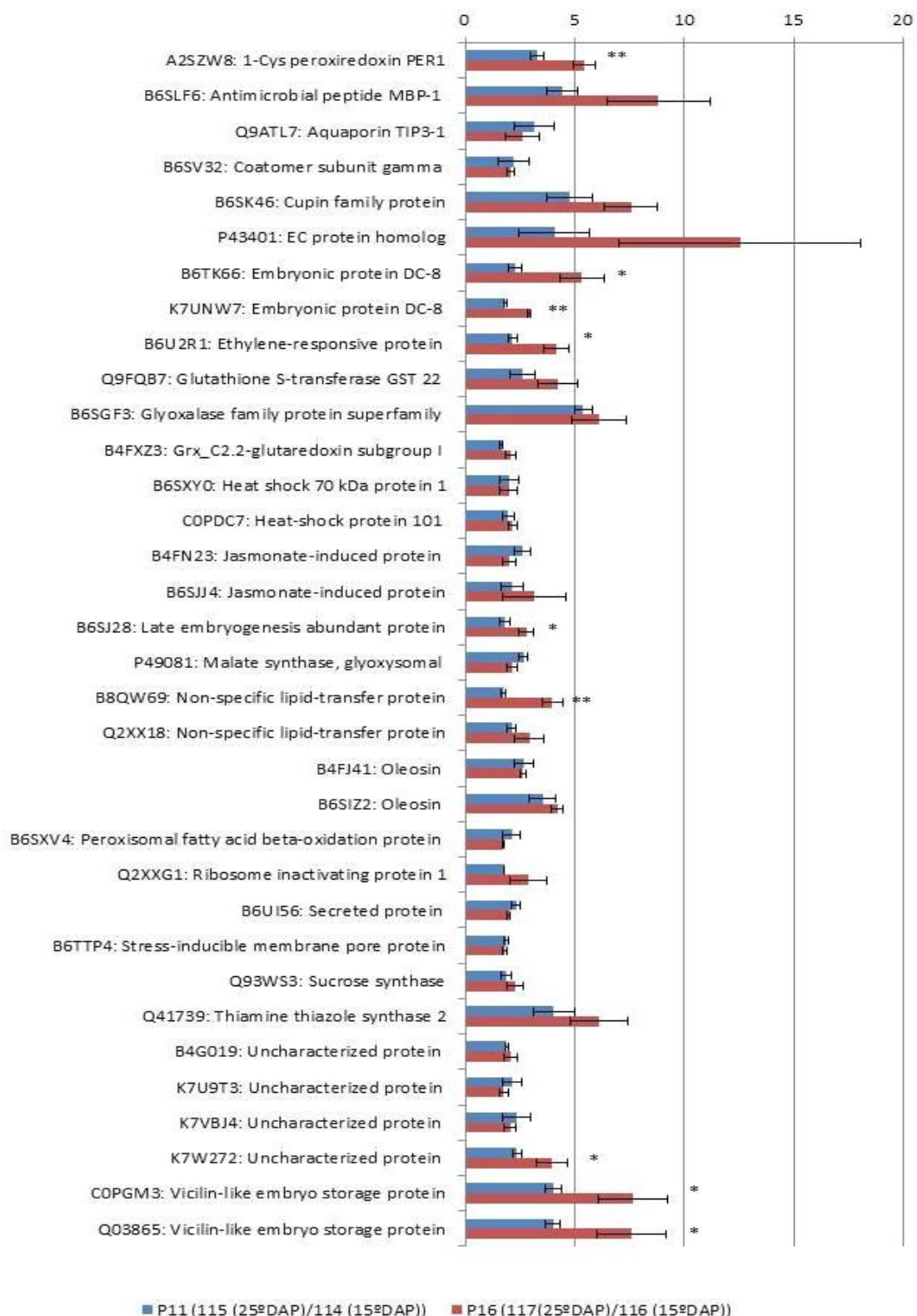


Figura 21 – Proteínas que tiveram aumento na expressão em embriões de milho pipoca nas linhagens P11<sub>115/114</sub> (alta CE) e P16<sub>117/116</sub> (baixa CE). Obs.: \*Significativo pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ); \*\*Significativo pelo teste F ( $p \leq 0,01$ ); barras que não apresentam estes símbolos, não apresentam diferenças estatísticas significativas pelo teste F.

Foram encontradas cinco proteínas com função relacionada a transporte. Duas proteínas, *non-specific lipid-transfer protein* (ID: B8QW69 e Q2XX18) apresentam a função de transporte de lipídios com função molecular de ligação com lipídios e calmodulinas. As proteínas *aquaporin TIP3-1* (ID: Q9ATL7), *coatomer subunit gamma* (ID: B6SV32) e *EC protein homolog* (ID: P43401) apresentam funções de transporte celular da água, transporte intracelular de proteínas mediado por vesículas e transporte do zinco, respectivamente. A *non-specific lipid-transfer protein* se expressou mais na linhagem P16.

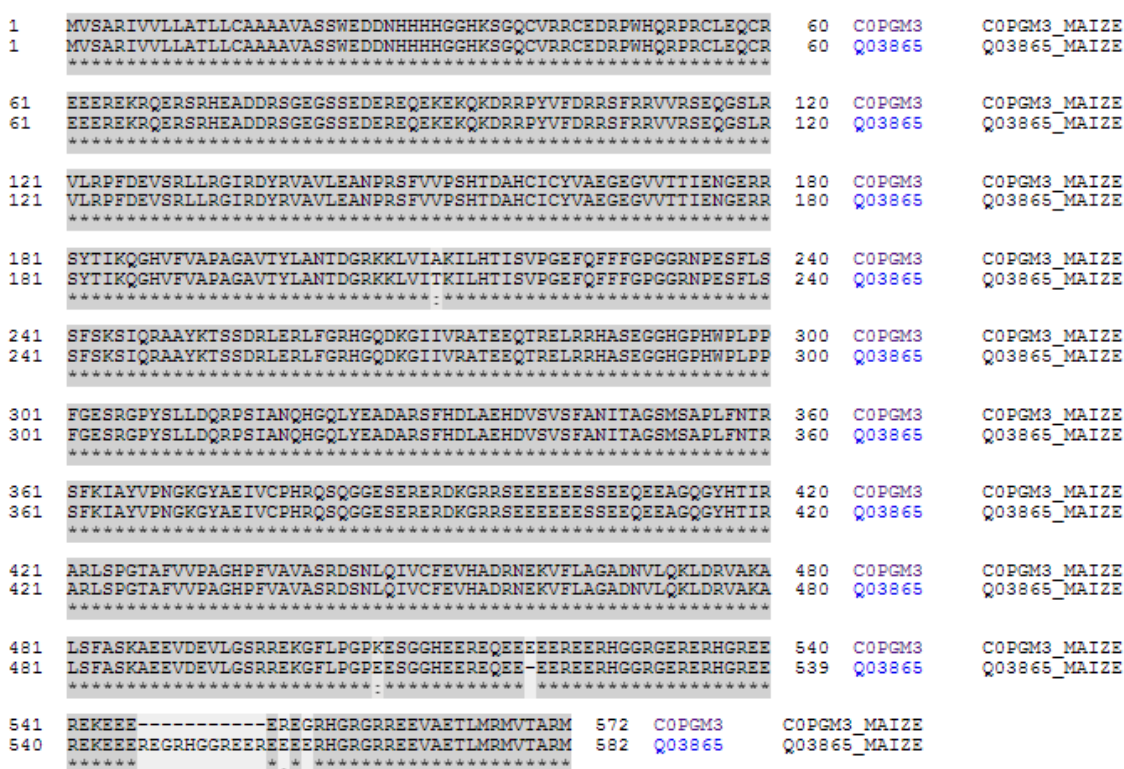


Figura 22 – Alinhamento entre a *uncharacterized protein* (ID: C0PGM3) com a *vicilin-like embryo storage protein* (ID: Q03865) de *Z. mays*.

Proteínas com notação funcional relacionada a estresse também foram identificadas. A *ethylene-responsive protein* (ID: B6U2R1) está associada a respostas a estresse e a *heat shock 70 kDa protein 1* (ID: B6SXY0) e *heat-shock protein 101* (ID: C0PDC7) estão associadas a respostas ao estresse térmico, à luminosidade elevada e ao peróxido de hidrogênio.

Liu et al. (2008) observaram elevação drástica na expressão do gene *ethylene-reponsive* no 25º DAP em sementes de milho, estando associado à maturação da semente, dessecação e defesa. Essa proteína apresentou sua maior

expressão no 25<sup>o</sup> DAP na linhagem P16. Jiménez-López et al. (2011) observaram uma elevação na expressão deste gene durante o processo de germinação, atuando também nesta função biológica.

As proteínas *1-cys peroxiredoxin PER1* (ID: A2SZW8) e *Grx\_C2.2-glutaredoxin subgroup I* (ID: B4FXZ3) apresentam funções associadas a processos de oxirredução. A *peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein* (ID: B6SXV4) apresenta atividade de oxirredutase e atua no metabolismo de ácidos graxos da mesma forma que a *uncharacterized protein* (ID: K7U9T3). Gong et al. (2013) constataram diminuição na expressão da proteína *1-cys peroxiredoxin* após o processo de germinação de embriões submetidos ao pré-tratamento de “hydropriming”.

A *glutathione S-transferase GST 22* (ID: Q9FQB7) apresenta atividade de transferase da glutationa; a *malate synthase glyoxysomal* (ID: P49081) possui notação funcional no ciclo do glioxalato e do ácido tricarbóxico e a *ribosome inactivating protein 1* (ID: Q2XXG1) apresenta regulação negativa da tradução gênica. Jiménez-López et al. (2011) observaram aumento na expressão desta proteína após 24 horas do início do processo de germinação do embrião. Campo et al. (2004) fizeram esta mesma observação após 24 horas da germinação de embriões infectados por *Fusarium verticillioides*. Aumento na expressão desta proteína foi observada por Huang et al. (2012) durante a germinação de embriões tolerantes à dessecação.

Foram observadas as proteínas *sucrose synthase* (ID: Q93WS3), cuja função principal consiste em participar nos processos metabólicos da sacarose pela atividade sacarose sintase; a *thiamine thiazole synthase 2* (ID: Q41739), responsável pela biossíntese da tiamina no cloroplasto e a *stress-inducibile membrane pore protein* (ID: B6TTP4), sem notação funcional estabelecida, apresentando apenas a informação de componente integral de membrana.

Liu et al. (2008) observaram o aumento na expressão do gene da *sucrose synthase* durante o desenvolvimento das sementes de milho entre o 5<sup>o</sup> e o 35<sup>o</sup> DAP, com picos de expressão no 10<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> DAP, e o relacionaram ao metabolismo do amido. Em uma análise proteômica, Liu et al. (2009a) verificaram elevada expressão desta proteína nos embriões de milho com elevado teor de óleo, quando comparada a embriões com teor de óleo normal. Jiménez-López et al. (2011) relataram uma importante observação com relação a dois genes de *sucrose synthase*. Eles

observaram que, após 24 horas do início da germinação, o gene da *sucrose synthase 1* teve sua expressão aumentada, enquanto o gene da *sucrose synthase 2* apresentou redução na sua expressão.

### **3.9. Proteômica da capacidade de expansão**

Com relação às diferentes capacidades de expansão entre as linhagens P11 e P16 e a expressão diferencial de proteínas, deve-se levar em consideração que esta característica é poligênica, com estimativas de herdabilidade variando de 70% a 90% (Coimbra et al., 2001; Pereira e Amaral Júnior, 2001). Essa capacidade está relacionada a fatores físicos, como: umidade (Song e Eckhoff, 1994a,b; Luz et al., 2005); densidade da semente (Park e Maga, 2002); danos no pericarpo e endosperma (Park e Maga, 2002; Singh et al., 2004); condições de armazenamento (Park e Maga, 2002); temperatura do pipocamento (Song et al., 1991); e pelo equipamento de avaliação (Dofing et al., 1991; Machado, 1997).

Além dos fatores físicos, existem importantes fatores químicos que diretamente se relacionam aos efeitos do genótipo (Song et al., 1991; Kandala et al., 1994; Tian et al., 2001) e são eles: o teor e perfil de ácidos graxos e resistência do pericarpo, dado pelas concentrações de celulose e lignina (Zinsly e Machado, 1987; Luz et al., 2005) matriz e textura do endosperma (Bandel, 1987), tipo de amido (Mercier e Feillet, 1975; Robbins Jr. e Ashman, 1984; Rooney e Serna-Saldívar, 1987; Zhang e Hosney, 1998) e quantidade ou tipo de proteínas que compõe o endosperma (Wilson, 1987; Borrás et al., 2006).

Este trabalho é o primeiro a estudar a expressão diferencial de proteínas em duas linhagens contrastantes quanto à capacidade de expansão, utilizando a abordagem “Shotgun” para a análise proteômica. Entre as características de interesse para estudos sobre capacidade de expansão estão o teor de óleo e o perfil de ácidos graxos e sementes de milho pipoca apresentam entre 3,8 – 4,6% de óleo (Park et al., 2000), sendo que, desta fração, 85% encontram-se no embrião (Liu et al., 2009b; Alonso et al., 2010), fração da semente objeto do presente estudo.

Após a avaliação das 1.189 proteínas no recurso Search & Color Pathways utilizando o KEGG Mapper, foi observado um total de dezoito proteínas associadas às vias metabólicas de lipídios. Sete dessas proteínas participam da via metabólica de biossíntese, sete proteínas participam da via metabólica de degradação de ácidos

graxos, duas proteínas participam da via do metabolismo do ácido alfa-linolênico e duas proteínas foram associada à biossíntese de ácidos graxos insaturados.

Duas das proteínas identificadas na via metabólica de biossíntese de ácidos graxos tiveram diminuição na expressão em ambas as linhagens e estas são duas isoformas da *enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]* (ID: B6TYG2 e B4FFA7). Assim, a redução na expressão destas proteínas reduz a biossíntese de ácidos graxos, sendo esta redução superior na linhagem de menor capacidade de expansão (P16), fato este validado pelo teste F a 5% de probabilidade.

Dados preliminares do nosso grupo de pesquisa (não publicados) evidenciaram existir, entre as linhagens P11 e P16, diferenças significativas com relação ao teor de óleo nas sementes inteiras e no embrião. Os coeficientes de correlação de Spearman evidenciaram existir correlação negativa significativa entre o teor de óleo no embrião na linhagem P16 com a capacidade de expansão. Contudo, em relação à linhagem P11 (elevada capacidade de expansão) esta correlação não foi observada e, sendo assim, até o momento os dados são inconclusivos para esta característica. Na literatura, são observados trabalhos nos quais existem descrições de correlação negativa entre teor de óleo total e capacidade de expansão (Park et al., 2000), da mesma forma que existem trabalhos que encontraram correlação positiva entre essas duas características como, por exemplo, o trabalho de Sweley et al. (2012).

No que se refere à capacidade de expansão, muitos autores abordam a influência do perfil dos ácidos graxos sobre essa característica e não apenas o teor de óleo (Park et al., 2000; Borrás et al., 2006; Sweley et al., 2012). Park et al. (2000) relataram que a composição química é um importante fator para determinar a capacidade de expansão. Os autores relataram os elevados níveis de ácidos linoleicos e oleicos, mas não estabeleceram nenhuma correlação entre a composição de óleos e a capacidade de expansão do milho pipoca.

Borrás et al. (2006), estudando linhagens de milho pipoca, observaram que o conteúdo de lipídios consistia em ácido linoleico (56,9 – 63,4%), seguido de ácido oleico (23,3 – 29,7%), ácido palmítico (9,1 – 12,1%) e ácido estearílico (1,2 – 1,9%). Mais importante foi a correlação positiva observada entre a capacidade de expansão e os valores de ácido oleico e linoleico (ácidos graxos saturados).

Os dados acima citados também foram observados por Sweley et al. (2012). Esses pesquisadores observaram que todos os híbridos de milho pipoca avaliados



apresentaram em sua composição de ácido graxos, em maior quantidade, o ácido linoleico, seguido do ácido oleico e palmítico, enquanto os ácidos estearílico, linolênico e demais contabilizaram menos que 2%. Em contrapartida, correlação negativa foi observada entre ácido oleico, ácido linoleico e capacidade de expansão. Devido a estes resultados, novas análises estão sendo desenvolvidas para verificar o perfil dos ácidos graxos destas duas linhagens para, juntamente com os resultados obtidos pela análise proteômica diferencial, buscar correlações mais acertadas a este respeito.

Embora não tenha sido identificada, na via metabólica de lipídio, as *oleosins* (duas isoformas), proteínas responsáveis pelo armazenamento de lipídios em estruturas celulares designadas de corpos lipídicos, foram observadas aumentando sua expressão em ambas as linhagens, conforme avançam os dias da polinização.

Liu et al. (2008) constataram uma superexpressão de genes para *oleosins* a partir do 25<sup>o</sup> DAP até 35<sup>o</sup> DAP, sugerindo que a expressão destes genes esteja relacionada à síntese de ácidos graxos que ocorre prioritariamente nos corpos lipídicos. Segundo estes autores, as *oleosins* são importantes proteínas que atuam na estabilidade dos corpos lipídicos, assim como atuam no reconhecimento de sinais para ligação de lipases.

Lee e Huang (1994) citam a importância das *oleosins*, tanto para a estabilidade dos corpos lipídicos como também na possibilidade de atuar no reconhecimento de sinais para a ligação de lipases durante o processo de germinação (Lee et al., 2002).

A regulação das *oleosins* está associada às fases do desenvolvimento e maturação das sementes, podendo ser observada a expressão de três diferentes genes para oleosinas, tanto no eixo-embrionário como no escutelo (Lee e Huang 1994).

Enfatiza-se, portanto, que este é o primeiro trabalho sobre proteômica associada à capacidade de expansão em sementes de milho pipoca. Os dados obtidos permitirão estabelecer novos direcionamentos para elucidar as questões biológicas associadas a esta característica agrônômica de interesse.

Novas análises computacionais de proteínas específicas às vias metabólicas de biossíntese de ácidos graxos associadas à análise dos ácidos graxos presentes nos embriões por cromatografia gasosa já estão sendo realizadas, ou até mesmo novas análises proteômicas alvo-direcionada, assim como a conclusão da análise

dos dados sobre endosperma de milho pipoca nestas mesmas linhagens, nas mesmas condições e épocas de coleta. Estudos proteômicos deverão, também, ser realizados com o pericarpo, das sementes destas linhagens, associados a estudos bioquímicos qualitativos e quantitativos sobre amido, celulose e lignina.

Os resultados aqui relatados poderão possibilitar importante incremento nos programas de melhoramento genético de milho pipoca. A principal característica de interesse para o consumidor é a qualidade da pipoca, a qual está relacionada diretamente à capacidade de expansão. Por isso, o estudo de proteômica associado às características bioquímicas possibilitará o uso de possíveis proteínas marcadoras relacionadas à capacidade de expansão para a realização de seleção assistida, além de contribuir para o desenvolvimento de linhagens com elevado potencial agrônomo e de capacidade de expansão, bem como permitirá a utilização de ferramentas biotecnológicas como, por exemplo, o *knockout* gênico e a transgenia.

#### 4. CONCLUSÃO

a) A metodologia de extração de proteínas ensaiada em embrião de sementes de milho pipoca que apresentou maiores concentrações de proteínas e o melhor perfil eletroforético foi a que utilizou um tampão de extração salino-Tris.

b) A condução do experimento foi realizada com êxito, fato este observado pela elevada reprodutibilidade dos cromatogramas das diferentes replicatas experimentais, bem como pela identificação de grande número de proteínas identificadas em *Zea mays* L. e citadas quase na totalidade dos trabalhos relacionados à proteômica ou transcriptoma em embriões desta espécie.

c) A marcação isobárica (iTRAQ®) foi de grande importância no que se refere à agilidade da análise proteômica, seja ela no aspecto temporal, seja quanto à avaliação do proteoma quantitativo diferencial entre as diferentes amostras.

d) Devido ao seu caráter quantitativo, no qual vários genes e de diferentes vias metabólicas estão envolvidos, a identificação de proteínas relacionadas à capacidade de expansão não é fácil de ser realizada.

e) Metabolismo de lipídios é uma importante via metabólica para compreensão da capacidade de expansão, uma vez que o seu teor e perfil de ácidos graxos se mostram relacionados a esta característica.

f) Sobre a via de lipídios e capacidade de expansão, infere-se que a diminuição da expressão de proteínas relacionadas à biossíntese de ácidos graxos (*enoyl-reductase*) poderá diminuir a quantidade final de óleo no embrião ou alterar a síntese de ácidos graxos específicos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, M & S Mendes & Scotin e Editora Argos, 2013.458p.

ALEXANDER, D.E.; CREECH, R.G. Breeding special industrial and nutritional types. In: SPRAGUE, G.F.; FUCCILLO, D.A. (eds.). **Corn and corn improvement**. (Agronomy, 18). Madison: American Society of Agronomy, 1977. p. 363-386.

ALONSO, A.P.; DALE, V.L.; SHACHAR-HILL, Y. Understanding fatty acid synthesis in developing maize embryos using metabolic flux analysis. **Metabolic Engineering**, 12:488-497, 2010.

ALVES, P.; ARNOLD, R.J.; NOVOTNY, M.V.; RADIVOJAC, P.; REILLY, J.; TANK, H. Advancement in protein inference from shotgun proteomics using peptide detectability. **Pacific Symposium on Biocomputing**, 12:409-420, 2007.

BANDEL, G. Genética. In: PATERNIANI, E. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 650p.

BELING, R.R.; KIST, B.B.; SANTOS, C.E.; CARVALHO, C.; REETZ, E.R.; POLL, H.; PRIEBE, C.; NEUMANN, R.I.; JUNGBLU, G. **Anuário Brasileiro de Milho 2013**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2013. 136p.

BORRAS, F.; SEETHARAMAN, K.; YAO, N.; ROBUTTI, J.L.; PERCIBALDI, N.M.; EYHERABIDE, G.H. Relationship between popcorn composition and expansion volume and discrimination of corn types by Using Zein Properties. **Cereal Chemistry**, 83:86-92, 2006.

BRANLARD, G.; BANCEL, E. Protein Extraction from Cereal seeds. In: Thiellement, H.; ZIVY, M.; DAMERVAL, C.; MÉCHIN, V. **Plants proteomics: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology 335. Totowa: Humana Press Inc., 2007, p.15-25.

CAMPO, S.; CARRASCAL, M.; COCA, M.; ABIÁN, J.; SEGUNDO, B.S. The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: A proteomics approach. **Proteomics**, 4:383-396, 2004.

CHEN, Z.Y.; BROWN, R.L.; DAMANN, K.E.; CLEVELAND, T.E. Identification of unique or elevated levels of kernel proteins in aflatoxin-resistant maize genotypes through proteome analysis. **Phytopathology**, 92:1084-1094, 2002.

COIMBRA, R.R.; MIRANDA, G.V.; VIANA, J.M.S.; CRUZ, C.D. Correlações entre caracteres na população de milho pipoca DFT-1 Ribeirão. **Revista Ceres**, 48:427-435, 2001.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Preços mínimos em vigor**. Disponível em: <http://sisdep.conab.gov.br/precosiagroweb>. Acesso em: 1, junho, 2014.

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. **Electrophoresis**, 7:52–54, 1986.

DI CIERO, L.; BELLATO, C.M. Proteoma; Avanços recentes em técnicas de Eletroforese bidimensional e Espectrometria de Massa. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 29:158-164, 2002.

DOFING, S.M.; D'CROZ-MASON, N.; THOMASCOMPTON, M.A. Inheritance of expansion volume and yield in two popcorn x dent corn crosses. **Crop Science**, 31:715-718, 1991.

ELLIOT, M.H.; SMITH, D.S.; PARKER, C.E.; BORCHERS, C. Current trends in quantitative proteomics. **Journal of Mass Spectrometry**, 44:1637-1660, 2009.

ERTAS, N.; SOYLU, S.; BILGICLI, N. Effects of kernel properties and popping methods on popcorn quality of different corn cultivars. **Journal of Food Process Engineering**, 32:478–496, 2009.

ERWIN, A.T. The origin and history of popcorn, *Zea mays* L. var. *indurata* (Sturt) Bailey mut. *Everta* (Sturt) Erwin. **Agronomy Journal**, 41:53-56, 1949.

FACHIN, D.T.; SCHEER, A.P.; SAMPAIO, E. LULLEZ, J.C.; CARREÑO, R.E.; RAMIREZ, C.; ROCCO, C.S.; FUGMANN, H.A.J. Elaboração de pós para bebidas utilizando milho pipoca. **Boletim do Ceppa**, 11:11-16, 1993.

GALINAT, W.C. The origin of corn. In: SPRAGUE, G.F. (ed.) **CORN and corn improvement**. New York: Academic Press, 1977. 1-48p.

GEORGE, D.; BABALOLO, O.O.; GATEHOUSE, A.M.R. Differential protein expression in maize (*Zea mays*) in response to insect attack. **African Journal of Biotechnology**, 10: 7700-7709, 2011.

GONG, F.; WU, X.; WANG, W. Comparative proteomic identification of embryo proteins associated with hydropriming induced rapid-germination of maize seeds. **Plant Omics Journal**, 6:333-339, 2013.

GRANIER, F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, 9:712-718, 1988.

GRIMAUD, F.; ROGNIAUX, H. JAMES, M.G.; M, YERS, A.M.; PLANCHOT, V. Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, 59:3395-3406, 2008.

GUO, B.; CHEN, Y.; ZHANG, G.; XING, J.; HU, Z.; FENG, W.; YAO, Y.; PENG, H.; DU, J.; ZHANG, Y.; NI, Z.; SUN, Q. Comparative proteomic analysis of embryos between a maize hybrid and its parental lines during early stages of seed germination. **PIOS ONE**, 8:1-10, 2013.

HOCHHOLDINGER, F.; GUO, L.; SCHNABLE, P.S. Lateral roots affect the proteome of the primary root of maize (*Zea mays* L.). **Plant Molecular Biology**, 56:397–412, 2004.

HOCHHOLDINGER, F.; WOLL, K.; GUO, L.; SCHANBLE, P.S. The accumulation of abundant soluble proteins changes early in the development of the primary roots of maize (*Zea mays* L.). **Proteomics**, 5:4885–4893, 2005.

HOSENEY, R.C.; ZELEZNAK, K.; ABDELRAHMAN, A. Mechanism of popcorn popping. **Jornal of Cereal Science**, 1:43-52, 1983.

HUANG, H.; MOLLER, I.M.; SONG, S.Q. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. **Journal Proteomics**, 75:1247–1262, 2012.

ISAACSON, T.; DAMASCENO, C.M.B.; SARAVANAN, R.S.; YONGHUA, H.; CATALÁ, C.; SALADIÉ, M.; ROSE, J.K.C. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. **Nature Protocols**, 1:769-774, 2006.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, S.; MANCERA-MARTÍNEZ, E.; DONAYRE-TORRES, A.; RANGEL, C.; URIBE, L.; MARCH, S.; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, G.; JIMÉNEZ, E.S. Expression profile of maize (*Zea mays* L.) embryonic axes during dermination: translational regulation of ribosomal protein mRNAs. **Plant & Cell Physiology**, 52:1719-1733, 2011.

KANDALA, C.V.K.; NELSON, S.O.; LAWRENCE, K.C. Nondestructive moisture determination in small samples of popcorn by RF impedance measurement. **Transactions of the ASAE**, 37:191-194, 1994.

KANEHISA, M.; GOTO, S.; SATO, Y.; FURUMICHI, M.; TANABE, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. **Nucleic Acids Research**, 40:109–114, 2012.

KRIZ, A.L. Characterization of embryo globulins encoded by the maize Glb genes. **Biochemical genetics**, 27:239-251, 1989.

LEE, J.M.; WILLIAMS, M.E.; TINGEY, S.V.; RAFALSKI, J.A. DNA array profiling of gene expression changes during maize embryo development. **Functional & Integrative Genomics**, 2:13-27, 2002.

LEE, K.; HUANG, A.H.C. Genes encoding oleosins in maize kernel of inbreds Mo17 and B73. **Plant Molecular Biology**, 26:1981-1987, 1994.

LIU, X.; FU, J.; GU, D.; LIU, W.; LIU, T.; PENG, Y.; WANG, J.; WANG, G. Genome-wide analysis of gene expression profiles during the kernel development of maize (*Zea mays* L.). **Genomics**, 91: 378-387, 2008.

LIU, Z.; YANG, X.H.; FU, Y. SAD, a Stearoyl-acyl carrier protein desaturase highly expressed in high-oil maize inbred lines. **Russian Journal of Plant Physiology**, 56:709-715, 2009a.

LIU, Z.; YANG, X.H.; FU, Y.; ZHANG, Y.; YAN, J.; SONG, T.; ROCHEFORD, T.; LI, J. Proteomic analysis of early germs with high-oil normal inbred lines in maize. **Molecular Biology Reports**, 36:813-821, 2009b.

LU, T.C.; MENG, L.B.; YANG, C.P.; LIU, G.F.; LIU, G.J.; MA, W.; WANG, B.C. A shotgun phosphoproteomics analysis of embryos in germinated maize seeds. **Planta**, 228:1029-1041, 2008.

LUZ, M.L.S.; DALPASQUALE, V.D.; SCAPIM, C.A.; DE LUCCA E BRACCINI, A.; ROYER, M.R.; MORA, F. Influência da umidade das sementes na capacidade de expansão de três genótipos de milho pipoca (*Zea mays* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, 27:549-553, 2005.

LYERLY, P.J. Some genetic and morphologic characters affecting the popping expansion of popcorn. **Agronomy Journal**, 34:986-999, 1942.

MACHADO, P.F. **Efeito das condições de colheita e secagem sobre a capacidade de expansão de milho pipoca**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 41p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola).

MANGELSDORF, P.C. **Corn its origin, evolution and improvment**. Cambridge: Harvard University Press, 1974. 262p.

MANGELSDORF, P.C.; SMITH JR, C.E. A discovery of remains of primitive maize in New Mexico. **Journal of Heredity**, 17: 39-43, 1949.

MASSONNEAUM, A.; CONDAMINE, P.; WISNIEWSKI, J-P.; ZIVY, M.; ROGOWSKY, P.M. Mayze cystatins respond to developmental cues, cold stress and drought. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1729:186-199, 2005.

MATALLANA-SURGET, S.; LEROY, B.; WATTIEZ, R. Shotgun proteomics: concept, key points and data mining. **Expert Review of Proteomics**, 7: 5-7, 2010.



MCCARTHY, F.M.; GRESHAM, C.R.; BUZA, T.J.; CHOUVARINE, P.; PILLAI, L.R.; KUMAR, R.; OZKAN, S.; WANG, H.; MANDA, P.; ARICK T.; BRIDGES, S.M.; BURGESS, S.C. AgBase: supporting functional modeling in agricultural organisms. **Nucleic Acids Research**, 39:497-506, 2011.

MÉCHIN, V.; BALLIAU, T.; CHATEAU-JOUBERT, S.; DAVANTURE, M.; LANGELLA, O.; NEGRONI, L.; PRIOUL, J.L.; THEVENOT, C.; ZIVY, M.; DAMERVAL, C. A two-dimensional proteome map of maize endosperm. **Phytochemistry**, 65:1609–1618, 2004.

MÉCHIN, V.; THÉVENOT, C.; GUILLOUX, M.L.; PRIOUL, J.L.; DAMERVAL, C. Developmental analysis of maize endosperm proteome suggests a pivotal role for pyruvate orthophosphate dikinase. **Plant Physiology**, 143:1203-1219, 2007.

MERCIER, C.; FEILLET, P. Modification of carbohydrate components by extrusion cooking of cereal products. **Cereal Chemistry**, 52:283-297, 1975.

MITTELMANN, A.; MIRANDA-FILHO, J.B.; LIMA, G.J.M.M.; HARA-KLEIN, C.; SILVA, R.M.; TANAKA, R.T. Análise dialéctica do teor de óleo em milho. **Revista Brasileira de Agrociência**, 12:139-143, 2006.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Glicólise, Gliconeogênese e Via das Pentoses-fosfato. In: NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Editora Artmed, Porto Alegre – RS, p.527-568, 2011.

NOGUEIRA, F.C.S.; PALMISANO, G.; SCHWÄMMLE, V.; CAMPOS, F.A.P.; LARSEN, M.R.; DOMONT, G.B.; ROEPSTORFF, P. Performance of isobaric and isotopic labeling in quantitative plant proteomics. **Journal of Proteome Research**, 11:3046-3052, 2012.

OLIVEROS, J.C. **Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams**. Disponível em: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>. Acesso em: 12, fevereiro, 2014.

PACHECO, C.A.P.; GAMA, E.P.; GUIMARÃES, P.E.O.; SANTOS, M.X.; FERREIRA, A.S. Estimativas de parâmetros genéticos nas populações CMS-42 e CMS-43 de milho pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 33:1995-2001, 1998.

PAN, L.; KAWAI, M.; YANO, A.; UCHIMIYA, H. Nucleoside diphosphate kinase required for coleptile elongation in rice. **Plant Physiology**, 122:447-452, 2000.

PARK, D.; ALLEN, K.G.D.; STERMITZ, F.R.; MAGA, J.A. Chemical composition and physical characteristics of unpopped popcorn hybrids. **Journal of Food Composition and Analysis**, 13:921-934, 2000.

PARK, D.; MAGA, J.A. Effects of storage temperature and kernel physical condition on popping qualities of popcorn hybrids. **Cereal Chemistry**, 79:572-575, 2002.

PEREIRA FILHO, I.A.; CRUZ, J.C.; PACHECO, C.A.P.; COSTA, R.V. **Milho pipoca**. Ageitec – Agência Embrapa De Informação Tecnológica. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONT000fy9zxyln02wx5ok0pvo4k359f3bo9.html>. Acesso em: 16, agosto, 2013.

PEREIRA, M.G.; AMARAL JÚNIOR, A.T. Estimation of Genetic components in popcorn based on nested design. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:3-10, 2001.

PORUBLEVA, L.; VANDER, V.K.; KOTHARI, S.; OLIVER, D.J.; CHITNIS, P.R. The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. **Electrophoresis**, 22:1724–1738, 2001.

QIN, J.; FU, F.; LIU, D.; YIN, C.; ZHAO, S.; CHEN, H.; ZHANG, J.; YANG, C.; ZHAN, X.; ZHANG, M. Proteomic analysis of elite soybean Jidou17 and its parents using iTRAQ-based quantitative approaches. **Proteome Science**, 11:1-12, 2013.

REQUEJO, R.; TENA, M. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. **Phytochemistry**, 66:1519–1528, 2005.

ROBBINS, M.L.; ROY, A.; WANG, P-H.; GAFOOR, I.; SEKHON, R.S.; BUANAFINA, M.M.O.; ROHILA, J.S.; CHOPRA, S. Comparative proteomics analysis by DIGE and iTRAQ provides insight into the regulation of phenylpropanoids in maize. **Journal of Proteomics**, 93:254-275, 2013.

ROBBINS, W.A.JR.; ASHMAN, R.B. Parent-offspring popping expansion correlations in progeny of dent corn x popcorn and flint corn x popcorn crosses. **Crop Science**, 24: 119-121, 1984.

ROCHA, T.L.; COSTA, P.H.A.; MAGALHÃES, J.C.C.; EVARISTO, R.G.S.; de VASCONCELOS, É.A.R.; COUTINHO, M.V.; PAES, N.S.; SILVA, M.C.M.; GROSSI-DE-SÁ. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Brasília: Embrapa, 2005. p.1-12,. (Comunicado Técnico, 136).

ROLLESTSCHEK, H.; KOCK, K.; WOBUS, U.; BORISJUK, L. Positional cues for the starch/lipid balance in maize kernels and resource partitioning to the embryo. **The Plant Journal**, 42: 69-83, 2005.

ROONEY, L.W.; SERNA-SALDÍVAR, S.O. Food uses of whole corn and dry-milled fractions. In: WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. (eds.). **Corn: chemistry and technology**. St. Paul: AACCI International, 1987. p. 399-429.

ROSS, P.L.; HUANG, Y.N.; MARCHESE, J.N.; WILLIAMSON, B.; PARKER, K.; HATTAN, S.; KHAINOVSKI, N.; PILLAI, S.; DEY, S.; DANIELS, S.; PURKAYASTHA, W.; JUHASZ, P.; MARTIN, S.; BARTLET-JONES, M.; HE, F.; JACOBSON, A.; PAPPIN, D.J. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. **Molecular & Cellular Proteomics**, 3:1154-1168, 2004.

RUFFATO, S.; CORRÊA, P.C.; MARTINS, J.H.; MANTOVANI, B.H.M.; SILVA, J.N. Efeito das condições de colheita, pré-processamento e armazenamento na qualidade do milho pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35:591-597, 2000.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, D.; PUIGDOMÈNECH, P.; PAGÈS M. Regulation of gene expression. In developing *Zea mays* embryos. **Plant Physiology**, 82:543-549.

SAUER, M.; JAKOB, A.; NORDHEIM, A.; HOCHHOLDINGER, F. Proteomic analysis of shoot-borne root initiation in maize (*Zea mays* L.). **Proteomics**, 6:2530–2541, 2006.

SAWAZAKI, E. A cultura do milho pipoca no Brasil. **O Agrônomo**, 53:11-13, 2001.

SILVA E SILVA, A.M.; CORRÊA, G.C.; REIS, E.M. Proteômica – Uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde & Ambiente em Revista**, 2:1-10, 2007.

SILVA, W.J.; VIDAL, B.C.; MARTINS, M.E.Q.; VARGAS, H.; PEREIRA, C.; ZERBETTO, M.; MIRANDA, L.C.M. What makes popcorn pop. **Nature**, 362:417, 1993.

SILVA-SANCHEZ, C.; CHEN, S.; ZHU, N.; LI, Q-B.; CHOUREY, P.S. Proteomic comparison of basal endosperm in maize *miniature1* mutant and its wild-type *Mn1*. **Frontiers in Plant Science**, 4:1-16, 2013.

SINGH, S.K.; NARPINDER, S.; MANINDER, K. Characteristics of the different corn types and their grain fractions: physicochemical, thermal morphological and rheological properties of starches. **Journal of Food Engineering**, 64:119-127, 2004.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J. KLENK, D.C. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, 150:76-86, 1985.

SONG, A.; ECKHOFF, S.R. Individual kernel moisture content of preshelled and shelled popcorn and equilibrium isotherms of popcorn kernels of different sizes. **Cereal Chemistry**, 71:461-463, 1994a.

SONG, A.; ECKHOFF, S.R. Optimun popping moisture content for popcorn kernels of different sizes. **Cereal Chemistry**, 71:458-460, 1994b.

SONG, A.; ECKOFF, S.R.; PAULSEN, M.; LITCHFIELD, J.B. Effect of kernel size and genotype on popcorn popping volume and number of unpopped kernels. **Cereal Chemistry**, 68:464-467, 1991.

SUN, L.; WU, Y.; ZOU, H.; SU, S.; LI, S.; SHAN, X.; Xi, J.; YUAN, Y. Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (*Zea mays* L.) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 113:103-119, 2013.

SWELEY, J.C.; ROSE, D.J.; JACKSON, D.S. Hybrid and environment effects on popcorn kernel physiochemical properties and their relationship to microwave popping performance. **Journal of Cereal Science**, 55: 188-194, 2012.

THINGHOLM, T.E.; PALMISANO, G.; KJELDSEN, F.; LARSEN, M.R. Undesirable charge-enhancement of isobaric tagged phosphopeptides leads to reduced identification efficiency. **Journal Proteome Resource**, 9:4045-4052, 2010.

TIAN, Y.; BURIK, P.; ECKHOLFF, S.R. Effect of hybrid and physical properties of individual popcorn kernels on expansion volume. **Cereal Chemistry**, 78:578-582, 2001.

TIFFIN, P. Comparative evolutionary histories of chitinases genes in the genus *Zea* and family Poaceae. **Genetics**, 167:131-1340, 2004.

TING, J.T.; LEE, K.; RATNAYAKE, C.; PLATT, K.A.; BALSAMO, R.A.; HUANG, A.H. Oleosin gene in maize kernels having diverse oil contents are constitutively expressed independent of oil contents. Size and shape of intracellular oil bodies are determined by the oleosins/oils ratio. **Planta**, 199:158-165, 1996.

TISSOT, U.F.; ZAMBAZI, R.C.; MENDONÇA, C.R.B. Milho Pipoca. Caracterização física, química, microbiológica e sensorial. **Boletim do CEPPA Curitiba** 19:1-12, 2001.

TNANI, H.; LÓPEZ, I.; JOUENNE, T.; VICIENT, C.M. Protein composition analysis of oil bodies from maize embryos during germination. **Journal of Plant Physiology**, 168:510-513, 2011.

TZEN, J.T.C.; LAI, Y.K.; CHAN, K.L.; HUANG, A.C. Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oil bodies of diverse seed species. **Plant Physiology**, 94:1282-1289, 1990.

VANCE, V.B.; HUANG, A.H.C. Expression of lipid body protein gene during maize seed development. **The Journal of Biological Chemistry**, 263:1476-1481, 1988.

VERNOUD, V.; HAJDUCH, J.; KHALED, A.S.; DEPÈGE, N.; ROGOWSKY, P.M. Maize embryogenesis. **Maydica**: 469-483, 2005.

WANG, W.Q.; YE, J.Q.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; WOJDYLA, K.I.; JENSEN, O.N.; MOLLER, I.M.; SONG, S.Q. Proteomic comparison between maturation drying and prematurely imposed drying of *Zea mays* seeds reveals a potential role of maturation drying in preparing proteins for seed germination, seedling vigor, and pathogen resistance. **Journal Proteome Research**, 13: 606-626, 2014.

WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E.; MAZZUCA, S.; CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering. **Electrophoresis**, 24:2369-2375, 2003.

WEATHERWAX, P. The popping of corn. Proceedings of the Indian Academy of Science, 1921:149-153, 1922.

WILLIER, J.G.; BRUNSON, A.M. Factors affecting the popping quality of popcorn. **Journal of Agricultural Research**, 35:615 - 624, 1927.

WILSON, C.M. Proteins of the kernel. In: WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. (eds.). **Corn: chemistry and technology**. St. Paul: AACCI International, 1987. p. 273-310.

ZANETTE, V.A. Análise da variabilidade genética em populações de milho pipoca (*Zea mays* L.): heterose da capacidade de expansão do grão. **Agronomia Sulriograndense**, 25:173-181, 1989.

ZEAMAYS. **Milho pipoca. Tecnologia de produção**. Disponível em: <http://www.zeamays.com.br/>. Acesso em: 16, agosto, 2013.

ZHANG, W.; HOSENEY, R.C. Factors affecting expansion of corn meals with poor and good expansion properties. **Cereal Chemistry**, 75:639-643, 1998.

ZHANG, Y.; FFONSLow, B.; SHAN, B.; BAEK, M-C.; YATES, J.R. Protein analysis by Shotgun/Bottom-up proteomics. **Chemical Reviews**, 113: 2343-2394, 2013.

ZIEGLER, K.E. **Popcorn**. In: HALLAUER, A.R. Specialty corns (eds.) CRC press USA, 2001. p. 199-234.

ZIEGLER, K.E.; ASHMAN, B. Popcorn. In: HALLAUER, A.R. (eds.). **Specialty corns**. Ames, CRC Press, 1994. p.189-223.

ZINSLY, J.R.; MACHADO, J.A. **Milho pipoca**. In: PATERNIANI, E; VIÉGAS, G.P. (eds.). Melhoramento e produção de milho no Brasil. Piracicaba, ESALQ: Fundação Cargill, 1978. p.339-348.

ZINSLY, J.R.; MACHADO, J.A. Milho pipoca. In: PATERNIANI, E; VIÉGAS, G.P. (eds.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas, Fundação Cargill, 1987. p .411-422.

## CAPÍTULO II

### PROTEÔMICA QUANTITATIVA NA EMBRIOGÊNESE DE SEMENTES DE MILHO PIPOCA BASEADA EM ITRAQ

#### RESUMO

O experimento foi implantado para avaliar a expressão diferencial de proteínas em duas linhagens de milho pipoca, com elevada e baixa capacidades de expansão, em dois diferentes períodos da embriogênese: 15<sup>o</sup> dias após a polinização (DAP) e 25<sup>o</sup> DAP. Por meio da adoção da abordagem “Shotgun” e utilizando os marcadores isobáricos iTRAQ®, foi possível observar em embriões a expressão de 1.189 proteínas confiáveis. Diagramas de Venn foram confeccionados para avaliar a expressão diferencial de proteínas entre as linhagens nas diferentes épocas de coleta e que refletiam o processo de embriogênese. Na linhagem de elevada capacidade de expansão (P11), foi observado 4 e 9 proteínas que tiveram sua expressão diminuída e aumentada, respectivamente, no transcorrer da embriogênese. Em contrapartida, a linhagem de baixa capacidade de expansão (P16) apresentou 127 e 7 proteínas que tiveram sua expressão diminuída e aumentada, respectivamente. Também foram observadas 30 proteínas comuns em ambas as linhagens que diminuíram sua expressão, porém a maior redução na expressão foi observada na linhagem P11. Outras 34 proteínas comuns em ambas as linhagens aumentaram sua expressão, com aumento mais evidente na linhagem P16. A análise quantitativa destas proteínas evidenciou que este experimento abrange a segunda fase da embriogênese de milho comum. A maturação e o crescimento do embrião foram observados pelo aumento na expressão das proteínas *late embryogenesis abundant* e *seed maturation*, conforme transcorreram os dias da embriogênese. O acúmulo de reservas também foi observado nos embriões pelo aumento das proteínas *globulin*, *oleosin* e *legumin*. O fato de este aumento ser mais evidente na linhagem P16 evidencia um atraso no desenvolvimento embrionário da linhagem P11. Também foi observado aumento na expressão de proteínas associadas ao metabolismo do ácido cítrico na linhagem P11, evidenciando comportamento diferencial à embriogênese de milho comum, no



qual a expressão destas proteínas se dá no período entre 10<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> DAP. A linhagem de baixa capacidade de expansão apresenta o mesmo perfil na expressão de proteínas quando comparada ao milho comum, fato este não observado na linhagem de alta capacidade de expansão que apresenta perfil de expressão de proteínas diferencial ao milho comum. Esta diferença na expressão de proteínas poderá justificar a diferença na capacidade de expansão entre as duas linhagens estudadas.

Palavras-chave: *Zea mays*, embrião, quantificação relativa, marcadores isobáricos, expressão proteínas.

## Quantitative proteomics iTRAQ based the embryogenesis of popcorn seed

Experimentation was carried out to evaluate the differential expression of proteins in two lines of popcorn with high and low expansion capacities, during two different periods of embryogenesis, the 15th day after pollination (DAP) and 25th DAP. By adopting the Shotgun approach, and utilizing isobaric iTRAQ® tags it was possible to observe in embryos the expression of 1,189 reliable proteins. Venn diagrams were made to assess differential protein expression between lines during different sampling times, reflecting the embryogenesis process. In the line with high expansion capacity (P11) it was observed that 4 and 9 proteins had their expression reduced and increased, respectively, during embryogenesis. In contrast, the line with low expansion capacity (P16) showed 127 and 7 proteins that had their expression reduced and increased, respectively. Moreover, 30 proteins that reduced expression were observed to be common among both lines, however, greater reduction in expression was observed in line P11. Other 34 proteins common to both lines increased their expression, being most evident in line P16. After quantitative analysis of these proteins we found that this experiment covers the second embryogenesis phase of common corn. Maturation and embryo growth were observed through the increase in expression of *late embryogenesis abundant* protein and *seed maturation*, as the days of embryogenesis elapsed. The accumulation of reserves was also observed in embryos by the increase in *globulin*, *oleosin* and *legumin* proteins. The fact that this increase is most evident in line P16 reflects a late growth in the embryonic development of line P11. An increase in proteins associated with the metabolism of citric acid was also observed in line P11, demonstrating differential behavior to the embryogenesis of common corn, where the expression of these proteins are present in the period from the 10th to 15th DAP. Thus it is concluded that the line with low expansion capacity presents the same profile in the expression of proteins when compared to common corn. This fact is not observed on the line with high expansion capacity, which displays a profile for protein expression different from common corn. This difference in the expression of proteins may justify the difference in expansion capacity between both lines studied.

Keywords: *Zea mays*, embryo, relative quantification, isobaric markers, protein expression.

## 1. INTRODUÇÃO

A embriogênese é a soma de todos os processos de crescimento e diferenciação que vão desde a fase de zigoto unicelular até uma estrutura multicelular altamente organizada, denominada embrião maduro (Lee et al., 2002; Vernoud et al., 2005).

A primeira fase da embriogênese é dada pelo desenvolvimento e morfogênese, onde se inclui a diferenciação celular para formar todos os órgãos do embrião até o 15º DAP (dias após a polinização). A segunda fase compreende o período de maturação e crescimento do embrião, assim como o acúmulo de reservas, permanecendo o embrião nessa fase do 15º ao 45º DAP. Nessa fase, ocorrem ainda mudanças drásticas na expressão gênica nos embriões, entre o 20º e 25º DAP, e mudanças sutis na expressão após o 25º DAP (Lee et al., 2002; Liu et al., 2008). A terceira fase, que se inicia no 45º DAP, compreende o processo de desidratação do embrião, o qual entra em dormência, preparando-se para a separação da planta mãe (Vernoud et al., 2005).

Durante as fases de diferenciação dos embriões, ou seja, a embriogênese, há a expressão diferencial de proteínas. Dessa forma, a realização de estudos proteômicos sobre a embriogênese poderá auxiliar no entendimento sobre as proteínas envolvidas nesse processo, assim como em outros processos metabólicos de interesse, como a via de lipídeos e carboidratos.

Um dos principais objetivos da proteômica é quantificar com precisão as alterações na expressão de proteínas em resposta à alteração na expressão das mesmas (Elliott et al., 2009). O estudo de proteínas é necessário, pois a caracterização dos genes não pode prever adequadamente a dinâmica das proteínas. Assim, a proteômica é um método direto para identificar, quantificar e estudar as modificações pós-traducionais das proteínas em uma célula, tecido ou mesmo organismos (Di Cierro e Bellato, 2002; Silva e Silva et al., 2007).

Uma análise proteômica pode ser realizada utilizando a estratégia “Bottom-up”, que se refere à caracterização de proteínas por meio da liberação de peptídeos a partir de uma reação de proteólise. Quando essa análise é realizada em uma mistura de proteínas, ela é designada “Shotgun” (Zhang et al., 2013).

A análise proteômica “Shotgun” é extremamente poderosa no que se refere à quantidade de dados obtidos, quando comparada com os dados dos géis 2-DE. Assim, utilização de géis passa a ser uma abordagem complementar. Por isso, atualmente, a proteômica “Shotgun” tem sido extensivamente utilizada, não apenas para identificação, mas também para a quantificação de proteínas (Matallana-Surget et al., 2010).

No ano de 2004, foi desenvolvida uma técnica de identificação de proteínas para quantificação sem a utilização de géis, técnica baseada em marcação isotópica, que recebeu o nome de iTRAQ (Marcadores isobáricos para quantificação relativa e absoluta). O iTRAQ é o resultado da combinação de cromatografia líquida multi-dimensional, seguida de análise por espectrometria de massa. É eficiente porque analisa muitas amostras em uma única corrida, não necessitando de géis que podem causar a perda de moléculas de tamanho pequeno (<10 kDa) ou grande (>200 kDa) (Ross et al., 2004).

Análises proteômicas que utilizam iTRAQ possuem a vantagem de reduzir os “vieses” analíticos da técnica, causadas pelas diferentes hidrofobicidades, abundância, ou ponto isoelétrico, além de aumentar a sensibilidade e a acurácia (Qin et al., 2013).

Na espécie *Zea mays* L., especificamente para o milho comum, foram conduzidos estudos relacionados à embriogênese (Lee et al., 2002; Vernoud et al., 2005,) inclusive utilizando a proteômica, especificamente com a eletroforese bi-dimensional (2-DE) e identificadas por espectrometria de massas (Maldi-TOF-TOF) (Wang et al., 2014), que se destaca por ser técnica menos eficiente que a “Shotgun” com iTRAQ. Com base nessas análises, foi possível verificar 110 spots de proteínas, nos quais foi possível identificar 104 proteínas, das quais 41% foram associadas com proteínas de reserva, 25% envolvida com a função de defesa e 15% associadas ao metabolismo. As demais proteínas não tiveram função identificada pela ferramentas de busca utilizadas. Por outro lado, para o milho pipoca, que também pertence à espécie *Zea mays*, mas é classificado como um tipo especial de milho por apresentar diferenças morfológicas distintas do milho comum, como por exemplo, sementes pequenas e duras que possuem a capacidade de estourar quando aquecidas a aproximadamente 180° C (Sawazaki, 2001), não foi realizado nenhum trabalho que descreva a embriogênese e nem se há diferença nesse processo quando se compara linhagens com diferentes capacidades de expansão.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo sobre a expressão diferencial de proteínas na embriogênese de duas linhagens de milho pipoca, uma com elevada capacidade de expansão e outra com baixa capacidade de expansão por meio da abordagem proteômica "Shotgun", utilizando marcação isobárica – iTRAQ, no 15<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> dias após a polinização.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal**

As linhagens P11 e P16 de milho pipoca que apresentam elevada e baixa capacidade de expansão, respectivamente, e que estavam na oitava geração de autofecundação (S8), foram semeadas na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente à Universidade Estadual de Maringá (UEM), na última semana do mês de outubro de 2012. A multiplicação das sementes foi realizada em campo experimental, composto por parcelas contendo quatro linhas, sendo duas para cada linhagem, cada uma com 10 m de comprimento, com espaçamento de 0,90 m entre fileiras e 0,20 m entre plantas. Os tratos culturais foram realizados para a cultura, conforme o recomendado por Sawazaki (2001).

As linhagens foram autofecundadas na última semana de dezembro de 2012, por meio da cobertura dos pendões maduros com saco de papel tipo "kraft". O pólen foi utilizado para o encobrimento da espiga da mesma planta.

No 15<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> dias após a polinização (15<sup>o</sup> DAP, 25<sup>o</sup> DAP), três espigas de cada tratamento foram coletadas e levadas ao laboratório de Genômica e Expressão, localizado no Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri), UEM. As sementes de cada espiga foram excisadas e separadas em endosperma, embrião e pericarpo. Ao mesmo tempo em que o processamento decorria, os embriões foram congelados em nitrogênio líquido e, subsequentemente, armazenado em ultrafreezer -90°C.

### **2.2. Preparo das amostras**

O preparo das amostras ocorreu inicialmente no Laboratório de Genômica e Expressão (LaGEx), Nupagri, UEM. A extração de proteínas das amostras foi realizada utilizando a metodologia descrita por Chen et al. (2002). Inicialmente, 300 mg de embriões frescos foram pesados e acondicionados em almofarizes para que se procedesse a maceração. As amostras então foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó. Em seguida, foi adicionado o tampão de extração, constituído por 0,25 M de NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 14 mM beta-mercaptoetanol e inibidor de proteases 0,07% Pefabloc® (Sigma).

As amostras foram transferidas para tubo falcon, com capacidade de 15 mL, e homogeneizadas com o auxílio de um vórtex por 10 minutos a 4°C, seguindo-se centrifugação a 35.000 g, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos falcon de 15 mL e precipitado com acetona gelada (2,5 X). Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e armazenadas em ultrafreezer -90°C.

A continuidade do procedimento para análise proteômica das amostras ocorreu no Laboratório de Química de Proteínas, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A ressuspensão das amostras foi realizada utilizando uma solução, contendo uréia 7 M e tiouréia 2 M. A quantificação foi conduzida utilizando-se o método fluorimétrico Qubit® Fluorometer 2.0 (Invitrogen). Após diluição (1:10) em tampão bicarbonato de trietilamônio (TEAB) 200 mM, as amostras foram reduzidas com ditioneína (DTT) 10 mM, durante 1 hora, na temperatura de 25°C e, posteriormente, alquiladas com iodoacetamida (IAA) 40 mM em temperatura ambiente no escuro.

As proteínas foram submetidas à reação de digestão, utilizando-se tripsina 1:50 (Promega) e a interrupção da reação foi conduzida por meio da adição de ácido fórmico em concentração final de 1%. A limpeza e purificação das amostras foram realizadas utilizando-se Macro Spin Columns™ C-18 (Harvard Apparatus). As colunas foram ativadas mediante adição de acetonitrila 100% (ACN), seguindo um período de equilíbrio com ácido trifluoroacético 0,1% (TFA). As amostras foram aplicadas em suas colunas específicas, lavadas e eluídas em duas fases. A primeira eluição foi realizada utilizando uma solução de acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 0,1%. Posteriormente, soluções de acetonitrila 70% e ácido trifluoroacético 0,1% foram utilizadas para realizar a segunda eluição. Em ambas as eluições, os peptídeos foram coletados em um mesmo tubo plástico.

Após digestão e limpeza, os peptídeos foram secos e, na sequência, ressuspensos em tampão TEAB 50 mM. Uma quantificação dos peptídeos foi realizada com intuito de alíquotar 25 µg de peptídeos de cada amostra, que foram utilizadas na próxima fase do experimento.

### **2.3. Marcação dos peptídeos com isóbaros**

A marcação isobárica dos peptídeos foi realizada utilizando-se iTRAQ® (Quantificação isobárica para quantificação relativa e absoluta - Sciex) 4 plex. Para

tanto, as amostras contendo 25 µg de peptídeos foram organizadas, de modo que ocorresse o agrupamento de amostras de embrião e suas respectivas épocas de coleta após a polinização das duas linhagens avaliadas. Assim, peptídeos da linhagem P11<sub>15ºDAP</sub> foram marcados pelo íon repórter de massa 114,1 Da, peptídeos da linhagem P11<sub>25ºDAP</sub> foram marcados pelo íon repórter de 115,1 Da e peptídeos da linhagem P16<sub>15ºDAP</sub> e P16<sub>25ºDAP</sub> foram marcados pelos íons repórteres de 116,1 Da e 117,1 Da, respectivamente.

O preparo das marcações (114; 115; 116 e 117) foi realizado pela adição de 95 µL de etanol gelado. Posteriormente, foram adicionados 30 µL de cada marcação nas suas respectivas amostras. Após agitação em vórtex e *spin* em centrífuga, as amostras foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente.

O término da marcação se deu pela adição de 35 µL de tampão TEAB 50 mM. Subsequente a isso, as amostras foram agrupadas para formar os Grupos 1, 2 e 3, denominados por G1, G2 e G3 (Quadro 1). Ao término deste procedimento, as amostras foram concentradas em Speed-Vac até volume final de 5 µL.

Quadro 1 – Agrupamento das amostras de embrião das linhagens P11 e P16 de milho pipoca, nas duas épocas de coleta (15º e 25º DAP – dias após a polinização), para análise do proteoma quantitativo utilizando-se a técnica de marcadores isobáricos iTRAQ®

Replicata biológica	Marcadores Isobáricos			
	114	115	116	117
G1	P11 (15)	P11 (25)	P16 (15)	P16 (25)
G2	P11 (15)	P11 (25)	P16 (15)	P16 (25)
G3	P11 (15)	P11 (25)	P16 (15)	P16 (25)

#### 2.4. Limpeza e pré-fracionamento das amostras após marcação isobárica

As amostras marcadas com os isóbaros foram pré-fracionadas, utilizando-se uma Macro SpinColumn™ de troca catiônica (“strong cation exchange” - SCE) Harvard Apparatus. Posteriormente, foram ressuspensas em solução diluente de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM + ACN 25% (pH 3, ajustado com ácido fosfórico). A hidratação das colunas foi realizada com a solução diluente, por 10 minutos, em temperatura ambiente, seguindo com centrifugação a 100 rpm, por três minutos, repetindo esse passo de hidratação mais uma vez.



A troca catiônica iniciou-se a partir da adição da amostra na coluna, procedendo-se à incubação por 10 minutos, em temperatura ambiente, e posterior centrifugação a 100 rpm por três minutos. O conteúdo que passou pela coluna foi coletado e novamente aplicado na mesma coluna. Após centrifugação, o conteúdo que passou pela coluna foi coletado e transferido para um novo tubo e designado por “Flow-Through” (FT).

A solução diluente foi aplicada às colunas e o conteúdo foi armazenado no tubo FT. O primeiro fracionamento foi realizado pela adição de 300 µL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM + ACN 25% + KCl 100 mM na SpinColumn. Após a centrifugação a 100 rpm por três minutos, o conteúdo foi coletado e armazenado em novo tubo (designado “100”). Na segunda etapa de fracionamento, adicionou-se 300 µL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM + ACN 25% + KCl 250 mM na SpinColumn. O conteúdo foi coletado e armazenado em novo tubo (designado “250”), após centrifugação a 100 rpm por três minutos. A terceira etapa de fracionamento ocorreu pela adição de 300 µL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM + ACN 25% + KCl 500 mM na SpinColumn. O centrifugado, obtido a 100 rpm por três minutos, foi coletado e armazenado em novo tubo (designado “500”). Na sequência, todas as amostras (FT, “100”, “250” e “500”) foram concentradas em Speed-Vac.

A limpeza dos sais residuais do processo da troca catiônica foi realizada mediante utilização de Macro Spin Columns™ C-18 (Harvard Apparatus). A ativação das colunas foi conduzida mediante utilização de acetonitrila 100% (ACN), seguido período de equilíbrio com ácido trifluoroacético 0,1% (TFA). Um volume de 300 µL de cada amostra foi aplicado em suas colunas específicas, lavadas e eluídas em duas fases. A primeira eluição ocorreu utilizando-se solução de acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 0,1%. Posteriormente, soluções de acetonitrila 70% e ácido trifluoroacético 0,1% foram utilizadas para realizar a segunda eluição. Decorrido o processo de dessalinização, todas as amostras foram concentradas utilizando-se Speed-Vac.

## **2.5. Espectrometria de massa**

As amostras concentradas e contendo a mistura de peptídeos marcados e fracionados foram dissolvidas em 20 µL de ácido fórmico 0,1% e 1 µg destes peptídeos foi carregado numa pré-coluna C18 de fase reversa (2 cm de comprimento, 100 µm diâmetro interno), tendo como resina ReproSil-Pur C<sub>18</sub>-AQ 3

µm. Posteriormente, os peptídeos foram focalizados em uma coluna PicoFrit Self-Pack (18 cm de comprimento, 75 µm de diâmetro interno – New Objective), empacotada com o mesmo material.

As amostras foram analisadas em um sistema de EASY-nano LC (Proxeon Biosystems) acoplado em sequência a um espectrômetro de massa de alta resolução ESI-LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Os peptídeos foram eluídos, usando um gradiente que partiu de 100% fase A (0,1% de ácido fórmico, 5% de acetonitrila) até 35% da fase B (0,1% de ácido fórmico, 95% de acetonitrila), por 120 minutos, 35 – 100% da fase B por cinco minutos e 100% da fase B por oito minutos, totalizando 133 minutos, em um fluxo de aproximadamente 250 nL min<sup>-1</sup>. Após cada corrida, a coluna foi lavada com 90% da fase B e reequilibrada com a fase A. Os espectros m/z (massa/carga) foram obtidos em modo positivo com aquisição automática dado-dependente (DDA – “Data Dependente Acquisition”) dos espectros de MS (espectrometria de massa) e MS/MS (espectrometria de massas seguida de espectrometria de massas - Tandem mass spectrometry).

Os espectros de MS foram obtidos em alta resolução no analisador Orbitrap com resolução de 60.000 para 400 m/z, faixa de massa de 400 – 1800 m/z, Automatic Gain Control (AGC) de 1x10<sup>6</sup> e máximo de tempo de injeção de 500 ms. Os espectros de MS/MS foram adquiridos por HCD (“Higher energy collisional dissociation”) em alta resolução no Orbitrap para os 10 íons mais intensos, com carga ≥ 2, resolução de 7500 para 400 m/z, limite de sinal de 30.000, energia normalizada de colisão de 40 e exclusão dinâmica de 30 s.

Uma solução de amônia a 5% contida em um falcon de 15 mL com a tampa aberta foi colocado próximo a região do Eletrospray (agulha) para evitar o efeito de aumento de carga iônica ocasionado pelo iTRAQ – 4plex, fenômeno este já previamente descrito por Thingholm et al. (2010) e Nogueira et al. (2013).

## **2.6. Análise dos dados**

Os arquivos RAW foram visualizados no software Xcalibur v.2.1 (Thermo Scientific) e o processamento dos dados foi realizado por meio do software Proteome Discoverer v.1.4. O banco de dados de *Zea mays* L. foi obtido a partir do UniProt (Fonte Universal de Proteínas), baixado em janeiro de 2014, apresentando 62.975 entradas.

As pesquisas foram realizadas com os seguintes parâmetros: acurácia do MS de 10 ppm, acurácia do MS/MS de 0,1 Da para HCD, digestão com tripsina com 2 clivagens permitidas, modificação fixa de carbamidometilação na cisteína, modificações variáveis de oxidação da metionina e causada pela marcação isobárica do iTRAQ-4plex (massa monoisotópica – 144,102) nos aminoácidos de lisina e regiões N-terminais.

O número de proteínas, grupos de proteínas e o número de peptídeos, assim como os valores quantitativos de cada marcador foram estimados, utilizando o software Proteome Discovery. A taxa de “false Discovery” de 1% e um “peptide rank” de 1 foram aplicados como limites de cortes.

O experimento consistiu em um total de 36 corridas no espectrômetro de massa, oriundas de três replicatas biológicas (G1, G2 e G3), quatro etapas de fracionamento (100, 250, 500 e FT) e três replicatas experimentais (corridas no espectrômetro de massa).

A análise das proteínas com expressão diferencial entre as diferentes comparações de tratamentos foi inicialmente realizada por meio da confecção dos Diagramas de Venn e isso foi possível mediante utilização do aplicativo Venny (Oliveros, 2007), disponível em <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>.

A classificação para função biológica foi realizada pelas anotações do Gene Ontology disponível em AgBase versão 2.0 Mississippi State University (<http://agbase.msstate.edu>), utilizando-se o banco de dado de *Zea mays*, com última atualização em 16 de maio de 2014, e o número de identificação do Uniprot para a realização das buscas para cada proteína identificada (McCarthy et al., 2011). A análise das vias metabólicas à qual cada proteína pertence foi realizada utilizando-se o recurso Search & Color Pathways utilizando o KEGG Mapper (Kyoto Encyclopedia de Genes e Genomas) ([http://www.genome.jp/kegg/tool/map\\_pathway2.html](http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html)) (Kanehisa et al., 2012).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi possível identificar um número de 3.241 proteínas, correspondentes a 917.520 “peptide spectrum matches” (PSM), e a 223.142 peptídeos, mediante análise conjunta das três replicatas biológicas de embrião, utilizando o algoritmo Sequest do software Proteome Discovery.

A mesma análise foi realizada utilizando-se filtros de busca no software Proteome Discovery. Foram utilizados dois filtros para peptídeos, são eles: confiança do peptídeo/confiança mínima – elevada e ranqueamento do peptídeo/ranqueamento máximo – 1<sup>a</sup>; e três filtros para proteínas, sendo: número mínimo de peptídeos – 2, contabilizar apenas o primeiro peptídeo do ranqueamento e contabilizar apenas peptídeo na proteína de maior score.

Identificou-se a presença de 1.189 proteínas altamente confiáveis, correspondentes a 90.519 PSM (“peptide spectrum matches”) e a 8.105 peptídeos. Desse total de proteínas (1.189), 83,85% corresponderam a 997 proteínas que apresentaram ponto isoelétrico entre 4 e 9. Considerando as 1.189 proteínas identificadas nos embriões das linhagens de milho pipoca P11 e P16 coletados em duas épocas diferentes (15<sup>o</sup> ou 25<sup>o</sup> DAP), o foco foi para o estudo das proteínas com expressão diferencial dentro das diferentes comparações estabelecidas pelo uso do marcador isobárico Itraq. As diferentes intensidades dos picos para cada íon repórter foram utilizadas para comparar quantitativamente a expressão diferencial dos tratamentos: P11<sub>15<sup>o</sup>DAP</sub>, P11<sub>25<sup>o</sup>DAP</sub>, P16<sub>15<sup>o</sup>DAP</sub> e P16<sub>25<sup>o</sup>DAP</sub>, que corresponderam, respectivamente, às marcações 114, 115, 116 e 117.

Com o objetivo de avaliar as proteínas diferentemente expressas entre as linhagens de milho pipoca nas diferentes épocas de coleta e que refletiam o processo de embriogênese, optou-se pela confecção de Diagramas de Venn.

A confecção dos diagramas foi baseada no critério de escolha das proteínas com expressão diferencial superior a 1,5x ou inferior a 1,5x ao se comparar dois tratamentos quaisquer, conforme Huang et al. (2002). Na análise das proteínas que apresentaram expressão superior a 1,5x ou inferior a 1,5x, foi possível identificar 172 proteínas que tiveram a expressão diminuída (“down-regulated” – Figura 1A) e 87 proteínas com aumento na expressão (“up-regulated” - Figura 1B).

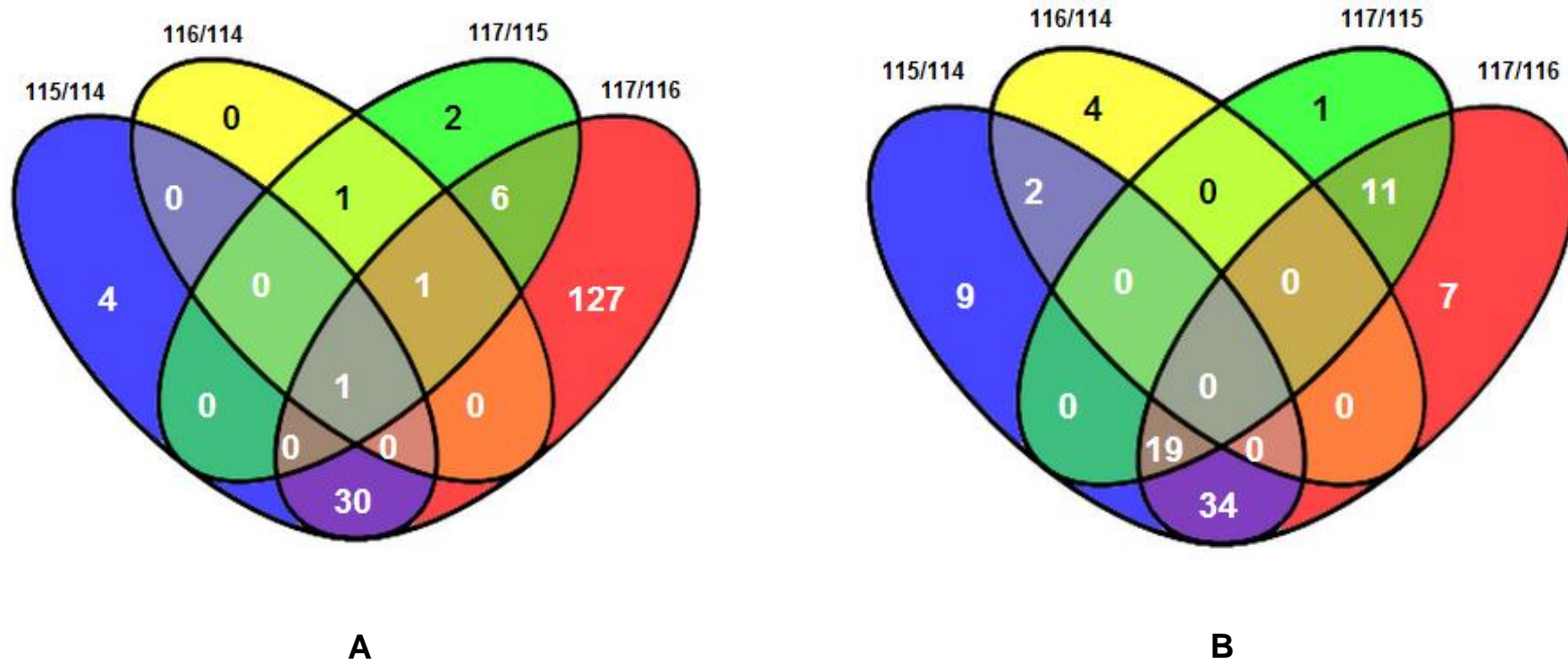


Figura 1 – Diagramas de Venn, evidenciando proteínas que tiveram expressão diminuída (A) e aumentada (B) nas diferentes combinações de tratamentos: 114 (P11<sub>15</sub><sup>o</sup>DAP), 115 (P11<sub>25</sub><sup>o</sup>DAP), 116 (P16<sub>15</sub><sup>o</sup>DAP), 117 (P16<sub>25</sub><sup>o</sup>DAP).

### 3.1. Proteínas expressas de forma diferenciada exclusivamente na linhagem P11

A linhagem P11, como descrito anteriormente, apresenta elevada capacidade de expansão. Nessa linhagem, quatro proteínas tiveram exclusivamente sua expressão diminuída (“down-regulated”) e nove apresentaram expressão aumentada (“up-regulated”) do 15º para o 25º DAP (Quadro 2).

Quadro 2 – Proteínas que tiveram a expressão diminuída (“down-regulated”) e aumentada (“up-regulated”) na linhagem P11 durante a embriogênese (do 15º ao 25º DAP)

Expressão	ID*	Proteína
“Down-regulated”	B4FW18	<i>Protein estrutural ribosomal 40S-S28</i>
	B6SLX1	<i>Chaperonin</i>
	B4FE30	<i>Chaperonin</i>
	B8A1N1	<i>Uncharacterized protein</i>
“Up-regulated”	B4F7S2	<i>Jasmonate-induced protein</i>
	A8WES1	<i>ZCN9</i>
	B6TJ78	<i>3-N-debenzoyl-2-deoxytanol, N-benzoyltransferase</i>
	B4GOT5	<i>Putative aminotransferase class III superfamily protein</i>
	K7TSUB	<i>Putative aminotransferase class III superfamily protein</i>
	K7W482	<i>Putative serine peptidase S28 family protein</i>
	B6TG62	<i>Caffeic acid 3-O-methyltransferase</i>
	B4FUH2	<i>Aspartate aminotransferase</i>
	B6TD54	<i>ATP – citrate synthase</i>

\*ID = “identification” - número de identificação.

Na análise funcional das quatro proteínas que tiveram sua expressão diminuída, três estão envolvidas no metabolismo de proteínas. A *ribosomal 40S-S28* é uma proteína estrutural da subunidade menor do ribossomo, sítio ativo da síntese protéica, e as *chaperonin* estão envolvidas com o enovelamento de proteínas. Quanto à *uncharacterized protein* foram realizadas pesquisas nos bancos de dados utilizando o Blaste e foi possível constatar que essa proteína apresentou 99,61% de identidade com a *stress-related protein* (ID: B6TQG2) de *Z. mays*. O alinhamento

das sequências de aminoácidos revelou a diferença em apenas um aminoácido dos 259 existentes nessa proteína (Figura 2), permitindo inferir que essa proteína está relacionada à resposta ao estresse.

1	MAEEQSNPQHQQAEEREVMVEQQQPRRAPKLRYLDFVQVAAAQAAVCLAGLYGLAKDHAG	60	B8A1N1	B8A1N1_MAIZE
1	MAEEQSNPQHQQAEEREVMVEQQQPRRAPKLRYLDFVQVAAAQAAVCLAGLYGLAKDHAG	60	B6TQG2	B6TQG2_MAIZE
*****				
61	PLRPSVDAVESAVKGVVSPVYDRFGGLPLDVLAFVDRKVDVTVEVDKHLPGALKAAASAH	120	B8A1N1	B8A1N1_MAIZE
61	PLRPSVDAVESAVNGVVSPVYDRFGGLPLDVLAFVDRKVDVTVEVDKHLPGALKAAASAH	120	B6TQG2	B6TQG2_MAIZE
*****				
121	VYAVVRGVPEVARELAAEAQRSGVIRGAARAALAMTEPVARDVYGRVEPVAKDLYVRYEPA	180	B8A1N1	B8A1N1_MAIZE
121	VYAVVRGVPEVARELAAEAQRSGVIRGAARAALAMTEPVARDVYGRVEPVAKDLYVRYEPA	180	B6TQG2	B6TQG2_MAIZE
*****				
181	AEHLAVSAWRSINGLPVFPHVAEIVVPTAAHWADKYNRAVAAAAEHGYAGAKYLPPIPTTE	240	B8A1N1	B8A1N1_MAIZE
181	AEHLAVSAWRSINGLPVFPHVAEIVVPTAAHWADKYNRAVAAAAEHGYAGAKYLPPIPTTE	240	B6TQG2	B6TQG2_MAIZE
*****				
241	RIAKVFSSAPEAEPLAEGQ	259	B8A1N1	B8A1N1_MAIZE
241	RIAKVFSSAPEAEPLAEGQ	259	B6TQG2	B6TQG2_MAIZE
*****				

Figura 2 – Alinhamento entre a *uncharacterized protein* (ID: B8A1N1) e a *stress-related protein* (ID: B6TQG2) evidenciando 99,61% de identidade.

A redução na expressão da proteína *ribosomal 40S-S28* e de duas *chaperonin* no decorrer da embriogênese evidencia uma diminuição no metabolismo de proteínas, desde sua síntese até seu processamento (enovelamento). Assim, observa-se que a linhagem P11, de elevada capacidade de expansão, não apresentou o mesmo padrão de expressão quando comparado ao processo de embriogênese em milho comum para os mesmos períodos de coleta (Vernoud et al., 2005).

Na análise funcional das nove proteínas que tiveram a atividade aumentada exclusivamente na linhagem P11, constatou-se que duas (*jasmonate-induced protein* e *ZCN9*) ainda não possuem anotação funcional definida, mesmo após pesquisa realizada em bancos de dados como o Blast.

A proteína *3-N-debenzoyl-2-deoxytaxol N-benzoyltransferase* possui atividade de transferase, participando de processos metabólicos gerais, assim como as duas *putative aminotransferase class III superfamily protein*, sendo que a *aminotransferase* (ID:K7TSUB) também possui atividade de transaminase.

A *putative serine peptidase S28 family protein* apresenta atividade de peptidase a um tipo de serina e a proteína *caffeic acid 3-O-methyltransferase* tem atividade de metiltransferase, além de participar de processos biológicos de metilação. Por fim, duas importantes proteínas atuantes em diferentes vias

metabólicas foram encontradas. A *aspartate aminotransferase*, que participa das vias metabólicas de aminoácidos, biossíntese de metabólitos secundários (isoquilonila e tropanos) e fixação de carbono em organismos fotossintetizantes, e a proteína *ATP-citrate synthase*, que participa da via metabólica do ciclo do ácido cítrico e biossíntese de metabólitos secundários.

O aumento na expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo do ácido cítrico e metabólitos secundários (*ATP-citrate synthase*, *aspartate aminotrasferase*) evidencia novamente que a linhagem P11 apresenta o processo de embriogênese ocorrendo precocemente quando comparado a embriogênese em milho comum (Lee et al., 2002)

### 3.2. Proteínas expressas diferencialmente exclusivamente na linhagem P16

A linhagem P16 de baixa capacidade de expansão, diferentemente da linhagem P11, apresentou um maior número de proteínas com expressão diminuída, 127 no total (Quadro 3) e, sete proteínas com expressão aumentada (Quadro 4) exclusivamente nessa linhagem.

Quadro 3 – Proteínas que tiveram a expressão diminuída (“down-regulated”) exclusivamente na linhagem P16 durante a embriogênese (do 15<sup>o</sup> ao 25<sup>o</sup> DAP)

Acesso ID*	Descrição	Relação média (117/116)
B6TL59	<i>3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase</i>	0,575 ± 0,014
B6T8A3	<i>3-oxoacyl-reductase</i>	0,464 ± 0,047
B6UF55	<i>5-methyltetrahydropteroyltriglutamate</i>	0,603 ± 0,009
B4FHI7	<i>60S ribosomal protein L38</i>	0,413 ± 0,081
B6SIY6	<i>60S ribosomal protein L44</i>	0,529 ± 0,078
B4F9B2	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 1</i>	0,373 ± 0,123
Q41765	<i>Acyl carrier protein</i>	0,351 ± 0,062
B4FFE7	<i>Acyl carrier protein</i>	0,312 ± 0,030
Q9XGC6	<i>Adenosine kinase (Fragment)</i>	0,572 ± 0,055
B6T440	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	0,533 ± 0,029
B4FAV4	<i>Argininosuccinate lyase</i>	0,614 ± 0,022
B6T9J4	<i>Aspartate aminotransferase</i>	0,589 ± 0,028
B6SVV9	<i>ATP synthase subunit beta</i>	0,611 ± 0,049
Q43712	<i>Calcium-binding protein</i>	0,547 ± 0,064
B4FBW7	<i>Calmodulin</i>	0,565 ± 0,041
B6TPA4	<i>Carnitine racemase/ catalytic</i>	0,633 ± 0,003



Quadro 3, cont.

B4FN43	<i>Catalytic/ hydrolase isoform 1</i>	0,565 ± 0,022
B4FUK9	<i>COP9 signalosome complex subunit 5b</i>	0,489 ± 0,021
B4FU01	<i>Cystathionine gamma-synthase</i>	0,524 ± 0,034
B4G1C9	<i>Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex</i>	0,477 ± 0,030
B6TCA9	<i>Diphosphomevalonate decarboxylase</i>	0,578 ± 0,050
Q43704	<i>DNA replication licensing factor MCM3 homolog 1</i>	0,420 ± 0,062
P26301	<i>Enolase 1</i>	0,508 ± 0,030
C0P790	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B</i>	0,594 ± 0,027
B6SP06	<i>Glycine-rich protein 2b</i>	0,403 ± 0,033
B6SP74	<i>Glycine-rich RNA-binding protein 2</i>	0,585 ± 0,008
P10979	<i>Glycine-rich RNA-binding, abscisic acid-inducible</i>	0,437 ± 0,082
Q5EBY7	<i>Heat shock protein 70 (Fragment)</i>	0,554 ± 0,050
Q9FYS5	<i>High mobility group I/Y-2</i>	0,537 ± 0,023
B4FN97	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP]</i>	0,515 ± 0,020
B4FLJ3	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP]</i>	0,545 ± 0,009
B4G249	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP]</i>	0,551 ± 0,009
Q71RX2	<i>Isopentenyl pyrophosphate isomerase</i>	0,371 ± 0,045
B4FX16	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>	0,602 ± 0,029
B4FZU8	<i>Malate dehydrogenase</i>	0,563 ± 0,011
B6SLL8	<i>Malate dehydrogenase</i>	0,396 ± 0,081
B4FVH1	<i>Malate dehydrogenase</i>	0,556 ± 0,009
B6TGF1	<i>Malate dehydrogenase</i>	0,557 ± 0,010
B4FRJ1	<i>Malate dehydrogenase</i>	0,573 ± 0,010
Q08062	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	0,407 ± 0,040
Q8L8G5	<i>Nucleosome/chromatin assembly factor group A</i>	0,577 ± 0,056
Q8L8G4	<i>Nucleosome/chromatin assembly factor group C</i>	0,614 ± 0,022
B4FT80	<i>OB-fold nucleic acid binding domain containing protein</i>	0,489 ± 0,103
B4FSC5	<i>OB-fold nucleic acid binding domain containing protein</i>	0,552 ± 0,044
B6SHT0	<i>OB-fold nucleic acid binding domain containing protein</i>	0,605 ± 0,035
B4FZZ2	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>	0,517 ± 0,009
B4G0K4	<i>Phosphoglycerate kinase</i>	0,598 ± 0,033
Q84JX6	<i>Phosphoglycerate kinase (Fragment)</i>	0,603 ± 0,030
C0P567	<i>Ppi-phosphofructokinase</i>	0,597 ± 0,028
Q43266	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	0,586 ± 0,016
B4FAR8	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	0,568 ± 0,032
B6TJB6	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	0,576 ± 0,021
B6TGF0	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	0,578 ± 0,013
B6TAJ3	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	0,615 ± 0,003
B6UFQ0	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	0,558 ± 0,032
B6T504	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	0,591 ± 0,019
B4FCX3	<i>Proteasome subunit beta type</i>	0,513 ± 0,144
K7VEK3	<i>Proteasome subunit beta type</i>	0,519 ± 0,082

Quadro 3, cont.

B4FN21	<i>Proteasome subunit beta type</i>	0,528 ± 0,107
B4FRQ7	<i>Proteasome subunit beta type</i>	0,564 ± 0,039
B4FH61	<i>Protein transporter</i>	0,462 ± 0,100
B6SR40	<i>Putative uncharacterized protein</i>	0,477 ± 0,022
B4FQM2	<i>Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase beta subunit</i>	0,601 ± 0,026
B6T565	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta</i>	0,357 ± 0,022
B6TQ36	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta</i>	0,377 ± 0,025
B6T6H3	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta</i>	0,603 ± 0,043
B4FS78	<i>Pyruvate kinase</i>	0,477 ± 0,027
B4FYH2	<i>Pyruvate kinase</i>	0,509 ± 0,030
B6T5R1	<i>Ran-binding protein 1</i>	0,475 ± 0,091
B6TQ25	<i>RNA-binding protein-like</i>	0,588 ± 0,029
B4FAD1	<i>S-adenosylmethionine synthase</i>	0,438 ± 0,064
B6UAE3	<i>Small nuclear ribonucleoprotein E</i>	0,521 ± 0,042
B4FP70	<i>Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein</i>	0,218 ± 0,068
B4FQW0	<i>Stem-specific protein TSJT1</i>	0,541 ± 0,013
B6T428	<i>Succinyl-CoA ligase alpha-chain 2</i>	0,550 ± 0,042
B4FRH5	<i>Succinyl-CoA ligase beta-chain</i>	0,561 ± 0,019
B6TS21	<i>Succinyl-CoA ligase beta-chain</i>	0,577 ± 0,024
C0P6F8	<i>Sucrose synthase</i>	0,340 ± 0,018
B6U1D7	<i>Sucrose synthase</i>	0,375 ± 0,009
Q7SIC9	<i>Transketolase, chloroplastic</i>	0,471 ± 0,016
B6T773	<i>Tryptophanyl-tRNA synthetase</i>	0,506 ± 0,027
B6TS72	<i>U2 small nuclear ribonucleoprotein A</i>	0,599 ± 0,019
B4FSN1	<i>Uncharacterized protein</i>	0,316 ± 0,036
C0HFI8	<i>Uncharacterized protein</i>	0,425 ± 0,022
B4F938	<i>Uncharacterized protein</i>	0,431 ± 0,025
B4FWQ0	<i>Uncharacterized protein</i>	0,441 ± 0,030
C0P972	<i>Uncharacterized protein</i>	0,443 ± 0,034
C0PFQ7	<i>Uncharacterized protein</i>	0,444 ± 0,065
B4FBC2	<i>Uncharacterized protein</i>	0,451 ± 0,009
C0HJ53	<i>Uncharacterized protein</i>	0,464 ± 0,014
C0P3K4	<i>Uncharacterized protein</i>	0,482 ± 0,047
C0P820	<i>Uncharacterized protein</i>	0,484 ± 0,024
B4F7Y3	<i>Uncharacterized protein</i>	0,538 ± 0,011
K7V645	<i>Uncharacterized protein</i>	0,539 ± 0,026
B4FS03	<i>Uncharacterized protein</i>	0,558 ± 0,049
C4J4W3	<i>Uncharacterized protein</i>	0,575 ± 0,020
B4FVU6	<i>Uncharacterized protein</i>	0,588 ± 0,037
C0HHC1	<i>Uncharacterized protein</i>	0,591 ± 0,022
B4FL79	<i>Uncharacterized protein</i>	0,594 ± 0,036
K7UF17	<i>Uncharacterized protein</i>	0,594 ± 0,012
C0PBL7	<i>Uncharacterized protein</i>	0,603 ± 0,018

Quadro 3, cont.

B8A334	<i>Uncharacterized protein</i>	0,609 ± 0,009
C0P5Y3	<i>Uncharacterized protein</i>	0,613 ± 0,012
K7UDG5	<i>Uncharacterized protein</i>	0,628 ± 0,009
C4J757	<i>Uncharacterized protein</i>	0,367 ± 0,040
B4F8B8	<i>Uncharacterized protein</i>	0,379 ± 0,028
B4FAA3	<i>Uncharacterized protein</i>	0,415 ± 0,066
B7ZY87	<i>Uncharacterized protein</i>	0,434 ± 0,109
B8A348	<i>Uncharacterized protein</i>	0,472 ± 0,029
K7UW74	<i>Uncharacterized protein</i>	0,481 ± 0,010
B4F8M8	<i>Uncharacterized protein</i>	0,492 ± 0,096
B4FFF1	<i>Uncharacterized protein</i>	0,496 ± 0,092
B7ZZ42	<i>Uncharacterized protein</i>	0,511 ± 0,035
B4FTD4	<i>Uncharacterized protein</i>	0,536 ± 0,094
K7VYD0	<i>Uncharacterized protein</i>	0,564 ± 0,061
C0PA91	<i>Uncharacterized protein</i>	0,574 ± 0,036
B4FQQ1	<i>Uncharacterized protein</i>	0,579 ± 0,020
C4J9Y2	<i>Uncharacterized protein</i>	0,593 ± 0,012
B4FQT3	<i>Uncharacterized protein</i>	0,594 ± 0,030
K7VW90	<i>Uncharacterized protein</i>	0,598 ± 0,021
C0PM74	<i>Uncharacterized protein</i>	0,603 ± 0,048
K7WDQ7	<i>Uncharacterized protein</i>	0,605 ± 0,022
B4FSE0	<i>Uncharacterized protein</i>	0,606 ± 0,027
C0P558	<i>Uncharacterized protein</i>	0,609 ± 0,020
C4J093	<i>Uncharacterized protein</i>	0,625 ± 0,025
C4J040	<i>Uncharacterized protein</i>	0,523 ± 0,063
B6UH55	<i>Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A</i>	0,592 ± 0,021

\*ID - "identification" - número de identificação; 116 – P16<sub>15°DAP</sub>; 117 – P16<sub>25°DAP</sub>.

As 127 proteínas tiveram suas funções anotadas no GO e um resumo se encontra disponibilizado na Figura 3. Inicialmente, foram identificadas 41 diferentes funções, as quais foram agrupadas em 24 grandes categorias funcionais.

Os percentuais mais expressivos foram encontrados para proteínas cuja função está associada ao metabolismo geral, com 72 proteínas agrupadas nessa categoria, o que corresponde a 34,6%. Vinte proteínas (9,6%) estão associadas à resposta a estímulos, 15 (7,2%) não tiveram função identificada, 12 (5,8%) estão associadas a processos de oxirredução e 11 proteínas (5,3%) foram associadas a respostas a estresse.

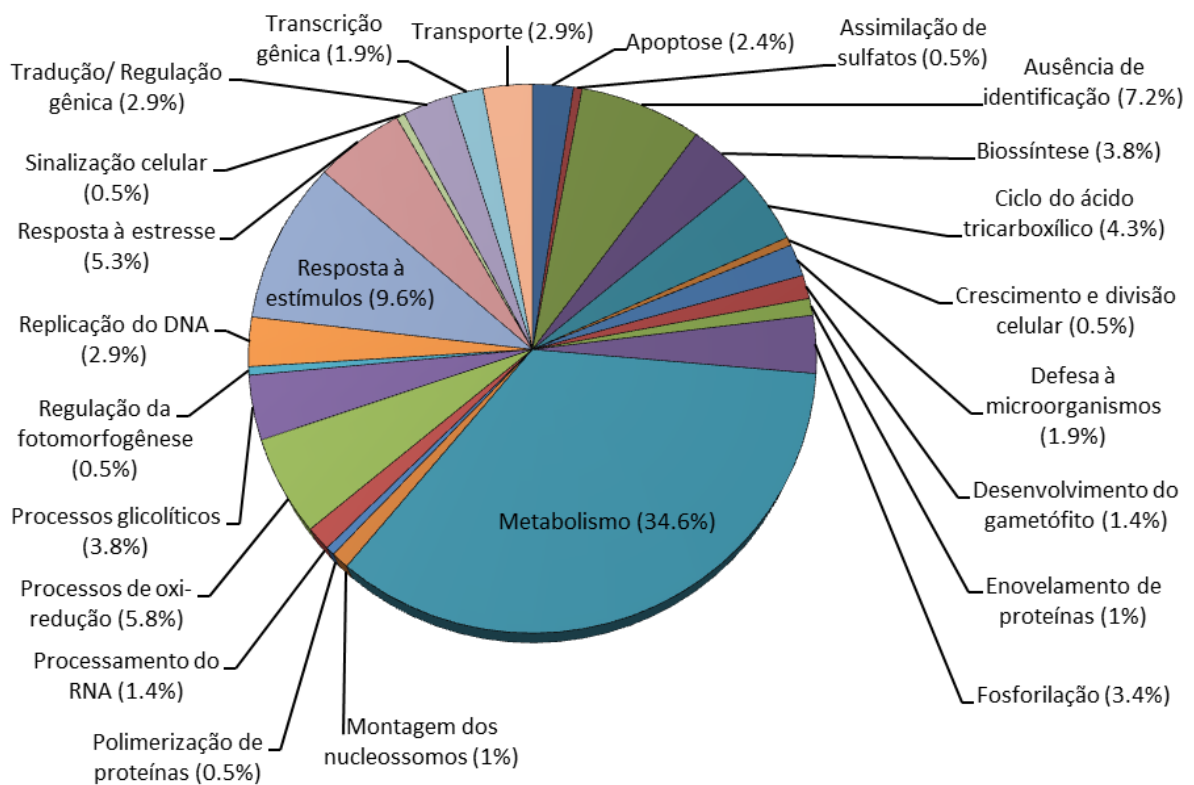


Figura 3 – Funções das 127 proteínas que reduziram a expressão nos embriões das sementes de milho pipoca da linhagem P16 durante a embriogênese (do 15<sup>o</sup> para o 25<sup>o</sup> DAP). As funções foram anotadas pelo GO.

Nas proteínas que tiveram redução na expressão e estão relacionadas ao metabolismo (72 proteínas), 29 correspondem ao metabolismo em geral, sem indicação a qual metabolismo pertencem, 16 estão relacionadas ao metabolismo de carboidratos, 13 ao metabolismo de proteínas, seis ao metabolismo de ácidos graxos, 5 ao metabolismo dos ácidos nucleicos, 2 com anotação funcional no metabolismo do ATP e 1 proteína está relacionada aos processos catalíticos do GTP.

Na classificação funcional relacionada ao estresse, nove proteínas possuem função associada ao estresse salino, sete ao estresse ao frio, duas ao estresse ao calor e duas proteínas são correlatas ao estresse osmótico.

Lu et al. (2008) identificaram, durante o processo de germinação em embriões de milho, as proteínas, *adenosine kinase*, *phosphoglycerate kinase*, *ppi-phosphofructokinase* e *pyruvate kinase*, identificadas neste experimento entre as 127 proteínas que reduziram sua expressão durante a embriogênese. Às duas primeiras

foram atribuídas funções relacionadas à duplicação e às duas últimas foi atribuída a função glicolítica. Fato interessante a ser observado é que estas proteínas têm sua expressão reduzida conforme a embriogênese progride.

As informações obtidas coincidem com as etapas do desenvolvimento do embrião para *adenosina kinase* e para *phosphoglycerate kinase*. Até o 15º DAP é observado o período de crescimento e diferenciação celular e, após, inicia-se o armazenamento, sendo necessário, para que este ocorra, uma redução da expressão de proteínas glicolíticas (*ppi-phosphofructokinase* e *pyruvate kinase*), acarretando um aumento de carboidratos ou mobilização destes para outra via metabólica (Lee et al., 2002; Vernoud et al., 2005 e Liu et al., 2008).

Huang et al. (2012) identificaram a expressão diferencial para as proteínas *acetyl-CoA acetyltransferase cytosolic 1*, *glycine-rich protein*, *heat shock protein 70* e *malate dehydrogenase* durante o processo de germinação em embriões de milho tolerantes à dessecação.

Quarenta e três das 127 proteínas expressas não foram caracterizadas. Sendo assim, a análise dessas proteínas no GO permitiu caracterizar funcionalmente 29, permanecendo, assim, 15 sem anotação funcional. Contudo, após a realização de buscas individuais no Blast para cada proteína não caracterizada, foi possível realizar o alinhamento de 35 proteínas, assim como sua caracterização, conforme apresentado no Quadro 4.

Vinte e oito proteínas foram alinhadas com proteínas já disponibilizadas em banco de dados para *Z. mays*, com percentuais de identidade entre as sequências de aminoácidos variando de 75,76% como pode ser visualizado entre a *uncharacterized protein* (ID: K7V645) e a *small ubiquitin-related modifier* (ID: B4G1P4) a 100% entre a *uncharacterized protein* (ID: C0HHC1) e a *GTP-binding nuclear protein Ran A-1* (ID: B4G1P4).

Vinte e oito proteínas foram alinhadas com proteínas já disponibilizadas em bancos de dados para *Z. mays*, com percentuais de identidade entre as sequências de aminoácidos variando de 75,76%, como pode ser visualizado entre a *uncharacterized protein* (ID: K7V645) e a *small ubiquitin-related modifier* (ID: B4G1P4) a 100% entre a *uncharacterized protein* (ID: C0HHC1) e a *GTP-binding nuclear protein Ran A-1* (ID: B4G1P4).

Cinco *uncharacterized protein* foram alinhadas com proteínas existentes no banco de dados para proteínas de *Oriza sativa* apresentando menor percentual de

similiaridade, ou seja, 88,65% e uma *uncharacterized protein* (ID: B7ZZ42) foi alinhada com *heat-shock protein - Hsp70* (ID: X7Z319) de *Saccharum sp* com 99,2% de identidade.

A proteína identificada *adenylate kinase*, que apresentou 90% de identidade com a sequência desta mesma proteína em *O. sativa*. Esta proteína foi observada por Lu et al. (2008) durante o processo de germinação em embriões de milho comum com função relacionada à duplicação do DNA.

Três *uncharacterized proteins* não foram alinhadas a nenhuma sequência similar no banco de dados que possibilitasse a caracterização das mesmas. Contudo, uma nova pesquisa realizada no Kegg – Search & Color Pathways revelou que a *uncharacterized protein* (ID: B4F8B8) é uma proteína participante da via metabólica da glicólise e gliconeogênese e foi caracterizada como a proteína *pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit*.

Quadro 4 – Alinhamentos realizados entre as proteínas não caracterizadas encontradas em embriões de milho pipoca da linhagem P16, com possíveis proteínas alocadas no banco de dados do Uniprot via Blast

Proteína não caracterizada <sup>1/</sup>	Proteína de maior identidade no alinhamento <sup>1/</sup>	% de identidade
B4FSN1	B6TCA2 <i>Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 1</i>	99,8
C0HFI8	Q948Y5 <i>DNA helicase</i>	99,5
B4F938	Q2F7H8 <i>Plastid coproporphyrinogen III oxidase</i>	95,3
B4FWQ0	-- --	--
C0P972	-- --	--
C0PFQ7	O48888 <i>ATP sulfurylase</i>	98,4
B4FBC2	B6T588 <i>GDP-mannose 3,5-epimerase 1</i>	99,7
C0HJ53	-- --	--
C0P3K4	B6U0R8 <i>Subtilisin-like protease</i>	99,4
C0P820	Q94LR9* <b>3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal</b>	89,6
B4F7Y3	B6T2M6 <i>Oleoyl-acyl carrier protein thioesterase</i>	99,7
K7V645	B4FNC9 <i>Small ubiquitin-related modifier</i>	75,7
B4FS03	B6T920 <i>Adenine phosphoribosyltransferase 1</i>	99,4
C4J4W3	B6U6S4 <i>Heat shock protein ST1</i>	95,2
B4FVU6	B6TCA9 <i>Diphosphomevalonate decarboxylase</i>	98,8
C0HHC1	B4G1P4 <i>GTP-binding nuclear protein Ran-A1</i>	100,0
B4FL79	B6T903 <i>Nascent polypeptide-associated complex alpha subunit-like protein</i>	90,4

Quadro 4, cont.

C0PBL7	--	--	--
B8A334	C4IZ94	<i>Ornithine carbamoyltransferase</i>	95,8
C0P5Y3	Q8W529	<i>Methionine synthase (Fragment)</i>	99,6
K7UDG5	--	--	--
C4J757	B6SV64	<i>Heat shock 70kDa protein 4</i>	99,2
B4F8B8	--	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit***</i>	--
B4FAA3	B6T7Q4	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase</i>	99,8
B7ZY87	B6TT83	<i>SRC2</i>	88,0
B8A348	C5XUH8	<i>DNA helicase</i>	98,6
K7UW74	C0PHH5	<i>Dihydrolipoyl dehydrogenase</i>	87,3
B4F8M8	Q9LLB8	<i>Exoglucanase</i>	99,8
B4FFF1	B6T9E7	<i>Ran-binding protein 1</i>	99,0
B7ZZ42	X4Z319**	<i>Hsp70</i>	99,2
B4FTD4	B6TL64	<i>Xaa-Pro dipeptidase</i>	99,8
K7VYD0	O04982	<i>Cystathionine gamma-synthase</i>	95,0
C0PA91	Q6ZI55	<i>NAD-dependent isocitrate dehydrogenase</i>	89,4
B4FQQ1	--	--	--
C4J9Y2	Q2RAK8*	<i>Os11g0147800 protein</i>	88,6
B4FQT3	B6U6S4	<i>Heat shock protein STI</i>	99,4
K7VW90	Q943K7*	<b>70 kDa heat shock</b>	96,0
C0PM74	--	--	--
K7WDQ7	Q2R2X2*	<i>ATP-binding cassette sub-family E member 1</i>	97,6
B4FSE0	--	--	--
C0P558	B6TV58	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3</i>	90,8
C4J093	<b>Q08480*</b>	<b>Adenylate kinase B</b>	90,0
C4J040	B6U9M4	<b>Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase</b>	95,4

<sup>1</sup>ID Uniprot; \*alinhamento com *Oryza sativa*; \*\* alinhamento com *Saccharum sp*; \*\*\* caracterização da proteína realizada pelo Search & Pathways Color do Kegg.

O Kegg – Search & Color Pathways foi utilizado com o objetivo de inferir sobre as vias metabólicas das 127 proteínas, sendo possível constatar que dezesseis delas não apresentaram funções associadas às diferentes vias metabólicas em milho. Foram identificadas 15 proteínas atuantes na via do ácido cítrico (TCA): *argininosuccinate lyase*, *dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex*, *isocitrate dehydrogenase [NADP]* (três isoformas), *malate dehydrogenase* (três isoformas), *pyruvate dehydrogenase*

*E1 component subunit beta* (três isoformas), *succinyl-CoA ligase beta-chain* (duas isoformas) e duas *uncharacterized proteins*.

A redução na expressão das proteínas relacionadas à via metabólica do ácido cítrico corrobora os dados obtidos por Lee et al. (2002) quando estudaram a embriogênese em milho comum. Os autores registraram que a análise de genes da glicólise citosólica e das vias metabólicas do ácido cítrico são importantes durante o desenvolvimento do embrião e que genes relacionados a essas vias metabólicas tiveram expressão acumulada entre o 10<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> DAP, havendo, após este período, diminuição na sua expressão.

Outro fator importante é a presença de proteínas identificadas nas vias metabólicas dos proteossomos e associadas ao metabolismo de proteínas, assim como proteínas participantes de vias metabólicas de duplicação do DNA, mecanismos de reparo, transcrição e tradução gênica, conforme avançam os dias da a embriogênese.

No tocante às sete proteínas que tiveram a expressão aumentada durante a embriogênese na linhagem P16 (Quadro 5), não foi possível estabelecer a notação funcional das duas *uncharacterized protein* (ID: K7VM99 e B4G0K5) e da *embryonic protein DC-8* (ID: B6SGN7).

Quadro 5 – Proteínas que tiveram a expressão aumentada durante a embriogênese na linhagem P16 de milho pipoca

Acesso ID*	Descrição	Proporção média
C0P3K6	<i>Aspartic proteinase oryzasin-1</i>	1,68±0,23
P27347	<i>DNA-binding protein MNB1B</i>	2,24±0,11
B6SGN7	<i>Embryonic protein DC-8</i>	2,41±0,29
Q19VG6	<i>Major latex protein 22</i>	2,33±0,08
K7VM99	<i>Uncharacterized protein</i>	1,53±0,01
B4G0K5	<i>Uncharacterized protein</i>	1,83±0,05
B4G250	<i>Uncharacterized protein</i>	2,49±0,38

\*ID – “identification” – Número de identificação - Uniprot.



Lee et al. (2002), Vernoud et al. (2005) e Liu et al. (2008) observaram um período de crescimento e de diferenciação celular no embrião até o 15º DAP e que, após este momento, iniciou-se o armazenamento. Esta informação corrobora os resultados obtidos no presente trabalho, os quais evidenciaram proteínas associadas ao processo de crescimento e de diferenciação reduzindo sua expressão no 25º DAP quando comparado ao 15º DAP.

A proteína *aspartic proteinase oryzasin-1* (ID: C0P3K6) apresenta atividade molecular de endopeptidase tipo-aspartato, participando, assim, de processos biológicos de proteólise e metabolismo de lipídios. Localizada no núcleo celular, a *DNA-binding protein MNB1B* (ID: P27347) participa dos processos biológicos de regulação da transcrição ligada ao DNA. Por fim, a *major latex protein 22* (ID: Q19VG6) é uma proteína de defesa, associada a respostas a estímulos bióticos.

A *uncharacterized protein* (ID: B4G250) não apresentou notação funcional estabelecida, contudo, após realização de uma busca no Blast e subsequente alinhamento, foi possível observar que esta proteína apresentou identidade de 99,36% com a *17.4 kDa class I heat shock protein 3* (ID: B6TDB5) (Figura 4), cuja função biológica está associada à resposta a estresse. A análise desta proteína no Kegg – Search & Color Pathways evidenciou que ela está associada ao processamento de proteínas no retículo endoplasmático.

```

1  MSLIRRSNVFDPFSLDLWDPFEGFPFGSGNSSSLFHSFPRTSSETAAFAGARIDWKETPE 60 B4G250 B4G250_MAIZE
1  MSLIRRSNVFDPFSLDLWDPFEGFPFGSGNSSSLFHSFPRTSSETAAFAGARIDWKETPE 60 B6TDB5 B6TDB5_MAIZE
*****
61 AHVFKADVPLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERNKEQEEKTDIWHRVERSSGRFLRRFLRP 120 B4G250 B4G250_MAIZE
61 AHVFKADVPLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERNKEQEEKTDIWHRVERSSGRFLRRFLRP 120 B6TDB5 B6TDB5_MAIZE
*****
121 ENAKTEQITAAMENGVLTVIVPKEDAKKPEVKSIQISG 158 B4G250 B4G250_MAIZE
121 ENAKTEQITAAMENGVLTVIVPKEDAKKPEVKSIQISG 158 B6TDB5 B6TDB5_MAIZE
*****

```

Figura 4 – Alinhamento entre *uncharacterized protein* (ID: B4G250) com *17.4 kDa class I heat shock protein 3* (ID: B6TDB5) de *Zea mays* L.

Observa-se, inicialmente, um número próximo de proteínas que aumentaram sua expressão nas duas linhagens durante o processo de embriogênese, sendo 7 proteínas na linhagem P16 de baixa capacidade de expansão e 9 na linhagem de elevada capacidade de expansão (P11). Em sua maioria, as proteínas encontradas na linhagem P11 relacionam-se ao metabolismo do ácido cítrico

### 3.3. Proteínas comuns expressas diferencialmente nas duas linhagens de milho pipoca

No total, foram observadas 30 proteínas que tiveram a expressão diminuída nas duas linhagens de milho pipoca durante a embriogênese, ou seja, do 15<sup>o</sup> ao 25<sup>o</sup> DAP (Figura 5). Entre estas, sete proteínas estão associadas à via metabólica de proteínas, seis à via metabólica de DNA, quatro à via metabólica de carboidratos, três à via metabólica de ácidos graxos e três estão relacionadas à função de estresse oxidativo.

A diminuição na expressão não foi igual nas duas linhagens. Algumas proteínas apresentaram maior redução em uma linhagem do que em outra. Onze proteínas apresentaram redução na expressão na linhagem P11, três com significância a 1% de probabilidade pelo teste F (*dihydrolipoyl dehydrogenase*, *fructokinase-2* e uma *uncharacterized protein* - ID:COP493) e oito com nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste F (*APx1-Cytosolic ascorbate peroxidase*, *APx1-Cytosolic ascorbate peroxidase II*, *APx2-Cytosolic ascorbate peroxidase*, *enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]*, *enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase isoform1*, *inositol-3-phosphate synthase*, *peptidyl-prolylisomerase* e *uncharacterized protein*-ID:B4G101). As demais proteínas não apresentaram resultados significativos pelo teste F.

As proteínas *dihydrolipoyl dehydrogenase* (ID: COPHH5), *fructokinase-2* (ID: B6TB39) são atuantes na via metabólica de carboidratos e a *uncharacterized protein* (ID: COP493) pertence à via metabólica do DNA com função molecular de ligação com nucleotídeos. Buscas realizadas no Blast e no Kegg Mapper – Search & Color Pathways evidenciaram valores baixos de identidade da *uncharacterized protein* (ID: COP493) com outras proteínas de *Z. mays* e de outras espécies.

As proteínas *APx1-Cytosolic ascorbate peroxidase* (ID: B6U9S8), *APx1-Cytosolic ascorbate peroxidase II* (ID: B6TM55) e *uncharacterized protein* (ID: B4GO31) estão correlacionadas com as funções de estresse oxidativo; *enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]* (ID: B6TYG2) e *enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase isoform1* (ID: B4FFA7) são atuantes no metabolismo de ácidos graxos; *inositol-3-phosphate synthase* (ID: B6T9P4), *peptidyl-prolylisomerase* (ID: B6T1T8) e uma *uncharacterized protein* (ID: B4G101).

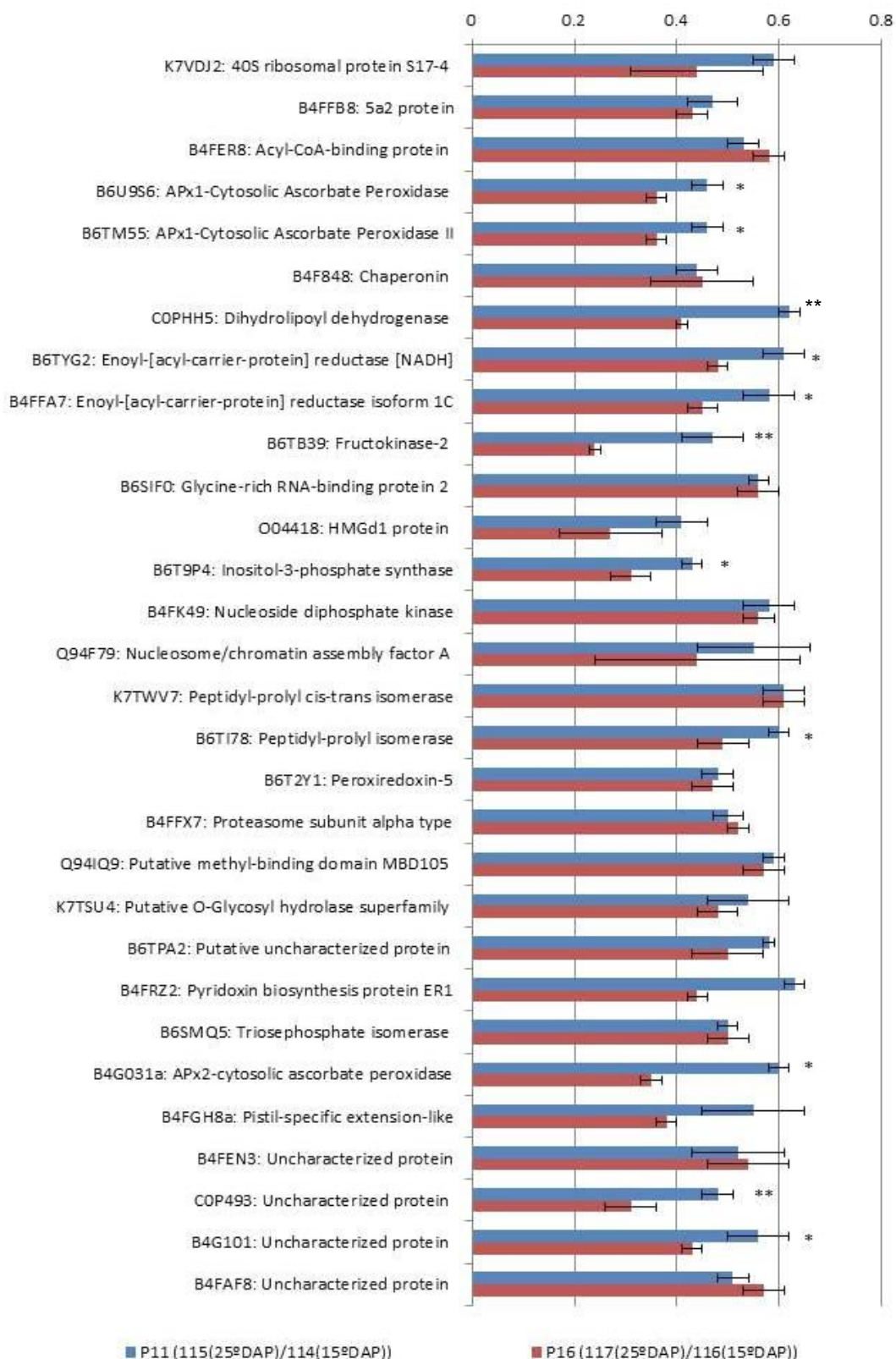


Figura 5 – Proteínas que tiveram redução na sua expressão durante a embriogênese (15° DAP ao 25° DAP) nas linhagens P11 e P16 de milho pipoca. \*\*Significativo pelo teste F ( $p \leq 0,01$ ), \*Significativo pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), <sup>ns</sup>não significativo. Barras que não apresentam estes símbolos não apresentam diferenças estatísticas significativas pelo teste F.

Buscas foram realizadas no Blast para as *uncharacterized protein* (ID: B4G031 e B4FGH8) as quais apresentaram, respectivamente, identidade de 99,6% com a proteína *APx2-cytosolic ascorbate peroxidase* (ID: B6TVL8) de *Z. mays* e identidade de 99,5% com a proteína *pistil-specific extensin-like* (ID: K7V6L8) de *Z. mays*. Para as demais *uncharacterized protein*, não foram encontrados resultados satisfatórios de alinhamento com outras proteínas.

Em geral, as proteínas tiveram uma redução de atividade maior na linhagem P11, a qual tem elevada capacidade de expansão. Portanto, as vias metabólicas às quais essas proteínas estão envolvidas estão diminuindo mais rapidamente nessa linhagem.

Das 19 proteínas restantes que diminuíram sua expressão, onze evidenciaram também uma maior diminuição na expressão na linhagem P11 quando comparada à P16. Em contrapartida, apenas 5 proteínas tiveram uma maior redução na expressão na linhagem P16 quando comparada à linhagem P11. Em ambas as situações, o teste F a 5% de probabilidade foi não significativo.

No tocante às 34 proteínas que tiveram a atividade aumentada durante a embriogênese nas duas linhagens de milho pipoca (Figura 6), nove proteínas tiveram aumentos de expressão maior na linhagem P16, que apresenta baixa capacidade de expansão; três apresentaram aumento de expressão altamente significativo (1% de probabilidade pelo teste F) na linhagem P16 em relação à P11 (*1-Cys peroxiredoxin PER1*, a *embryonic protein DC-8* e a *non-specific lipid-transfer protein*); e seis proteínas apresentaram aumento na expressão significativo a 5% de probabilidade pelo teste F (*embryonic protein DC-8*, *late embryogenesis abundant*, *ethylene-responsive protein*, *uncharacterized protein* - ID:K7W272 e duas isoformas de *vicilin-like embryo storage protein*).

A proteína *1-Cys peroxiredoxin PER1* (ID: A2SZW8) participa dos processos de oxirredução, a *embryonic protein DC-8* (ID: K7UNW7) não apresenta anotação funcional estabelecida e a *non-specific lipid-transfer protein* (ID: B8QW69) é atuante no transporte de lipídios até os locais de armazenamento. Por outro lado, as proteínas *embryonic protein DC-8* (ID: B6TK66) e *late embryogenesis abundant* (ID: B6SJ28) não apresentam anotação funcional definida, *ethylene-responsive protein* (ID: B6U2R1) está relacionada à função de estresse e, juntamente com a *uncharacterized protein* (ID: K7W272) e duas isoformas de *vicilin-like embryo storage protein* (ID: Q03865 e C0PGM3), apresentam função de armazenamento.

Quanto ao aspecto funcional, as 34 proteínas apresentaram, em sua maioria, a função de armazenamento de proteína e lipídios, subsequente pela anotação funcional de transporte, principalmente de lipídios e de proteínas, funções associadas a estresse, à via metabólica do carbono, a ácidos graxos e à atividade de oxirredução. Neste ponto, observam-se proteínas que se acumulam conforme ocorre o processo de embriogênese, da mesma forma que o processo de maturação e desenvolvimento das sementes. Assim, em ambas as linhagens de milho pipoca, foram identificadas proteínas indicadoras de desenvolvimento e maturação, como a *embryonic protein*, a *late embryogenesis abundant* e *vicilin-like embryo storage protein*.

Nove, das 34 proteínas, não apresentaram notação funcional definida e, quando foram realizadas pesquisas no Blast, os resultados obtidos não foram satisfatórios: a *antimicrobial peptide MBP-1* (ID: B6SLF6), *glyoxalase family protein superfamily* (ID: B6SGF3), duas *jasmonate-induced proteins* (ID: B4FN23, B6SJJ4), uma *secreted protein* (ID: B6UI56), duas *uncharacterized proteins* (ID: B4G019 e K7VBJ4), uma *late embryogenesis abundant protein, group 3* (ID: B6SJ28) e duas *embryonic protein DC-8* (ID: B6TK66 e K7UNW7).

Wang et al. (2014) observaram acúmulo no endosperma de *glyoxalase I* (*lactoylglutathione lysase*) durante o desenvolvimento de sementes de milho, atribuindo à mesma a função de detoxicação do metilglioxal (methylglyoxal-MG), um aldeído altamente reativo derivado da glicólise.

A *cupin family protein* (ID: B6SK46) e a *uncharacterized protein* (ID: K7W272) apresentam função geral de reserva de nutrientes em sementes, já as *oleosins* (ID: B4FJ41 e B6SIZ2) possuem a função de armazenamento de lipídios em sementes e biogênese dos corpos lipídicos. Jiménez-López et al. (2011) observaram a diminuição da expressão do gene desta proteína decorrido 24 horas do início do processo de germinação. Gong et al. (2013) constataram elevação na expressão desta proteína após o processo de germinação de embriões que passaram por pré-tratamento “hydropriming”.

As informações sobre aumento ou diminuição da expressão da *cupin family protein* em processos biológicos específicos ainda não estão bem elucidadas e, segundo Gong et al. (2013), isso se deve às inúmeras funções realizadas por esta proteína, como função de armazenamento, ligação da auxina, relacionadas com o estresse e envolvidas no crescimento e desenvolvimento das sementes.

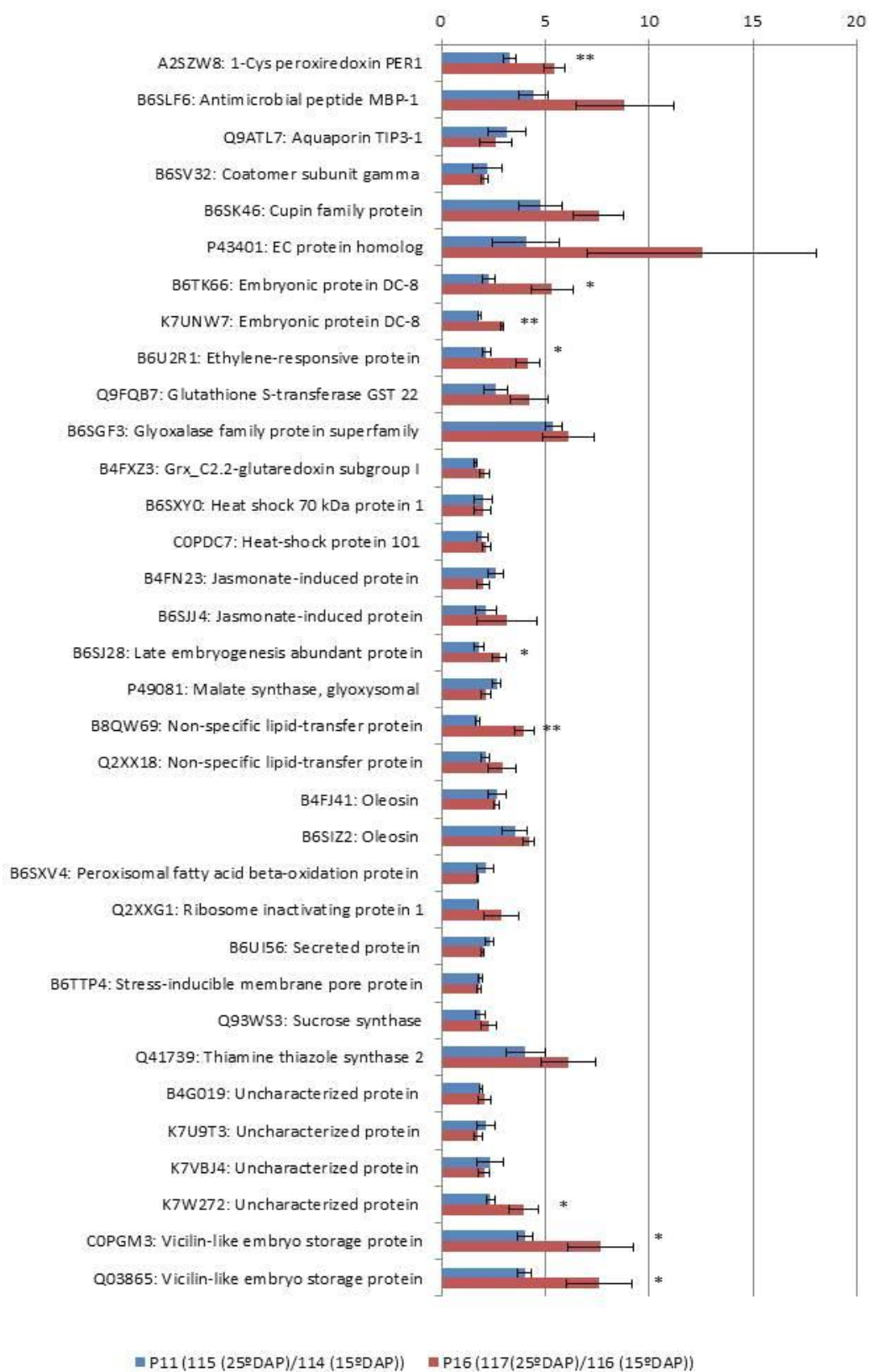


Figura 6 – Proteínas que tiveram redução na sua expressão durante a embriogênese (15° DAP ao 25° DAP) nas linhagens P11 e P16 de milho pipoca. \*\*Significativo pelo teste F ( $p \leq 0,01$ ), \*Significativo pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), <sup>ns</sup>não significativo. Barras que não apresentam estes símbolos, não apresentam diferenças estatísticas significativas pelo teste F.

A última proteína com função de reserva é a *uncharacterized protein* (ID: C0PGM3) e, após pesquisas realizadas no Blast, seguido de alinhamento, evidenciou-se identidade de 97,25% com a *vicilin-like embryo storage protein* (ID: Q03865) de *Z. mays*. Esta última também foi identificada no presente estudo, podendo, assim, a *uncharacterized protein* ser uma isoforma da *vicilin-like embryo storage protein*.

Liu et al. (2009b), analisando proteínas relacionadas ao armazenamento de proteínas, verificaram elevada expressão da *vicilin like embryo storage protein* em embriões de milho que apresentavam elevado teor de óleo quando comparados a embriões com teor normal de óleo. Huang et al. (2012) relataram a diminuição na expressão desta proteína durante o processo de germinação em embriões tolerantes a dessecação.

A maior expressão da *uncharacterized protein* ocorreu no 25º DAP, na linhagem P11, enquanto que a *vicilin-like embyo storage protein* apresentou sua maior expressão no 25º DAP na linhagem P16. Da mesma forma, foram encontradas cinco proteínas com função relacionada a transporte. Duas proteínas, *non-specific lipid-transfer protein* (ID: B8QW69 e Q2XX18) apresentaram a função de transporte de lipídios com função molecular de ligação com lipídios e calmodulinas. As proteínas *aquaporin TIP3-1* (ID: Q9ATL7), *coatomer subunit gamma* (ID: B6SV32) e a *EC protein homolog* (ID: P43401) apresentaram funções de transporte celular da água, transporte intracelular de proteínas / mediado por vesículas e transporte do zinco, respectivamente. A *non-specific lipid-transfer protein* se expressou mais na linhagem P16.

Proteínas com notação funcional relacionada a estresse também foram identificadas. A *ethylene-responsive protein* (ID: B6U2R1) está associada a respostas a estresse e a *heat shock 70 kDa protein 1* (ID: B6SXY0) e a *heat-shock protein 101* (ID: C0PDC7) estão associadas à resposta ao estresse térmico, à luminosidade elevada e ao peróxido de hidrogênio.

Liu et al. (2008) observaram elevação drástica na expressão do gene *ethylene-reponsive* no 25º DAP em sementes de milho, associada à maturação da semente, dessecação e defesa. Essa proteína apresentou sua maior expressão no 25º DAP na linhagem P16. Jiménez-López et al. (2011) observaram uma elevação na expressão deste gene durante o processo de germinação, atuando também nesta função biológica.

As proteínas *1-cys peroxiredoxin PER1* (ID: A2SZW8) e *Grx\_C2.2-glutaredoxin subgroup I* (ID: B4FXZ3) apresentam funções associadas a processos de oxirredução. A *peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein* (ID: B6SXV4) apresenta atividade de oxirredutase e atua no metabolismo de ácidos graxos, da mesma forma que a *uncharacterized protein* (ID: K7U9T3). Gong et al. (2013) constataram diminuição na expressão da proteína *1-cys peroxiredoxin* após o processo de germinação de embriões submetidos ao pré-tratamento de “hydropriming”. Esta proteína se expressou mais na linhagem P16.

A *glutathione S-transferase GST 22* (ID: Q9FQB7) apresenta atividade de transferase da glutatona; a *malate synthase glyoxysomal* (ID: P49081) possui notação funcional no ciclo do glioxalato e do ácido tricarbóxico e a *ribosome inactivating protein 1* (ID: Q2XXG1) apresenta regulação negativa da tradução gênica.

Méchin et al. (2007) observaram a expressão da proteína *glutathione s-transferase* nos estádios iniciais do desenvolvimento em sementes de milho com objetivo de detoxicação celular, principalmente relacionada a espécies reativas de oxigênio. Os autores observaram que, com o avanço no desenvolvimento da semente, ocorreu diminuição destas espécies reativas e, conseqüentemente, sua expressão. Jiménez-López et al. (2011) observaram aumento na expressão desta proteína após 24 horas do início do processo de germinação do embrião. Campo et al. (2004) fizeram esta mesma observação após 24 horas da germinação de embriões infectados por *Fusarium verticillioides*. Aumento na expressão desta proteína foi observada por Huang et al. (2012) durante a germinação de embriões tolerantes à dessecação.

Por fim, foram observadas as proteínas *sucrose synthase* (ID: Q93WS3), cuja função principal reside nos processos metabólicos da sacarose pela atividade sacarose sintase; a *thiamine thiazole synthase 2* (ID: Q41739), responsável pela biossíntese da tiamina no cloroplasto; e a *stress-inducibile membrane pore protein* (ID: B6TTP4) sem notação funcional especificada, apresentando apenas a informação de componente integral de membrana.

Liu et al. (2008) observaram o aumento na expressão do gene da *sucrose synthase* durante o desenvolvimento das sementes de milho entre o 5º e o 35º DAP, com picos de expressão no 10º e 15º DAP e o relacionaram ao metabolismo do amido. Em uma análise proteômica, Liu et al. (2009a) verificaram elevada expressão



desta proteína nos embriões de milho com elevado teor de óleo quando comparada a embriões com teor de óleo normal. Jiménez-López et al. (2011) relataram uma importante observação com relação a dois genes de *sucrose synthase*. Eles observaram que, após 24 horas do início da germinação, o gene da *sucrose synthase 1* teve sua expressão aumentada enquanto o gene da *sucrose synthase 2* apresentou redução na sua expressão.

### **3.4. Proteínas comuns expressas diferencialmente nas duas linhagens, nas duas épocas de coleta**

Inicialmente, não foi observada nenhuma proteína que reduziu sua expressão entre as linhagens de milho pipoca avaliadas no período de coleta de 15<sup>o</sup> DAP. Em contrapartida, quando foi realizada a comparação entre as linhagens P11 e P16 no 25<sup>o</sup> DAP (P16<sub>25<sup>o</sup> DAP</sub>/P11<sub>25<sup>o</sup> DAP</sub>), observaram-se duas proteínas que se expressaram menos na linhagem P16 de baixa capacidade de expansão. Uma delas, a proteína *aspartate aminotransferase* (ID: B4FUH2), possui função biológica relacionada à biossíntese de aminoácidos, Contrapondo-se a esse achado, Liu et al. (2008) observaram uma superexpressão do gene desta proteína no 15<sup>o</sup> DAP em sementes de milho comum. A outra proteína, a *heat shock 22 kDa protein* (ID: O64960), apresenta função anotada no GO de resposta ao estresse térmico. Sobre essa proteína, Méchin et al. (2007) observaram três isoformas de proteínas da família *heat-shock* durante o desenvolvimento do endosperma em sementes de milho, as quais atingiram níveis elevados de expressão entre o 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> DAP. Essa proteína também foi identificada por Liu et al. (2008) em embrião de milho comum com elevado teor de óleo, apresentando no 15<sup>o</sup> DAP aumento de expressão. Wang et al. (2014) observaram acúmulo de quatro isoformas de *heat shock* em embriões de milho durante seu desenvolvimento.

Campo et al. (2004) verificaram expressão elevada de proteínas da família *heat-shock* durante a germinação de embriões de milho comum infectados pelo patógeno *Fusarium verticillioides*. Estas proteínas apresentam diferentes propriedades funcionais, mas a mais comum a todas elas é a sua capacidade de interagir com outras proteínas, atuando como moléculas que previnem a agregação irreversível de proteínas desnaturadas após o estresse térmico, podendo, também, desempenhar papel na resposta de defesa de plantas, como, por exemplo, infecção fúngica (Campo et al., 2004; Huang et al., 2012).

Chen et al. (2002) também observaram o aumento da expressão desta proteína em embriões de milho infectados por *Aspergillus flavus* e esses autores citam que as proteínas *heat-shock* podem ser induzidas por estresse térmico, hídrico e salino e que *in vitro* apresentam atividade molecular de chaperonas. Huang et al. (2012) observaram a presença desta proteína em embriões de milho resistentes à dessecação durante a germinação.

Além das proteínas que tiveram a expressão diminuída na linhagem P16, na época de coleta de 25º DAP, foi possível identificar quatro proteínas que apresentaram expressão aumentada na linhagem P16, quando comparadas à linhagem P11 no 15º DAP, e uma proteína no 25º DAP (Quadro 6).

Quadro 6 – Proteínas que tiveram a expressão aumentada na linhagem P16 quando comparada à linhagem P11 nas duas épocas de coleta (15º DAP e 25º DAP)

Época de coleta	ID*	Proteína
15º DAP	B6THR9	<i>3-isopropylmalate dehydrogenase</i>
	B6TVD6	<i>3-isopropylmalate dehydrogenase</i>
	B6SZS2	<i>40S ribosomal-S9</i>
	B6TB39	<i>Fructokinase-2</i>
25º DAP	B4FH44	<i>Thioredoxin</i>

\* ID – “identification” número de identificação – UNIPROT.

A proteína *3-isopropylmalate dehydrogenase* está associada à via metabólica de biossíntese de valina, leucina e isoleucina. Dessa forma, o fato dela se expressar mais na linhagem P16 no 15º DAP evidencia, para este período de coleta, um incremento na síntese proteica.

A *40s ribosomal protein-S9* é uma proteína estrutural dos ribossomos, os quais se destacam como os locais de síntese protéica. Por fim, a *fructokinase-2* atua na síntese do de amido.

A proteína *fructokinase-2* foi observada por Méchin et al. (2007) durante as fases iniciais do desenvolvimento do endosperma de milho e o pico de sua expressão foi entre o 10º e o 15º DAP. Lu et al. (2008) identificaram esta proteína durante a germinação de embriões de milho comum. Liu et al. (2009b) também

observaram a expressão elevada desta proteína no embrião de milho que apresentava elevado teor de óleo quando comparado a embrião com teor normal de óleo.

A proteína *thioredoxin* (ID: B4FH44) que teve a expressão aumentada na linhagem P16 no 25º DAP não teve ainda suas funções biológica e molecular elucidadas.

### **3.5. Proteínas comuns com expressão diminuída entre todas as comparações de tratamentos analisados**

A proteína *triosephosphate isomerase* (ID: B6SMQ5) teve sua expressão diminuída em todas as quatro comparações de tratamentos avaliadas. Esta proteína se expressou menos dentro das linhagens P11 e P16 no 25º DAP, ou seja, conforme transcorre a embriogênese ocorreu a diminuição da expressão da proteína (do 15º para o 25º DAP). Mas quando à comparação realizada entre as linhagens, constatou-se que ela se expressou menos na linhagem P16 que apresenta baixa capacidade de expansão nas duas épocas de coleta, evidenciando, assim, uma maior expressão desta proteína na linhagem P11.

A *triosephosphate isomerase* foi classificada no Gene Ontology (GO) como participativa de processos metabólicos e glicolíticos, apresentando função molecular de atividade catalítica e atividade de isomerase. Esta proteína é responsável pela reação reversível entre a diidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. A diidroxiacetona-fosfato é isomerizada a uma segunda molécula de gliceraldeído-3-fosfato, finalizando a primeira fase da glicólise (Nelson e Cox, 2011). Assim, concluiu-se que a diminuição da expressão da *triosephosphate isomerase* acarretará diminuição na glicólise, conforme o desenvolvimento dos embriões, aumentando o acúmulo de carboidratos.

Embora esta proteína tenha sido encontrada em todas as quatro comparações dos tratamentos, não se observou diferença estatística significativa a 5% de probabilidade pelo teste F, com relação à diferença de expressão, quando foram comparadas as duas linhagens, o que impossibilitou maiores informações.

A *putative uncharacterized protein* (ID: B6SHX8) apresentou redução na sua expressão nas seguintes comparações de tratamentos: P16<sub>25ºDAP</sub>/P16<sub>15ºDAP</sub>; P16<sub>25ºDAP</sub>/P11<sub>25ºDAP</sub> e P16<sub>15ºDAP</sub>/P11<sub>15ºDAP</sub>. A função biológica da *putative uncharacterized protein* foi determinada mediante realização de uma busca no GO

do AgBase, a qual revelou que essa proteína apresentava a função de transporte de íons metálicos. Entretanto, o alinhamento dessa proteína no Blast não revelou dados com elevados percentuais de identidade que possibilitaram sua caracterização. A análise estatística para essa proteína revelou não existir diferenças significativas entre as três combinações pelo teste de F a 5% de probabilidade.

Apresentando diminuição comum na expressão entre as comparações P16<sub>25°DAP</sub>/P11<sub>25°DAP</sub> e P16<sub>15°DAP</sub>/P11<sub>15°DAP</sub> observou-se a *ethylene-responsive protein* (ID: B6U2R1). A *ethylene-responsive protein*, que teve sua função biológica determinada no GO, está relacionada à resposta ao estresse, expressou-se menos na linhagem P16, nas duas épocas de coleta (15° e 25° DAP), fato este corroborado pelas análises estatísticas a 1% de probabilidade pelo teste F.

Liu et al. (2008) observaram elevada expressão do gene desta proteína entre o 25° e 35° DAP em sementes de milho, juntamente com outros genes agrupados em um mesmo *cluster* relacionado à maturidade das sementes. Jiménez-López et al. (2011) observaram um aumento na expressão do gene *ethylene-responsive protein* durante a germinação e associou este gene à biossíntese de fitohormônios vegetais.

Na comparação entre P16<sub>25°DAP</sub>/P11<sub>25°DAP</sub> e P16<sub>25°DAP</sub>/P16<sub>15°DAP</sub>, foi possível identificar seis proteínas que tiveram sua expressão reduzida (Quadro 7).

Na comparação entre as duas linhagens, foi possível observar que a *uncharacterized protein* (ID: K7U1TO) apresentou uma redução de expressão altamente significativa na linhagem P16 (1% de probabilidade pelo teste F), conforme transcorre a embriogênese. Essa proteína apresentou alinhamento com identidade de 91,62% com outra *uncharacterized protein* (ID: K7UGQ5) e anotações funcionais no GO relacionadas à recuperação da adenina no metabolismo de nucleosídeos.

As outras cinco proteínas (Quadro 7) não apresentaram diferenças significativas quando foi realizada a comparação da linhagem P16 com a P11 no 25° DAP e P16 nas duas épocas de coleta (15° e 25° DAP). Das cinco proteínas restantes, duas foram identificadas: a *acyl-desaturase* (ID: B6T7F2) e a *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (ID: Q43247); as outras três proteínas são *uncharacterized protein* (ID: B4F945, B4F9K4 e B4F9Q1).

Quadro 7 – Proteínas que tiveram a expressão reduzida na linhagem P16, quando comparada à linhagem P11(P16<sub>25°DAP</sub>/P16<sub>15°DAP</sub>) no 25° DAP (P16<sub>25°DAP</sub>/P11<sub>25°DAP</sub>)

Acesso: Identificação Uniprot;115

Acesso	Descrição	Relação		Teste F
		P16 <sub>25°DAP</sub> /P11 <sub>25°DAP</sub>	P16 <sub>25°DAP</sub> /P16 <sub>15°DAP</sub>	
B6T7F2	<i>Acyl-desaturase</i>	0,56 ± 0,01	0,50 ± 0,07	NS
Q43247	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	0,53 ± 0,03	0,46 ± 0,03	NS
B4F945	<i>Uncharacterized protein</i>	0,42 ± 0,09	0,39 ± 0,15	NS
B4F9K4	<i>Uncharacterized protein</i>	0,46 ± 0,02	0,91 ± 0,47	NS
B4F9Q1	<i>Uncharacterized protein</i>	0,56 ± 0,01	0,50 ± 0,06	NS
K7U1T0	<i>Uncharacterized protein</i>	0,56 ± 0,04	0,30 ± 0,01	**

– P11<sub>25°DAP</sub>; 116 – P16<sub>15°DAP</sub>; 117 – P16<sub>25°DAP</sub>.

\*\* Significativo pelo teste F ( $p \leq 0,01$ ); <sup>NS</sup> Não significativo.

A *acyl-desaturase* apresenta função no processo biológico do metabolismo de ácidos graxos e processo de oxirredução. A *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* é uma enzima relacionada à glicólise, cuja função reside na oxidação e fosforilação do gliceraldeído-3-fosfato para formar o 1,3-bifosfoglicerato. Um aumento na expressão do gene desta proteína foi observado durante o processo de germinação de embriões de milho associado à função glicolítica por Jiménez-López et al. (2011). Por outro lado, Campo et al. (2004) observaram redução na expressão desta proteína durante a germinação de embriões infectados por *Fusarium verticillioides*.

Quanto às três proteínas não caracterizadas, foi necessário proceder a uma busca no Blast, com o intuito de indentificá-las. Portanto, observou-se que a *uncharacterized protein* (ID: B4F945) apresentou 74,03% de identidade com a *lipid transfer protein* (ID: B6TQP9) (Figura 7A) e a *uncharacterized protein* (ID: B4F9K4) apresentou 95,75% de identidade com a *17.5 kDa class II heat shock protein* (ID: P24631) (Figura 7B).

A *lipid transfer* são proteínas presentes nas membranas celulares responsáveis pela mediação no transporte de lipídios a partir de seus sítios de biossíntese, tipicamente no retículo endoplasmático. A expressão do seu gene foi observada por Sossountzov et al. (1991) em embriões de milho na região abaxial do protoderme do escutelo e no coleóptilo.

A *uncharacterized protein* (ID: B4F9Q1) apresentou em análise no Blast, identidade de 98,48% com a proteína *acyl-desaturase* (ID: B6TYP2) (Figura 7C). Da

mesma forma, no GO sua anotação funcional é de participar do metabolismo de ácidos graxos e processo de oxirredução.

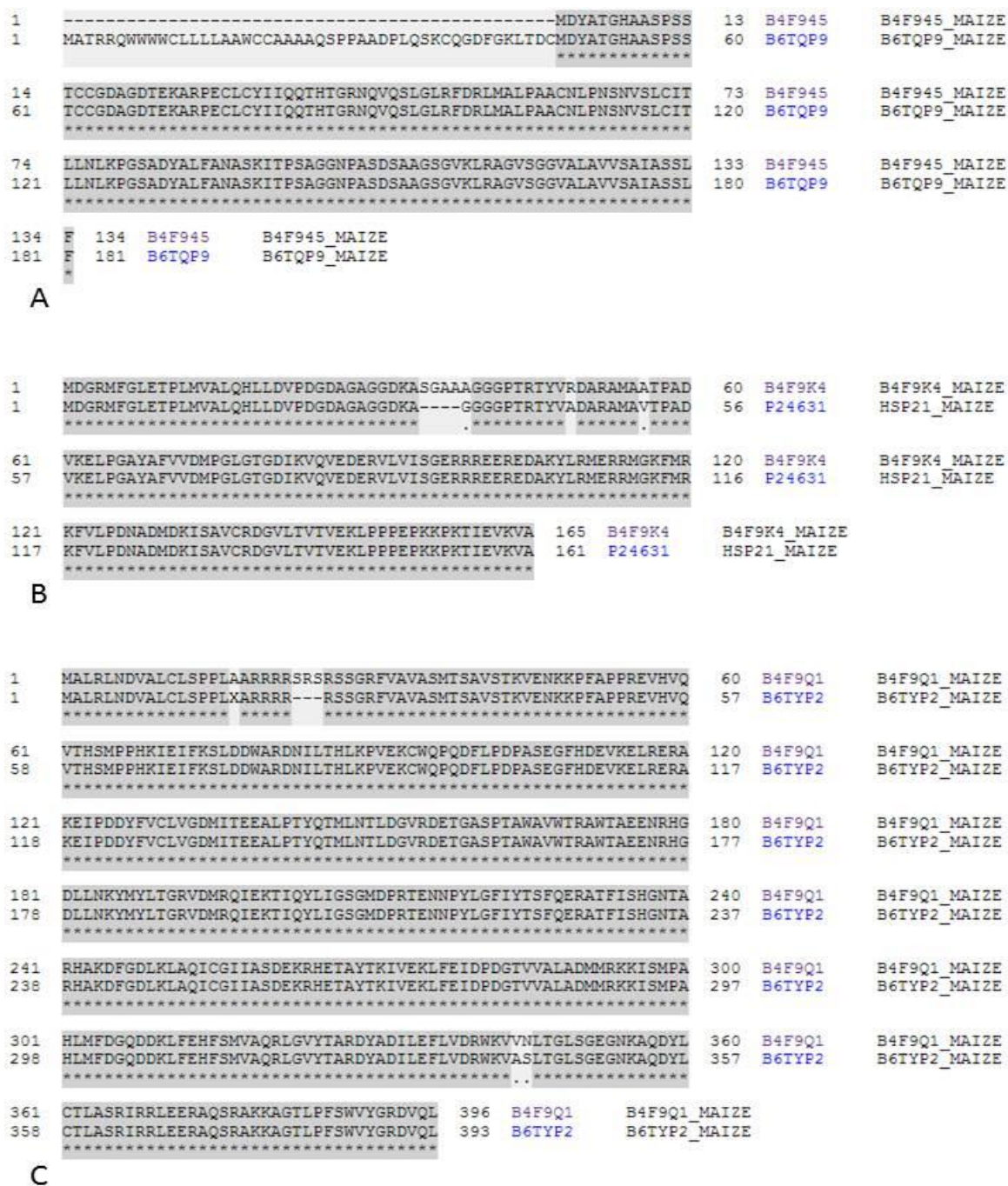


Figura 7 – Alinhamentos entre *uncharacterized protein* (ID: B4F945, B4F9K4 e B4F9Q1) com possíveis proteínas similares. (A) – Alinhamento entre B4F945 / B6TQP9 (74,03% identidade). (B) – Alinhamento entre B4F9K4 / P24631 (95,75% de identidade). (C) – Alinhamento B4F9Q1 / B6TYP2 (identidade de 98,48%).

### 3.6. Proteínas comuns com expressão aumentada entre todas as comparações de tratamentos analisados

Na comparação entre as proteínas comuns com aumento na expressão nos tratamentos P16<sub>25°DAP</sub>/P16<sub>15°DAP</sub> ; P16<sub>25°DAP</sub>/P11<sub>25°DAP</sub> e P11<sub>25°DAP</sub>/P11<sub>15°DAP</sub>, foram observadas 19 proteínas (Quadro 8).

Conforme análise estatística realizada, foi possível verificar que 12 proteínas apresentaram aumento de expressão, sendo este altamente significativo a 1% de probabilidade pelo teste F, na linhagem P16 do 15° para o 25° DAP, quando comparado à linhagem P11.

As 12 proteínas que apresentaram expressão aumentada foram: duas *chitinases* (ID: B8QV24 e B8QVO5), duas *embryonic abundant protein 1* (ID: B6T8E4 e B6SI37), *general stress protein 39* (ID: B4FNZ9), *globulin-1 S allele* (ID: B6UGJO), *globulin-2* (ID: Q7M1Z8), *late embryogenesis abundant protein D-34* (ID: B6SN63), *lipoprotein* (B4FFZ9), *putative uncharacterized protein* (ID: B6TPFO) e duas *uncharacterized protein* (ID: B4FFK9 e K7UCT3).

As *chitinases* são proteínas associadas a mecanismos de defesa em células vegetais. Campo et al. (2004) encontraram duas isoformas altamente expressas de *chitinases* em embriões de milho submetidos à germinação e simultaneamente ao processo de infecção por *Fusarium verticillioides*. Entretanto, a expressão destas proteínas durante o processo germinativo sem infecção fúngica também é visualizado, mas de forma reduzida. Jiménez-López et al. (2011) observaram a elevada expressão em resposta ao processo de germinação de embriões de milho.

No presente trabalho, foi constatado que as *chitinases* se expressaram mais na linhagem P16 do que na P11. Elas se destacam por serem proteínas antifúngicas em plantas, inibindo o crescimento do fungo por meio da hidrólise da quitina, o maior componente da parede celular de fungos (Tiffin, 2004; Wang et al., 2014).

As duas proteínas *embryonic abundant protein 1* identificadas e a *late embryogenesis abundant protein D-34* estão associadas ao processo de desenvolvimento e maturação da semente. Na análise pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, evidenciou-se que essas proteínas se expressaram mais na linhagem P16.

Jiménez-López et al. (2011) constataram diminuição considerável na expressão do gene desta proteína após 24 horas do processo de germinação. Da mesma forma, Campo et al. (2004) observaram redução na expressão de *late*

*embryogenesis abundant protein* em embriões submetidos à infecção fúngica seguido de germinação.

Atualmente, ainda não existe anotação molecular funcional para estas proteínas e o motivo para a diminuição da abundância da mesma na germinação de sementes pré-tratadas por “hydropriming” não são claras (Gong et al., 2013). Vernoud et al. (2005) e Wang et al. (2014) associaram a presença desta proteína com o processo de desidratação da semente.

Huang et al. (2012) observaram a expressão diferencial da *late embryogenesis abundant protein* em embriões de milho tolerante à dessecação. Sendo assim, existe correlação entre essas proteínas e a tolerância à dessecação. Lee et al. (2002) observaram elevados índices de expressão do gene *late embryogenesis 3*, entre 40<sup>o</sup> e 45<sup>o</sup> DAP, durante o desenvolvimento do embrião de milho.

Chen et al. (2002), ao realizar a análise do proteoma diferencial em embriões de milho resistentes e suscetíveis à *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, observaram a expressão elevada de três isoformas da *late embryogenesis abundant protein*. Gong et al. (2013) observaram a diminuição em 6x da *embryonic abundant protein* em embriões em que a germinação foi induzida por “hydropriming”. Esta proteína está localizada no escutelo da semente de milho e está associada aos corpos lipídicos – *oil bodies* (Tnani et al., 2011).

Outras proteínas identificadas foram as globulinas, que se destacam por serem proteínas de reserva encontradas em sementes. A *general stress-39* é uma proteína que está relacionada aos processos metabólicos de oxirredução.

Kriz (1989) avaliou a expressão de proteínas globulinas durante o processo de embriogênese e constatou que a globulina 1 se torna aparente no embrião a partir do 21<sup>o</sup> DAP. Por outro lado, a globulina 2 é evidente a partir do 24<sup>o</sup> DAP durante o desenvolvimento embrionário.

Chen et al. (2002) observaram elevada expressão de duas isoformas da proteína globulina quando analisaram embriões de milho resistentes ao *A. flavus* quando comparada a uma linhagem de milho suscetível ao *A. flavus*, sendo esta, a principal proteína de armazenamento no embrião. A expressão desta proteína encontrada no presente trabalho foi maior na linhagem P16 no 25<sup>o</sup> DAP. Embora haja diferença entre as linhagens, o aumento da expressão também foi observado no decorrer do processo de embriogênese na linhagem P11.



Quadro 8 – Comparação entre as proteínas que tiveram sua expressão aumentada dentro de cada linhagem com as expressas nas duas linhagens no 25º DAP

Acesso <sup>1/</sup>	Descrição	Relação			Teste
		P16 <sub>25ºDAP</sub> /P11 <sub>25ºDAP</sub>	P16 <sub>25ºDAP</sub> /P16 <sub>15ºDAP</sub>	P11 <sub>25ºDAP</sub> /P11 <sub>15ºDAP</sub>	F
B8QV24	<i>Chitinase</i>	2,17 ± 0,09 <sup>b</sup>	13,24 ± 2,76 <sup>a</sup>	6,52 ± 2,76 <sup>b</sup>	**
B8QV05	<i>Chitinase</i>	2,19 ± 0,10 <sup>b</sup>	12,76 ± 2,95 <sup>a</sup>	6,48 ± 2,95 <sup>b</sup>	**
P81009	<i>Defensin-like protein 2</i>	2,41 ± 0,20 <sup>b</sup>	5,54 ± 1,31 <sup>a</sup>	3,29 ± 1,31 <sup>ab</sup>	*
B6T8E4	<i>Embryonic abundant protein 1</i>	2,27 ± 0,21 <sup>b</sup>	6,63 ± 1,71 <sup>a</sup>	2,33 ± 1,71 <sup>b</sup>	**
B6SI37	<i>Embryonic abundant protein 1</i>	4,21 ± 0,57 <sup>b</sup>	10,04 ± 1,25 <sup>a</sup>	4,83 ± 1,25 <sup>b</sup>	**
B4FNZ9	<i>General stress protein 39</i>	1,62 ± 0,06 <sup>c</sup>	4,88 ± 0,63 <sup>a</sup>	3,09 ± 0,63 <sup>b</sup>	**
B6UGJ0	<i>Globulin-1 S allele</i>	2,04 ± 0,05 <sup>b</sup>	4,002 ± 0,63 <sup>a</sup>	2,26 ± 0,63 <sup>b</sup>	**
Q7M1Z8	<i>Globulin-2</i>	2,04 ± 0,05 <sup>b</sup>	3,99 ± 0,63 <sup>a</sup>	2,26 ± 0,63 <sup>b</sup>	**
B6TCV9	<i>LanC-like protein 2</i>	2,21 ± 0,19	2,62 ± 0,35	1,99 ± 0,35	NS
B6SN63	<i>Late embryogenesis abundant protein D-34</i>	1,75 ± 0,21 <sup>b</sup>	5,23 ± 0,79 <sup>a</sup>	2,85 ± 0,79 <sup>b</sup>	**
B4FFZ9	<i>Lipoprotein</i>	1,66 ± 0,04 <sup>b</sup>	4,31 ± 0,80 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,80 <sup>ab</sup>	**
B6SI42	<i>Oleosin</i>	1,83 ± 0,26 <sup>b</sup>	7,10 ± 0,49 <sup>a</sup>	5,11 ± 0,49 <sup>ab</sup>	*
B6TPF0	<i>Putative uncharacterized protein</i>	2,01 ± 0,43 <sup>b</sup>	7,07 ± 0,85 <sup>a</sup>	2,75 ± 0,85 <sup>b</sup>	**
K7TQC8	<i>Seed maturation protein</i>	4,03 ± 0,52 <sup>b</sup>	11,20 ± 3,61 <sup>a</sup>	1,94 ± 3,61 <sup>b</sup>	*
B6UGJ4	<i>Seed maturation protein</i>	2,94 ± 0,54 <sup>b</sup>	11,92 ± 4,82 <sup>a</sup>	3,57 ± 4,82 <sup>ab</sup>	*
B1P123	<i>TRIBOA-glucoside O-methyltransferase BX7</i>	2,47 ± 0,58	6,23 ± 2,60	2,10 ± 2,60	NS
B4FFK9	<i>Uncharacterized protein</i>	1,68 ± 0,07 <sup>c</sup>	5,15 ± 0,33 <sup>a</sup>	3,58 ± 0,33 <sup>b</sup>	**
C4J602	<i>Uncharacterized protein</i>	1,80 ± 0,07	3,95 ± 1,16	3,02 ± 1,16	NS
K7UCT3	<i>Uncharacterized protein</i>	2,22 ± 0,39 <sup>b</sup>	7,80 ± 1,37 <sup>a</sup>	2,76 ± 1,37 <sup>b</sup>	**

<sup>1/</sup>Acesso: Identificação Uniprot; 114 – P11<sub>15ºDAP</sub>; 115 – P11<sub>25ºDAP</sub>; 116 – P16<sub>15ºDAP</sub>; 117 – P16<sub>25ºDAP</sub>; NS não significativo pelo teste F (Pr≥0,05); \* significativo pelo teste F (Pr≥0,05); \*\* significativo pelo teste F (Pr≥0,01). Letras diferentes na mesma linha apresentam diferenças estatísticas significativas a 5% de probabilidade para o teste Tukey, entre as diferentes combinações de tratamento.

Kriz (1989) e Vernoud et al. (2005) citam que as globulinas são as principais proteínas de armazenamento, totalizando de 10% a 20% de proteína do embrião e que, após 24 horas da inserção das sementes em condições favoráveis para a germinação, não foi possível observar a presença das globulinas 1 e 2, evidenciando que estas são degradadas no estágio inicial da germinação. Huang et al. (2012) observaram aumento na expressão desta proteína durante o processo de maturação do embrião e diminuição durante o processo de germinação em um genótipo de milho tolerante à dessecação.

Uma diminuição na expressão das globulinas foi observada em embriões infectados por fungos após 24 horas de germinação por Campo et al. (2004). Liu et al. (2009b) observaram elevada expressão da proteína globulina em embriões de milho que apresentavam elevado teor de óleo, quando comparados a embriões com teor normal de óleo, sendo esta proteína inserida no metabolismo de proteínas.

Além das proteínas citadas acima, uma *putative uncharacterized protein* e duas *uncharacterized protein* (ID: K7UCT3 e B4FFK9) não tiveram suas funções caracterizadas. Em duas *uncharacterized protein* as buscas realizadas no Blast não foram consistentes. Em contrapartida, a *uncharacterized protein* (ID: B4FFK9), apresentou identidade de 81,34%, com uma *lipoprotein* de *O. sativa* (ID: Q94J20) (Figura 8A). Assim, devido à elevada identidade entre as sequências e o fato de já ter sido observada outra lipoproteína (ID: B4FFZ9) acima citada, pode-se dizer que essa proteína, até o momento não caracterizada, é uma lipoproteína com função ainda a ser estudada. A análise estatística para esta proteína também revelou existência de diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste Tukey entre as linhagens, apresentando maior expressão na linhagem P16 no 25<sup>o</sup> DAP.

A *uncharacterized protein* (ID: C4J602) apresentou identidade elevada (99,58%) com a *putative cytochrome P450 superfamily protein* de *Z. mays* (ID: C0P4G2) a qual tem a função em reações de oxirredução, ligação ao grupo heme e ligação ao íon ferro (Figura 8B).

Quatro proteínas, das 19, apresentaram aumento de expressão significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, na linhagem P16, do 15<sup>o</sup> para o 25<sup>o</sup> DAP, quando comparadas à linhagem P11 (Quadro 8): *defensin – like protein 2* (ID: P81009), *oleosin* (ID: B6SI42) e duas *seed maturation protein* (ID: K7TQC8 e B6UGJ4).

**A**

1	MASSDGKPLPTPASVGGGGSSSTAPPGQPTTVASKVLDMGAAAMQSLRPFVKQAKQHMCTF	60	B4FFK9	B4FFK9_MAIZE
1	MASSNEKPLPTPISAAAGSGGNAPPGRPTTVDSMLLDKGAAMLQALRPFVKHIKQHVCTF	60	Q94J20	Q94J20_ORYSJ
	****:***** .....****:**** * :** *** :*:*****: ****:***			
61	ALYAHDPKRQVETHHYVSRNLNQDFLQCAVYDSKADARLIGVEYIVSRKIFDLSLPAEEQR	120	B4FFK9	B4FFK9_MAIZE
61	ALYAHDPRRQVETHHFVSRNLNQDFLQCAVYDADDKHARLIGVEYIVSRKIFDLSLPAEEQR	120	Q94J20	Q94J20_ORYSJ
	*****:*****:*****.*****:*. .*****			
121	LWHSHAHEIKSGLWTSPhVAGLLEKAELDHMAATFGKFWCTWQVDRGDRPLGAPALMVS	180	B4FFK9	B4FFK9_MAIZE
121	LWHSHAHEIKAGLWVSPHVPGLMEKAELEKMGATFGKFWCTWQVDRGDRPLGAPALMVS	180	Q94J20	Q94J20_ORYSJ
	*****:****.**** *:*****:***.*****			
181	PQADPAAAVRDLVLRKDDRYGLSTEELRAARADVEAPEEHPGQADYWLRRHRKGFVDV	240	B4FFK9	B4FFK9_MAIZE
181	PQDDPAADVRLVNRDDKYRYSTTELRAARADVAVPAEPRPGQADYWLRRHRKGFVDV	240	Q94J20	Q94J20_ORYSJ
	** **** *****:***:* ** ***** .*** :*****			
241	VPHEMKRHAPFF	252	B4FFK9	B4FFK9_MAIZE
241	VPHEMKCHAPFF	252	Q94J20	Q94J20_ORYSJ
	***** *****			

**B**

1	MASSDHGSTTAPKDVPGSYGLPLVGAVDRRLDFYFQGGQDKYFESRVERYGSTVVRMNVF	60	C0P4G2	C0P4G2_MAIZE
1	MASSDHGSTTAPKDVPGSYGLPLVGAVDRRLDFYFQGGQDKYFESRVERYGSTVVRMNVF	60	C4J602	C4J602_MAIZE
	*****			
61	PGPFMARDPRVAVLDAKSFVLFDMDKVEKKDLFTGTYPSTSLTGGYRVC SYLDPSEP	120	C0P4G2	C0P4G2_MAIZE
61	PGPFMARDPRVAVLDAKSFVLFDMDKVEKKDLFTGTYPSTSLTGGYRVC SYLDPSP--	118	C4J602	C4J602_MAIZE
	*****			
121	THIKVKQLLFSLLLSRKDDVIPTFRSNFSSLLATVEAEALAKGGKAEFNKLNVDVTSFDFIG	180	C0P4G2	C0P4G2_MAIZE
119	THIKVKQLLFSLLLSRKDDVIPTFRSNFSSLLATVEAEALAKGGKAEFNKLNVDVTSFDFIG	178	C4J602	C4J602_MAIZE
	*****			
181	EAYFGVRSATELKGKGGPSKAAKWLIWQLHPLVTLGLPMVLEEP LLHTFHLPPFLVKGDY	240	C0P4G2	C0P4G2_MAIZE
179	EAYFGVRSATELKGKGGPSKAAKWLIWQLHPLVTLGLPMVLEEP LLHTFHLPPFLVKGDY	238	C4J602	C4J602_MAIZE
	*****			
241	RALYKYFSTVAKQALDTAEGGLSREEACHNLLFATTFNSYGGKLVLPGLLANVASGGE	300	C0P4G2	C0P4G2_MAIZE
239	RALYKYFSTVAKQALDTAEGGLSREEACHNLLFATTFNSYGGKLVLPGLLANVASGGE	298	C4J602	C4J602_MAIZE
	*****			
301	KLHERLVAEIRGAVADAGGKVTLAAVERMELAKSVVWESLRDPVVKFYGHAKKDLLVE	360	C0P4G2	C0P4G2_MAIZE
299	KLHERLVAEIRGAVADAGGKVTLAAVERMELAKSVVWESLRDPVVKFYGHAKKDLLVE	358	C4J602	C4J602_MAIZE
	*****			
361	SHDAVFQVRKGEMLFGYQPCATKDFRVFGDTAGDFVDRFLGEEGSKLLQYVYWSNGRET	420	C0P4G2	C0P4G2_MAIZE
359	SHDAVFQVRKGEMLFGYQPCATKDFRVFGDTAGDFVDRFLGEEGSKLLQYVYWSNGRET	418	C4J602	C4J602_MAIZE
	*****			
421	DNPSVDNKQCPGKNFVVLVGRLLLVLEFLRYDTFTAEEVKGELLGTSVIFTGVIKATSGPG	480	C0P4G2	C0P4G2_MAIZE
419	DNPSVDNKQCPGKNFVVLVGRLLLVLEFLRYDTFTAEEVKGELLGTSVIFTGVIKATSGPG	478	C4J602	C4J602_MAIZE
	*****			
481	SE	482	C0P4G2	C0P4G2_MAIZE
479	SE	480	C4J602	C4J602_MAIZE
	**			

Figura 8 – (A) Alinhamento/identidade entre as proteínas B4FFK9 (*Z. mays*) e Q94J20 (*O. sativa*). (B) Alinhamento/identidade entre as proteínas C0P4G2 e C4J602 de *Z. mays*.

A *defensive like protein 2* tem função associada a mecanismos de defesa em células vegetais. A *seed maturation protein* está associada ao processo de desenvolvimento e maturação da semente.

A proteína *oleosin* tem função associada ao armazenamento de lipídios em estruturas celulares designadas de corpos lipídicos (“oil bodies”), havendo maior expressão das oleosinas no 25<sup>o</sup> DAP. Liu et al. (2008) constataram uma superexpressão de genes de oleosinas a partir do 25<sup>o</sup> até o 35<sup>o</sup> DAP. Por outro lado,

Jiménez-López et al. (2011) observaram uma diminuição na expressão do gene de oleosina durante o processo de germinação.

Lee e Huang (1994) citam a importância das *oleosins*, tanto para a estabilidade dos corpos lipídicos como na possibilidade de atuar no reconhecimento de sinais para a ligação de lipases durante o processo de germinação.

Lee et al. (2002), estudando a expressão de três genes de *oleosins*, 16, 17 e 18, observaram expressão máxima no 15º DAP em embriões de milho. O nível de expressão foi mantido até o 25º DAP, a partir do qual se iniciou uma redução na sua expressão. Estes mesmos genes foram avaliados via *northern blot* por Lee e Huang (1994), sendo constatada a expressão dos mesmos do 15º ao 30º DAP, embora o pico de expressão ocorresse no 25º DAP.

Lee e Huang (1994) e Vernoud et al. (2005) citam três genes para *oleosins* já caracterizados em embriões, acrescentando que sua regulação está associada às fases do desenvolvimento e maturação da semente, podendo ser observados tanto no eixo-embrionário como no escutelo.

Lee e Huang (1994), após isolamento dos corpos lipídicos e fracionamento das proteínas, encontraram três isoformas de *oleosins*. Os pesquisadores constataram que as *oleosins* 16, 17 e 18 estão presentes em proporções similares a 2:1:1 nos corpos lipídios das três regiões da semente que armazenam lipídios: o eixo-embrionário, escutelo e o aleuroma.

Por fim, as proteínas *lanC-like protein* (ID: B6TCV9) e *TRIBOA-glucoside O-methyltransferase BX7* (ID: B1P123) não apresentaram diferenças significativas (5% de probabilidade pelo teste F) com relação ao aumento de expressão quando foram comparadas as linhagens P11 e P16. Entretanto, apresentaram aumento de expressão quando P16 e P11 foram comparadas no 25º DAP e quando foi realizada a comparação entre o 25º e o 15º DAP na linhagem P16 e na linhagem P11.

A *lanC-like protein* não teve sua função caracterizada. Por outro lado, a proteína *TRIBOA-glucoside O-methyltransferase BX7* é uma enzima relacionada ao processo biológico de metilação. Ela participa da biossíntese de benzoxazinoídes em plantas e esses são metabólitos secundários, com função associada à defesa contra pragas e doenças em plantas (Figura 9).

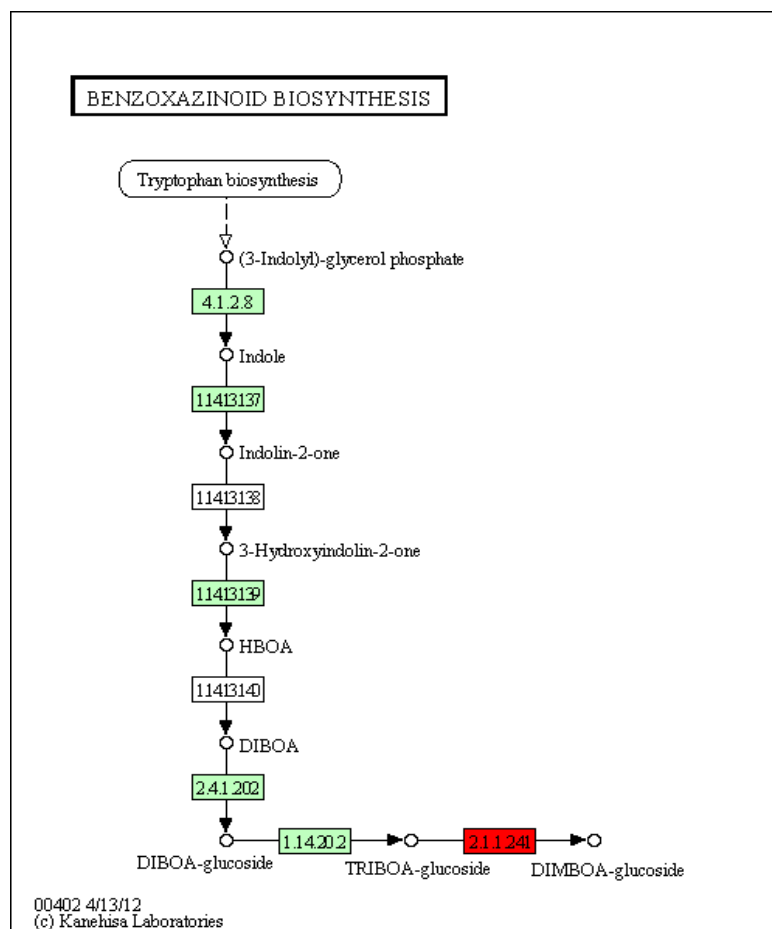


Figura 9 – Biossíntese de benzoxazinoídes *DIMBOA-glucoside*. Em destaque no quadro em vermelho é a enzima *TRIBOA-glucoside O-methyltransferase BX7* (ID: B1P123) responsável pela conversão de *TRIBOA-glucoside* em *DIMBOA-glucoside*.

A comparação entre as proteínas diferencialmente expressas na linhagem P11 com as expressas na 15° DAP nas duas linhagens (P11<sub>25°DAP</sub>/P11<sub>15°DAP</sub> X P16<sub>15°DAP</sub>/P11<sub>15°DAP</sub>) propiciou a identificação de duas proteínas com expressão aumentada: *40S ribosomal-S9* (ID: B6T7B2) e a *pyruvate descarboxylase* (ID: Q8S4W8). Essas proteínas apresentaram aumento na expressão no 25° DAP quando foi realizada a comparação com o 15° DAP na linhagem P11 e no período de 15° DAP na linhagem P16, quando comparadas à linhagem P11 neste mesmo período. Ressalta-se que não foram observadas diferenças estatísticas significativas a 5% de probabilidade pelo teste F entre essas combinações de tratamentos.

A *40S ribosomal-S9* é uma proteína estrutural do ribossomo, associada às funções de tradução gênica, enquanto a *pyruvate descarboxylase* catalisa a decarboxilação do ácido pirúvico em acetaldeído e CO<sub>2</sub>. Em nenhuma das onze proteínas que tiveram sua expressão aumentada nas comparações de tratamentos P16<sub>25°DAP</sub>/P16<sub>15°DAP</sub> e P16<sub>25°DAP</sub>/P11<sub>25°DAP</sub> (Quadro 9) não foram observadas

diferenças estatísticas significativas pelo teste F entre as duas combinações de tratamentos.

Quadro 9 – Proteínas que tiveram a expressão aumentada na linhagem P16 e quando comparada à linhagem P11(P16<sub>25°DAP</sub>/P16<sub>15°DAP</sub>) no 25° DAP (P16<sub>25°DAP</sub>/P11<sub>25°DAP</sub>)

Acesso	Descrição	Relação		Teste F
		117/115	117/116	
E9JVD4	<i>Aldose reductase</i>	2,90±0,07	2,85±0,12	NS
	<i>Late embryogenesis abundant protein D-34</i>			NS
B6UH67	<i>34</i>	4,60±0,57	5,24±0,83	
B6SID7	<i>Late embryogenesis abundant protein 3</i>	6,14±1,01	11,24±6,14	NS
Q946V2	<i>Legumin 1</i>	2,40±0,47	2,45±0,69	NS
B6SKP5	<i>Osmotin-like protein</i>	2,18±0,28	1,81±0,09	NS
Q4A1J7	<i>Putative cystatin (Fragment)</i>	1,62±0,02	1,88±0,23	NS
A3KLI0	<i>Rab17 protein</i>	2,88±0,69	5,09±2,99	NS
Q41850	<i>Rab28 protein</i>	2,48±0,52	3,53±0,86	NS
B6TEC1	<i>Sorbitol dehydrogenase</i>	2,35±0,22	2,75±0,70	NS
K7V5N4	<i>Uncharacterized protein</i>	2,41±0,31	3,73±1,43	NS
C0HG26	<i>Uncharacterized protein</i>	3,97±0,93	4,15±1,73	NS

Acesso: Identificação Uniprot; 115 – P11<sub>25°DAP</sub>; 116 – P16<sub>15°DAP</sub>; 117 – P16<sub>25°DAP</sub>.  
<sup>NS</sup> não significativo pelo teste F (Pr≥0,05).

Quatro das onze proteínas não apresentaram notação funcional estabelecida: a proteína *Rab28* (ID: Q41850), *osmotin-like protein* (ID: B6SKP5) e duas *late embryogenesis abundant protein (D-34 e 3)* (ID: B6UH67 e B6SID7, respectivamente), já discutidas anteriormente. Vernoud et al. (2005) explicaram que *Rab* é um grupo de proteínas assim designado porque aparecem quando embriões de milho são cultivados *in vitro* em resposta ao ácido abscísico (ABA). Para Niogret et al. (1996), os genes de *rab17* e *rab28* são fortemente expressos no eixo embrionário quando comparados ao escutelo. Lee et al. (2002) observaram elevada expressão para o gene *rab17* no 25° DAP, quando comparado ao 15° DAP durante o desenvolvimento do embrião de milho, embora, após este período, fosse constatado aumento na expressão deste gene até o 40° e 45° DAP.

Uma *legumin 1* (ID: Q946V2) associada à função de reserva de nutrientes no embrião foi observada, assim como uma *putative cystatin-fragment* (ID: Q4A1J7) com atividade inibidora de endopeptidases tipo-cisteína, uma *Rab17* (ID: A3KLI0) de

resposta a estresse hídrico, uma *sorbitol dehydrogenase* (ID: B6TEC1) associada a processos de oxirredução na via metabólica da frutose e manose e uma *aldose reductase* (ID: E9JVD4) também com atividade de oxirredutase.

Liu et al. (2009b) observaram incremento na expressão da proteína *legumin* em embriões de genótipos com elevado teor de óleo, quando comparados ao genótipo com teor normal de óleo no embrião.

A proteína *cystatin* desempenha papel de regulação da deposição de proteínas durante o desenvolvimento das sementes e germinação (Massonneau et al., 2005; Huang et al., 2012; Wang et al., 2014). A cistatina é um inibidor reversível de proteases de cisteína atuando na regulação direta do armazenamento de proteínas (Wang et al., 2014).

Chen et al. (2002) observaram a expressão da *aldose reductase* em embriões submetidos à germinação após a infecção por *Aspergillus flavus*, adicionando a esta proteína uma nova junção relacionada a defesa contra microorganismos. Wang et al. (2014) associaram esta proteína à resposta a estresse.

Duas *uncharacterized proteins* (ID: K7V5N4 e C0HG26), após busca no GO e Kegg, apresentaram a função de atividade endopeptidase tipo-aspartato e atividade hidrolase no metabolismo do nitrogênio (ácido cianoamino) e metabolismo de carboidratos (glicoxilato e dicarboxilato), respectivamente. Estas proteínas, após buscas no Blast, não evidenciaram alinhamento satisfatório que possibilitasse sua caracterização.

Frente aos resultados relativos ao aumento ou redução na expressão de proteínas entre as linhagens com elevada e baixa capacidade de expansão durante o embriogênese, vários aspectos devem ser observados.

Lee et al. (2002) e Vernoud et al. (2005) definem a embriogênese como a soma de todos os processos de crescimento e diferenciação que vão da fase de zigoto unicelular a embrião maduro – estrutura multicelular altamente organizada. A totalidade do processo de embriogênese para Lee et al. (2002) é dividido em cinco etapas: divisão celular, alongamento celular, deposição de reservas, maturação e dessecação. No período próximo ao 20<sup>o</sup> DAP, observa-se que a expressão de enzimas metabólicas é mais intensa, a divisão e diferenciação param e os processos de armazenamento e dessecação se iniciam, sendo todas essas mudanças relacionadas às mudanças nos níveis de ácido abscísico (ABA).

Lee et al. (2002) e Liu et al. (2008) observaram mudanças drásticas na expressão gênica entre o 20<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> DAP nos embriões. Mudanças na expressão gênica após 25<sup>o</sup> DAP foram muito pequenas. Foi observado que a primeira fase é um período em que são ativados os precursores da biossíntese, síntese de DNA e divisão celular. A segunda fase envolve a biossíntese e a deposição de reservas, tais como armazenamento de proteínas, ácidos graxos e amido.

A embriogênese em *Z. mays*, segundo Vernoud et al. (2005), é dividida em três grandes fases. A primeira, que inclui a diferenciação celular para formar todos os órgãos do embrião com duração até o 15<sup>o</sup> DAP fase, é dada pelo desenvolvimento e pela morfogênese. A segunda fase compreende o período de maturação e de crescimento do embrião e também o acúmulo de reservas, como proteínas e óleos, permanecendo o embrião nesta fase desde o 15<sup>o</sup> DAP até o 45<sup>o</sup> DAP. Durante a terceira fase, que se inicia a partir do 45<sup>o</sup> DAP, observa-se o processo de desidratação do embrião que entra em dormência, preparando-se para a separação da planta mãe.

O presente experimento compreendeu a análise da expressão de proteínas nos períodos de 15<sup>o</sup> DAP e 25<sup>o</sup> DAP, ou seja, na segunda fase da embriogênese de *Z. mays* (milho comum) (Vernoud et al., 2005).

Proteínas observadas na fase de maturação e crescimento puderam ser observadas pelo aumento na expressão de proteínas, como a *late embryogenesis abundant* e a *seed maturation*, conforme transcorreram os dias da embriogênese do 15<sup>o</sup> ao 25<sup>o</sup> DAP. Fato importante a ser observado é que a expressão destas proteínas foi maior na linhagem de baixa capacidade de expansão (P16), quando comparada à linhagem de elevada capacidade de expansão (P11), conforme farta descrição na literatura (Vernoud et al., 2005; Liu et al., 2008) sobre o processo de embriogênese em milho comum. Por outro lado, o aumento na expressão destas proteínas na linhagem P11, sendo esta expressão menor que a da linhagem P16, evidencia um atraso no desenvolvimento embrionário na linhagem de elevada capacidade de expansão.

A *late embryogenesis abundant protein* não apresenta notação funcional definida, mas esta proteína já foi observada em inúmeros trabalhos que avaliam o desenvolvimento de embriões de milho, acumulando-se conforme transcorrem os dias da embriogênese. Assim sendo, esta proteína passou a ser um marcador do



desenvolvimento embrionário (Chen et al., 2002; Campo et al., 2004; Chen et al., 2007; Huang et al., 2012; Gong et al., 2013; Wang et al., 2014).

A *seed maturation protein* está associada ao processo de desenvolvimento e maturação da semente e da mesma forma em que a *late embryogenesis abundant* se acumula conforme avançam os dias após a polinização. Esta proteína foi relatada em trabalhos sobre desenvolvimento embrionário de milho por Pechanova et al. (2013) e Wang et al. (2014).

Outro ponto a ser observado é em relação ao acúmulo de reservas no embrião, realizado na segunda etapa do desenvolvimento (Vernoud et al., 2005). Observou-se aumento na expressão de proteínas, *globulin*, *oleosin*, *legumin*. Estas proteínas aumentaram sua expressão conforme transcorreu a embriogênese, sendo este aumento na expressão maior na linhagem de baixa capacidade de expansão (P16). Assim, novamente observa-se similaridade no perfil de expressão de proteínas da linhagem P16 com relação aos resultados encontrados na literatura para a embriogênese de milho comum (Vernoud. et al., 2005; Liu et al., 2008) e a linhagem P11 (de alta capacidade de expansão) apresenta-se tardia em relação ao processo de desenvolvimento embrionário.

As globulinas são as principais proteínas de armazenamento, representando de 10% a 20% de proteína do embrião (Kriz, 1989, Vernoud et al., 2005). Esta proteína também já foi observada em outros trabalhos sobre desenvolvimento das sementes, aumentando sua expressão na 2ª etapa do desenvolvimento embrionário (Chen et al., 2002; Campo et al., 2004; Vernoud et al., 2005; Liu et al., 2009b).

A proteína *oleosin* tem função associada ao armazenamento de lipídios em estruturas celulares designadas corpos lipídicos (“oil bodies”), havendo maior expressão das oleosinas no 25º DAP (Liu et al., 2008; Jiménez-López et al., 2011). As *oleosin* possuem importância tanto para a estabilidade dos corpos lipídicos como na possibilidade de atuar no reconhecimento de sinais para a ligação de lipases durante o processo de germinação (Lee e Huang, 1994).

Finalmente, a proteína *legumin*, também associada à função de reserva de nutrientes no embrião, aumentando sua expressão conforme avança a embriogênese, foi observada por Liu et al. (2009b), cujas pesquisas corroboram os resultados encontrados neste trabalho.

A linhagem de alta capacidade de expansão apresentou diminuição na expressão de quatro proteínas associadas ao metabolismo de proteínas,

comportamento este não coincidente aos resultados disponíveis na literatura. A literatura registra um aumento na expressão de proteínas da via metabólica de proteína, uma vez que, durante esta etapa do desenvolvimento embrionário, o nível da expressão dos genes das proteínas identificadas (Liu et al., 2008) e dessas proteínas identificadas (Vernoud et al., 2005) deve aumentar para possibilitar o acúmulo de proteínas que serão armazenadas no embrião.

O aumento na expressão de nove proteínas, sendo a grande maioria dessas proteínas associadas ao metabolismo do ácido cítrico na linhagem P11 (elevada capacidade de expansão), evidencia comportamento diferencial à embriogênese de milho comum. Proteínas do metabolismo do ácido cítrico possuem expressão aumentada no período de 10 e 15<sup>o</sup> DAP e diminuição após o 25<sup>o</sup> DAP (Vernoud et al., 2005), evidenciando novamente um leve atraso na embriogênese da P11 quando comparada à P16, que não apresentou diferenças na expressão, quando comparada ao padrão de expressão das proteínas desta via metabólica de embriões de milho comum, conforme descrito na literatura.

O milho comum, se submetido a uma temperatura adequada para o estouro, como a temperatura do milho pipoca, pode atingir um índice de capacidade de expansão (ICE) médio de 3, considerado muito baixo (Sawazaki, 2001). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa (dados não mostrados) evidenciaram que a linhagem P16 apresenta baixa capacidade de expansão, com ICE de aproximadamente 22,6. Esta linhagem apresenta perfil de expressão de proteínas durante a embriogênese similar ao perfil de expressão de proteínas da embriogênese de milho comum.

Em contrapartida, a linhagem P11, de elevada capacidade de expansão, com ICE de aproximadamente 39,6, apresenta perfil na expressão de proteínas durante a embriogênese diferencial de milho comum. A comparação entre proteínas observadas na linhagem de milho pipoca com as proteínas expressas durante a embriogênese de milho comum, disponível na literatura, demonstra que a linhagem de milho pipoca com alta capacidade de expansão se encontra tardia em relação à embriogênese de milho comum. Isso é um importante indicativo de que a expressão diferencial destas proteínas pode ser o primeiro aspecto diferencial a ser estudado em associação à característica capacidade de expansão.

Frente às diferenças na expressão relatadas neste trabalho, novas vias metabólicas-alvo, como metabolismo de lipídios e de carboidratos, devem ser

estudadas pela proteômica quantitativa, uma vez que se observa grande influência da composição lipídica (Zinsly e Machado, 1987; Luz et al., 2005) e proteica (Robbins Jr. e Ashman, 1984; Rooney e Serna-Saldívar, 1987) na capacidade de expansão, com intuito de buscar proteínas associadas à capacidade de expansão e candidatas para estudos de proteômica alvo-direcionada.

#### 4. CONCLUSÕES

a) A utilização dos marcadores isobáricos iTRAQ® foram extremamente úteis neste experimento, para avaliar o proteoma quantitativo diferencial entre as duas linhagens de milho pipoca nas duas diferentes épocas de coleta.

b) A expressão diferencial de proteínas do embrião evidencia que a linhagem de milho pipoca com baixa capacidade de expansão (P16) apresenta comportamento embriogênico semelhante ao processo de embriogênese em milho comum.

c) A expressão de proteínas nos embriões da linhagem de milho pipoca com elevada capacidade de expansão (P11) evidenciou um atraso na embriogênese em relação à expressão de proteínas no embrião de milho comum.

d) A expressão diferencial de proteínas no embrião destas linhagens nos fornece indicativo de que este é o primeiro aspecto diferencial a ser estudado quanto à característica capacidade de expansão.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPO, S.; CARRASCAL, M.; COCA, M.; ABIÁN, J.; SEGUNDO, B.S. The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: A proteomics approach. **Proteomics**, 4:383-396, 2004.

CHEN, Z.Y.; BROWN, R.L.; DAMANN, K.E.; CLEVELAND, T.E. Identification of maize kernel endosperm proteins associated with resistance to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, 97:1094-1103, 2007.

CHEN, Z.Y.; BROWN, R.L.; DAMANN, K.E.; CLEVELAND, T.E. Identification of unique or elevated levels of kernel proteins in aflatoxin-resistant maize genotypes through proteome analysis. **Phytopathology**, 92:1084-1094, 2002.

DI CIERO, L.; BELLATO, C.M. Proteoma; Avanços recentes em técnicas de Eletroforese bidimensional e Espectrometria de Massa. **Biociência**, 29:158-164, 2002.

ELLIOT, M.H.; SMITH, D.S.; PARKER, C.E.; BORCHERS, C. Current trends in quantitative proteomics. **Journal of Mass Spectrometry**, 44:1637-1660, 2009.

GONG, F.; WU, X.; WANG, W. Comparative proteomic identification of embryo proteins associated with hydropriming induced rapid-germination of maize seeds. **Plant Omics Journal**, 6:333-339, 2013.

HUANG, H.; MOLLER, I.M.; SONG, S.Q. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. **Journal Proteomics**, 75:1247–1262, 2012.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, S.; MANCERA-MARTÍNEZ, E.; DONAYRE-TORRES, A.; RANGEL, C.; URIBE, L.; MARCH, S.; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, G.; JIMÉNEZ, E.S. Expression profile of maize (*Zea mays* L.) embryonic axes during dermination: translational regulation of ribosomal protein mRNAs. **Plant & Cell Physiology**, 52: 1719-1733, 2011.

KANEHISA, M.; GOTO, S.; SATO, Y.; FURUMICHI, M.; TANABE, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. **Nucleic Acids Research**, 40:109–114, 2012.

KRIZ, A.L. Characterization of embryo globulins encoded by the maize Glb genes. **Biochemical genetics**, 27:239-251, 1989.

LEE, J.M.; WILLIAMS, M.E.; TINGEY, S.V.; RAFALSKI, J.A. DNA array profiling of gene expression changes during maize embryo development. **Functional & Integrative Genomics**, 2:13-27, 2002.

LEE, K.; HUANG, A.H.C. Genes encoding oleosins in maize kernel of inbreds Mo17 and B73. **Plant Molecular Biology**, 26:1981-1987, 1994.

LIU, X.; FU, J.; GU, D.; LIU, W.; LIU, T.; PENG, Y.; WANG, J.; WANG, G. Genome-wide analysis of gene expression profiles during the kernel development of maize (*Zea mays* L.). **Genomics**, 91: 378-387, 2008.

LIU, Z.; YANG, X.H.; FU, Y. SAD, a Stearoyl-acyl carrier protein desaturase highly expressed in high-oil maize inbred lines. **Russian Journal of Plant Physiology**, 56:709-715. 2009a.

LIU, Z.; YANG, X.H.; FU, Y.; ZHANG, Y.; YAN, J.; SONG, T.; ROCHEFORD, T.; LI, J. Proteomic analysis of early germs with high-oil normal inbred lines in maize. **Molecular Biology Reports**, 36:813-821, 2009b.

LU, T.C.; MENG, L.B.; YANG, C.P.; LIU, G.F.; LIU, G.J.; MA, W.; WANG, B.C. A shotgun phosphoproteomics analysis of embryos in germinated maize seeds. **Planta**, 228:1029-1041, 2008.

LUZ, M.L.S.; DALPASQUALE, V.D.; SCAPIM, C.A.; DE LUCCA E BRACCINI, A.; ROYER, M.R.; MORA, F. Influência da umidade das sementes na capacidade de expansão de três genótipos de milho pipoca (*Zea mays* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, 27:549-553, 2005.

MASSONNEAUM, A.; CONDAMINE, P.; WISNIEWSKI, J-P.; ZIVY, M.; ROGOWSKY, P.M. Mayze cystatins respond to developmental cues, cold stress and drought. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1729:186-199, 2005.

MATALLANA-SURGET, S.; LEROY, B.; WATTIEZ, R. Shotgun proteomics: concept, key points and data mining. **Expert Review of Proteomics**, 7: 5-7, 2010.

MCCARTHY, F.M.; GRESHAM, C.R.; BUZA, T.J.; CHOUVARINE, P.; PILLAI, L.R.; KUMAR, R.; OZKAN, S.; WANG, H.; MANDA, P.; ARICK T.; BRIDGES, S.M.; BURGESS, S.C. AgBase: supporting functional modeling in agricultural organisms. **Nucleic Acids Research**, 39:497-506, 2011.

MÉCHIN, V.; THÉVENOT, C.; GUILLOUX, M.L.; PRIOUL, J.L.; DAMERVAL, C. Developmental analysis of maize endosperm proteome suggests a pivotal role for pyruvate orthophosphate dikinase. **Plant Physiology**, 143:1203-1219, 2007.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Glicólise, Gliconeogênese e Via das Pentoses-fosfato. In: NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Editora Artmed, Porto Alegre – RS, p.527-568, 2011.

NIOGRET, M.F.; CULIÁÑEZ-MACIÀ, F.A.; GODAY, A.; ALBÀ, M M.; PAGÈS, M. Expression and cellular localization of *rab28* mRNA and Rab28 protein during maize embryogenesis. **The Plant Journal**, 9:549-577, 1996.

NOGUEIRA, F.C.S.; PALMISANO, G.; SCHWAMMLE, V.; SOARES, E.L.; SOARES, A.A.; ROEPSTORFF, P.; DOMONT, G.B.; CAMPOS, F.A.P. Isotope Labeling-Based **Journal of Proteome Research**, 12:5012-5024, 2013.

OLIVEROS, J.C. **Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams**. Disponível em: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>. Acesso em: 12, fevereiro, 2014.

PECHANOVA, O.; TAKÁC, T.; SAMAJ, J.; PECHAN, T. Maize proteomics: an insight into the biology of an important cereal crop. **Proteomics**, 13:637-662, 2013.

QIN,J.; FU, F.; LIU, D.; YIN, C.; ZHAO, S.; CHEN, H.; ZHANG, J.; YANG, C.; ZHAN, X.; ZHANG, M. Proteomic analysis of elite soybean Jidou17 and its parents using iTRAQ-based quantitative approaches. **Proteome Science**, 11:1-12, 2013.

ROBBINS, W.A.JR.; ASHMAN, R.B. Parent-offspring popping expansion correlations in progeny of dent corn x popcorn and flint corn x popcorn crosses. **Crop Science**, 24: 119-121, 1984.

ROONEY, L.W.; SERNA-SALDÍVAR, S.O. Food uses of whole corn and dry-milled fractions. In: WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. (eds.). **Corn: chemistry and technology**. St. Paul: AACCI International, 1987. p. 399-429.

ROSS, P.L.; HUANG, Y.N.; MARCHESE, J.N.; WILLIAMSON, B.; PARKER, K.; HATTAN, S.; KHAINOVSKI, N.; PILLAI, S.; DEY, S.; DANIELS, S.; PURKAYASTHA, W.; JUHASZ, P.; MARTIN, S.; BARTLET-JONES, M.; HE, F.; JACOBSON, A.; PAPPIN, D.J. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. **Molecular & Cellular Proteomics**, 3:1154-1168, 2004.

SAWAZAKI, E. A cultura do milho pipoca no Brasil. **O Agrônomo**, 53:11-13, 2001.

SILVA E SILVA, A.M.; CORRÊA, G.C.; REIS, E.M. Proteômica – Uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde & Ambiente em Revista**, 2:1-10, 2007.

SOSSOUNTOZOV, L.; RUIZ-AVILA, L.; VIGNOLS, F.; JOLLIOT, A.; ARONDEL, V.; TCHANG, F.; GROSBOIS, M.; GUERBETTE, F.; MIGINIAC, E.; DELSENY, M.; PUIGDOMENECH, P.; KADER, J.C. Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. **The Plant Cell**, 3:923-933, 1991.

THINGHOLM, T.E.; PALMISANO, G.; KJELDSSEN, F.; LARSEN, M. R. Undesirable charge-enhancement of isobaric tagged phosphopeptides leads to reduced identification efficiency. **Journal Proteome Resource**, 9: 4045-4052, 2010.

TIFFIN, P. Comparative evolutionary histories of chitinases genes in the genus *Zea* and family Poaceae. **Genetics**, 167:131-1340, 2004.



TNANI, H.; LÓPEZ, I.; JOUENNE, T.; VICIENT, C.M. Protein composition analysis of oil bodies from maize embryos during germination. **Journal of Plant Physiology**, 168:510-513, 2011.

VERNOUD, V.; HAJDUCH, J.; KHALED, A.S.; DEPÈGE, N.; ROGOWSKY, P.M. Maize embryogenesis. **Maydica**, 469-483, 2005.

WANG, W.Q.; YE, J.Q.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; WOJDYLA, K.I.; JENSEN, O.N.; MOLLER, I.M.; SONG, S.Q. Proteomic comparison between maturation drying and prematurely imposed drying of *Zea mays* seeds reveals a potential role of maturation drying in preparing proteins for seed germination, seedling vigor, and pathogen resistance. **Journal Proteome Research**, 13:606-626, 2014.

ZHANG, Y.; FFONSLow, B.; SHAN, B.; BAEK, M-C.; YATES, J.R. Protein analysis by Shotgun/Bottom-up proteomics. **Chemical Reviews**, 113: 2343-2394, 2013.

ZINSLY, J.R.; MACHADO, J.A. Milho pipoca. In: PATERNIANI, E; VIÉGAS, G.P. (eds.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 411-422.